

Universidad Nacional de Cuyo  
Facultad de Ciencias Agrarias



# **VALIDACION E INCERTIDUMBRE DEL METODO NORMALIZADO PARA ION NITRITO EN AGUA**

TESIS DE GRADO  
LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

Autor: Laura Vanesa Savina  
Instituto Nacional de Tecnología Industrial Mendoza  
Aráoz 1511 Luján de Cuyo  
[www.inti.gob.ar](http://www.inti.gob.ar)  
Mendoza, 2017

## **Estructura de la tesis de grado**

La memoria de esta tesis de grado, se estructura en cinco capítulos. En el primer capítulo " Introducción" se recogen los fundamentos teóricos que se han utilizado en el desarrollo del presente trabajo. Tras una breve introducción sobre la importancia del control de la presencia de ión nitrito en agua, se detalla la validación de métodos analíticos y la elaboración de un programa de validación incluyendo las diferentes etapas para su creación. Posteriormente se introduce el concepto de incertidumbre y se estudia su relación con otros parámetros tales como la precisión y exactitud, con la visión de citar la metodología para la estimación de la incertidumbre y la importancia de su determinación. También en él se citan los objetivos del presente trabajo y la hipótesis planteada para su estudio.

En el segundo capítulo " Materiales y métodos para la validación" se presenta la metodología utilizada para la realización del método seleccionado 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> B colorimétrico citado en el Standard Methods y la elaboración de un procedimiento de validación mediante etapas definidas que se pueden utilizar como guía para completar con éxito el procedimiento. En el tercer capítulo " Resultados y discusión para la validación" se desarrolla la metodología para la evaluación de los parámetros establecidos y la discusión de los mismos basados en los resultados obtenidos.

El cuarto capítulo " incertidumbre" hace referencia a la importancia de la obtención de la incertidumbre y el procedimiento para estimarla estadísticamente. En él se citan las etapas para su obtención, muestra la cuantificación de la incertidumbre relacionada a cada fuente de error y desarrolla la estimación propiamente dicha de la incertidumbre expandida asociada al resultado de la concentración de ión nitrito reproducido por el método analítico.

En el quinto y último capítulo se muestran las conclusiones del trabajo con relación al análisis de los resultados para cada etapa de validación y la conclusión sobre el estudio de la incertidumbre obtenida, contribuyendo a la confiabilidad de los resultados para que el método en estudio sea reproducido con éxito.

**VALIDACION E INCERTIDUMBRE DEL METODO  
NORMALIZADO PARA ION NITRITO EN AGUA**

**TESIS DE GRADO  
LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA**

**Laura Vanesa Savina**

Darragueira 6581, Luján de Cuyo, Mendoza

Cel.: (0261)156122497

lulitasavina@gmail.com.ar

Directora de Tesis: Lic. Analía Santi

Co- Directora: Mgter. Ing Agr. Laura Cánovas

Comité evaluador: Presidente: MSc Adriana Bermejillo

Vocal: Dra Lic. Claudia Amadio

Vocal: MSc Lic. Qca. Liliana De Borbon

Vocal suplente: Lic. Nora Martinengo

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres y a mis seres queridos por darme fuerza para luchar por el logro de este objetivo, por el apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de toda mi carrera y mis proyectos.

A mis amigos y compañeros de trabajo que me acompañaron y me alentaron para que pudiera terminar el texto final.

A la Lic. Analía Santi y Mgter. Ing. Agr. Laura Cánovas quienes me brindaron su tiempo su amistad y sabiduría, su apoyo fue fundamental en la culminación de la investigación.

Al Ing. Juan Carlos Najul por permitirme difundir los conocimientos obtenidos en el laboratorio de Servicios y ensayos de INTI Mendoza y permitirme utilizar sus instalaciones, equipos e insumos.

A todos aquellas personas que en alguna forma participaron en mis estudios y me enseñaron con su ejemplo y cariño.

Y a Dios que me dio la fortaleza y el empuje para terminar mi carrera.

## RESUMEN

El ion nitrito es una sustancia inorgánica que puede estar presente de forma natural o por contaminación en aguas destinada para consumo humano. Es potencialmente peligroso para la salud, afectando fundamentalmente a los lactantes. El Código Alimentario Argentino, establece como límite máximo la concentración de  $1 \text{ mg/L}^{-1} \text{ NO}_2^-$ , para no causar efecto nocivo sobre el hombre, el presente trabajo tiene especial interés en la validación y estimación de la incertidumbre relacionada a la técnica analítica, para la determinación de su concentración y así obtener resultados confiables para su fiscalización.

La determinación química oficial analizada es la colorimétrica 4500- $\text{NO}_2^-$  - B, normalizada en el Standard Methods, basada en la espectrofotometría uv-visible, para aguas no coloreadas. El ion nitrito se determina por la formación de un colorante azo púrpura rojizo, producido a pH 2,0 a 2,5 por acoplamiento de sulfamida diazotizada con clorhidrato de N-(1naftil)-etilendiamina (diclorhidrato de NED), para concentraciones de nitrito entre 0,084 y  $0,657 \text{ mgL}^{-1}$ .

Los parámetros que se evaluaron fueron: linealidad, límite de cuantificación, límite de detección, exactitud y precisión. Los valores obtenidos cumplieron con los criterios de aceptación establecidos por las normativas y guías de referencia para la validación de técnicas analíticas. Se estimó la incertidumbre combinada y expandida para la metodología utilizada.

Con esto se puede concluir que se obtuvo un método confiable para controlar la concentración de ion nitrito en agua y así poder garantizar la seguridad alimentaria de los consumidores.

## INDICE

### **Capítulo I: Introducción**

1. Introducción	2
1.1 Importancia de la determinación de ión nitrito	2
1.2 Validación	5
1.2.1 Elección y justificación del método	5
1.2.2 Identificación y descripción del procedimiento de ensayo	9
1.2.3 Definición de los parámetros o criterios de calidad a cumplir	10
1.2.4 Evaluación y aceptación de los parámetros o criterios establecidos	12
1.3 Incertidumbre	12
1.3.1 Error e incertidumbre	13
1.3.2 La incertidumbre de medida	13
1.3.3 Incertidumbre y exactitud	15
1.3.4 Incertidumbre y precisión	16
1.3.5 Proceso de estimación de la incertidumbre de medida	16
1.4 Objetivos de la tesis de grado	19
1.5 Hipótesis del trabajo	20

### **Capítulo II: Materiales y métodos para la validación**

2. Planificación y desarrollo del procedimiento de validación	22
2.1 Introducción	22
2.2 Planificación para el procedimiento de validación	22
2.3 Desarrollo del procedimiento de validación	23
2.3.1 Materiales y método de ensayo	23
2.3.2 Definición de los parámetros de validación	31

### **Capítulo III: Resultados y discusión para la validación**

3. Evaluación de los parámetros establecido	37
3.1 Determinación de la linealidad	37
3.2 Determinación de el límite de cuantificación	39
3.3 Determinación de el límite de detección	40
3.4 Determinación de la precisión del método	40
3.5 Determinación de la exactitud del método	41

### **Capítulo IV: Incertidumbre**

4. Introducción	44
-----------------	----

6

4.1 Estimación de la incertidumbre	44
4.1.1 Etapa I: Especificación del mesurando	45
4.1.2 Etapa II: Identificación de las fuentes de incertidumbre	45
4.1.3 Etapa III: Cuantificación de la incertidumbre	47
4.1.4 Etapa IV: Cálculo de la incertidumbre combinada y expandida	55
<b>Capítulo V: Conclusiones</b>	
5. Conclusión	58
<b>6. Bibliografía</b>	59
<b>7. Anexo I</b>	62
<b>8. Anexo II</b>	73





# *Capítulo 1: Introducción*



## 1. Introducción

### 1.1 Importancia de la determinación de nitrito

El estudio de la importancia del ión nitrito en la naturaleza, sus posibles fuentes y toxicidad, fueron de especial interés para la realización del presente trabajo de tesis. La relación del ión con la salud humana motivó la necesidad de poder determinarlo químicamente de forma confiable y segura.

El nitrito es una especie química inorgánica que puede estar presente en las aguas de forma natural como consecuencia de la oxidación del amoníaco, como resultado de la reducción del ión nitrato o por la descomposición natural microbiana de materiales nitrogenados orgánicos, tales como las proteínas presentes en plantas y animales (GUIFFRE, 2001). Otras fuentes no naturales del ión nitrito son las originadas a partir de la actividad humana como el uso de fertilizantes nitrogenados y desechos municipales e industriales. Estas prácticas hacen que en el planeta, la fijación de nitrógeno por actividad humana sea mayor que la de los procesos naturales (GUIFFRE, 2003). Las plantas aprovechan únicamente un 50% del nitrógeno aportado en el abonado orgánico, esto supone que el exceso de nitrógeno se pierde, ya que es lavado del suelo por el agua y se filtrará al subsuelo, siendo así arrastrado hacia los acuíferos, ríos y embalses contaminando las aguas destinadas a consumo humano (GONZALLES, 2011).

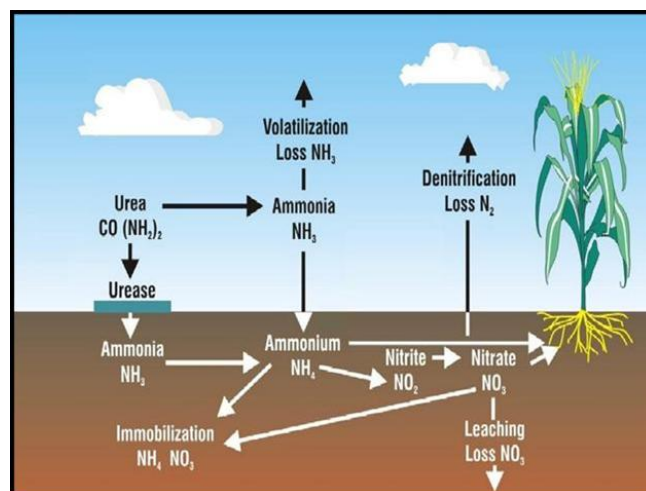


Figura 1: Contaminación por fertilizantes un serio problema ambiental. (Monografía. Ing. M.Sc. Fernando S.

González Huiman)

Otra fuente de contaminación son los acuíferos construidos en la agricultura debido a que el material de relleno utilizado no cumple con la función de impermeabilidad; la humedad del agua en tránsito permite disolver agentes contaminantes de fosas sépticas y campos de cultivos que luego por lixiviación y drenaje van a contaminar otras fuentes de agua (FERNANDEZ, 2006). En la figura 2 podemos observar la secuencia de contaminación de un acuífero.

La presencia del ión nitrito se debe considerar como un indicio fundado de una posible contaminación reciente dada su inestabilidad y su toxicidad.

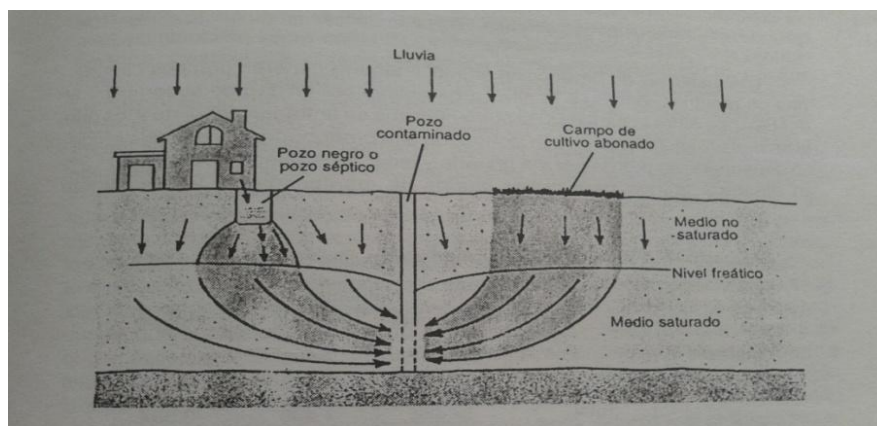


Figura 2: Contaminación de acuíferos. (Santa Cruz y Silva, 1999)

El ión nitrito es potencialmente peligroso para la salud humana, por ello es importante conocer los efectos biológicos y la toxicocinética de los mismos, y así poder prevenir su ingesta.

En el organismo humano, de todos los nitritos ingeridos, solo una fracción es absorbida mediante transporte activo en la parte superior del intestino delgado y otra por el conducto gastrointestinal (SILVESTE, 1995).

La biotransformación del ión nitrato a nitrito, se efectúa por medio de una enzima llamada nitrato reductasa. El ión nitrito generado se distribuye rápidamente por los tejidos y reacciona con la hemoglobina de la sangre ( $Hb^{2+}$ ) para formar metahemoglobina ( $Hb^{3+}$ ). La metahemoglobina, es la hemoglobina cuyo átomo de hierro ha sido oxidado del estado ferroso al férrico, perdiendo la capacidad de fijar oxígeno necesario para la respiración

tisular, provocando efectos nocivos cardiovasculares y respiratorios. Esta manifestación tóxica se la denomina clínicamente metahemoglobinemia, afecta fundamentalmente a los lactantes, debido a que su contenido estomacal es poco ácido, lo que facilita la reducción del ión nitrato a nitrito por las bacterias. Teniendo en cuenta que existen estudios recientes donde se comprobó que el ión nitrito se bioacumula en tejidos como la leche humana sumado a lo anteriormente mencionado se considera a los lactantes como grupo vulnerable. A continuación la figura 3 representa la oxidación de la hemoglobina, la cual se considera una reacción toxica para el organismo humano (LINDER, 1995).

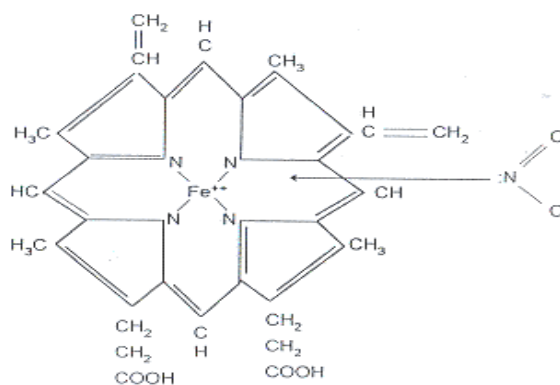
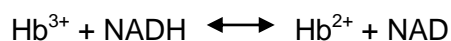


Figura 3: Oxidación del ión ferroso (Linder Hernest ,1995)

Existen varios mecanismos que contrarrestan la oxidación de la hemoglobina; de ellos el más importante es el enzimático, llevado a cabo por dos enzimas: NADH deshidrogenasa I o enzima de Kiese, y la NADH deshidrogenasa II, que constituye un componente de importancia secundaria. Ambas enzimas requieren la formación de NADH en el ciclo glucolítico; el mecanismo enzimático anteriormente explicado queda representado por la siguiente reacción.



Cuando es excedida la capacidad del mecanismo enzimático existe otro proceso importante de reducción que es no enzimático, el cual es realizado por sustancias presentes normalmente en las sangre, como el glutatión y el ácido ascórbico. Este mecanismo resulta importante.

En el caso de los lactantes, carecen tanto de mecanismo no enzimático como de un sistema enzimático NADH metahemoglobina reductasa desarrollado; por lo tanto ellos no son capaces de contrarrestar la oxidación del ion ferroso.

Por lo mencionado anteriormente, es importante contar en nuestro medio con todas las herramientas analíticas validadas que permitan determinar de forma segura la concentración de ión nitrito en alimentos como el agua, de manera de comprobar el cumplimiento de las normativas vigentes, permitiendo un mayor control sobre las fuentes hídricas y garantizar la seguridad alimentaria de los consumidores (ANAYA, 1999).

## **1.2 Validación**

El analista debe estar capacitado para validar los métodos químicos empleados y estimar la incertidumbre de los resultados de modo que sean ampliamente reconocidos, consistentes y de fácil interpretación. El proceso de validación consiste en establecer previamente requisitos que permiten definir los parámetros o criterios de calidad que debe cumplir un método para resolver un problema particular. Estos deben ser verificados, documentados y evaluados (FABRO, 2015).

Para que el proceso de validación se lleve a cabo, es necesario elaborar un programa para en el cual se debe planificar, en primer lugar, la elección de la metodología a utilizar y posteriormente evaluar y cumplir con una serie de etapas que serán detalladas a continuación (QUATTROCCH, 2015).

### **1.2.1 Elección y justificación del método en estudio**

De acuerdo a la naturaleza, a la toxicidad y a la factibilidad de encontrar el ión nitrito en nuestros reservorios de agua, el Código Alimentario Argentino establece en el capítulo XII, art. 982, el valor admisible para la concentración del mismo, especificando como límite máximo  $0,1 \text{ mgL}^{-1} \text{ NO}_2^-$ . Debido al efecto nocivo del ión nitrito sobre la salud humana, el presente trabajo tiene especial interés en la validación de la técnica, para la determinación de su concentración y así obtener resultados confiables para su fiscalización. Para ello se realizó la búsqueda de la metodología más apropiada a dicho fin. La determinación química oficial seleccionada es la normalizada en el Standard Methods, basada en la espectrofotometría uv-visible.

La espectrofotometría uv-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Para hacer este tipo de medidas se emplea

un espectrofotómetro en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma.

Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber, dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio tales como: pH, temperatura, fuerza iónica y constante dieléctrica entre otras.

Cuando la luz es absorbida por una molécula, se origina un salto desde un estado energético basal o fundamental “E<sub>1</sub>” a un estado de mayor energía (estado excitado) “E<sub>2</sub>” liberando finalmente la energía absorbida hasta el estado inicial. Cada molécula tiene una serie de estados excitados que la distinguen del resto. Esto se representa en la figura 4

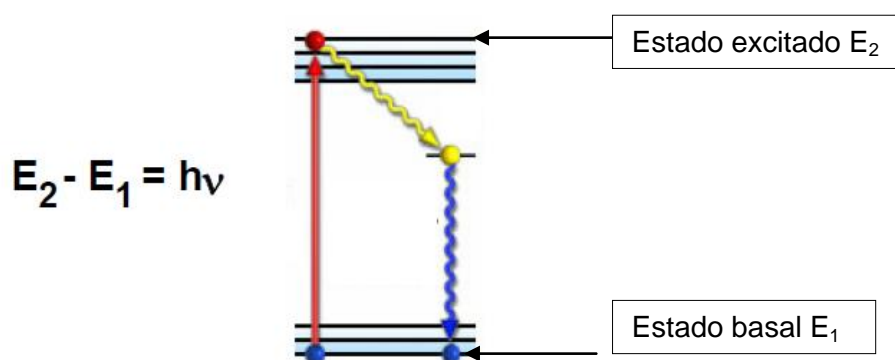


Figura 4: Diagrama de niveles de energía en una molécula. (<https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/practicagenerales.htm>)

A continuación se puede observar la ecuación que responde a la excitación.

$$\Delta E (E_2 - E_1) = h\nu = h c / \lambda$$

$$h = \text{Constante de Planck} = 6,63 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$$

$$\nu = \text{Frecuencia de la radiación} = c / \lambda$$

$$c = \text{velocidad de la luz} = 3 \cdot 10^{10} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$$

Debido a la existencia de diferentes tipos de energía, tales como la de los electrones en sí, la de los movimientos vibracionales de las moléculas y la de la rotación de las mismas, estas pueden interaccionar con radiaciones electromagnéticas de un rango muy amplio de longitudes de onda, dando lugar a distintos tipos de espectroscopias según las diferentes regiones. En la figura 5 se puede observar las diferentes longitudes de ondas del espectro.

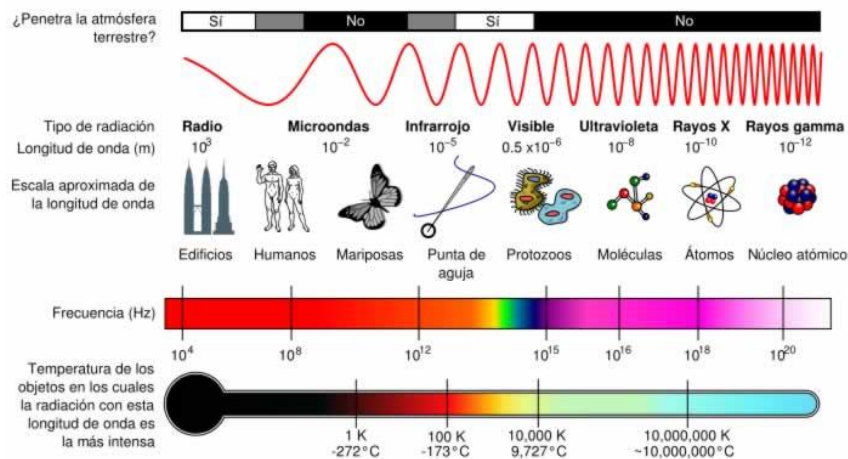


Figura 5: Espectro electromagnético. ([https://www.espectrometria.com/espectro\\_electromagnitico](https://www.espectrometria.com/espectro_electromagnitico)).

Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda e intensidad incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe luz, o de un cromóforo, éste absorberá una parte de la radiación incidente ( $I_a$ ) y dejará pasar el resto ( $I_t$ ), de forma que se cumple que la radiación de luz incidente ( $I_o$ ) es igual a la absorbida ( $I_a$ ) por el compuesto químico más la transmitida ( $I_t$ ) por el mismo.

A continuación se muestra la figura 6 la representación de la incidencia de un rayo de luz sobre la solución química.

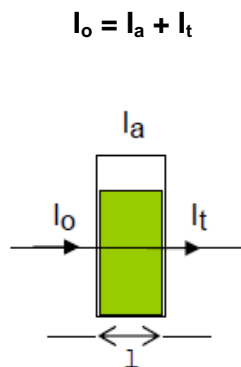


Figura 6: Incidencia de un rayo de luz sobre una disolución química a determinada longitud de onda.

(<https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/practicasgenerales.htm>)

La Transmitancia (T) de una sustancia en solución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra ( $I_t$ ), y la cantidad de luz que incidió sobre ella ( $I_o$ ); se representa normalmente en porcentaje es decir que:

$$\% T = ( I_t / I_o ) \times 100$$

La relación entre %T y la concentración no es lineal, pero asume una relación logarítmica inversa.

La Absorbancia (A) es un concepto más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el logaritmo de 1/T; es decir:

$$A = \log 1/T = -\log T = -\log I_t / I_o.$$

Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ( $I_o = I_t$ ), la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, y entonces A vale  $\log 1 = 0$ .

La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz, la solución del cromóforo y de la concentración de éste. La ley de Lambert-Beer expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución:

$$A = \epsilon l c$$

La ecuación está integrada por, " $\epsilon$ " la absortividad molar o coeficiente de extinción molar; este representa un valor constante para cada sustancia, el valor de " $l$ " representa el espesor de la cubeta y " $c$ " es la concentración molar de la muestra que es directamente proporcional a la absorbancia A.

Existen sin embargo distintos factores que afectan al cumplimiento de la ley de Lambert-Beer, especialmente a concentraciones elevadas. Por ello, antes de proceder al análisis de una muestra es preciso comprobar experimentalmente el rango de concentraciones en que dicha ley se cumple, obteniendo la curva de calibración que relaciona las absorbancias con las concentraciones. La medición de absorbancia de la luz por las moléculas se realiza en equipos llamados espectrofotómetros. Estos pueden variar en diseño, en especial con la incorporación de ordenadores para el análisis de datos; hay espectrofotómetros de un solo haz (con una sola celdilla para alojar la cubeta con la muestra) y de doble haz (con dos celdillas para dos cubetas); todos ellos constan de una fuente de energía radiante, es decir de una lámpara de deuterio o tungsteno entre otros.



En la selección de las radiaciones de una determinada longitud de onda se usa un monocromador que consta de un sistema de filtros, prismas y redes de difracción. Para convertir las señales luminosas en señales eléctricas se utiliza un detector de luz con un amplificador de señal, la misma es registrada y traducida mediante un software a un valor o resultado (U.C.O, 2017).

De forma más sencilla y mediante un esquema la figura 7 muestra las partes de un espectrofotómetro estándar.

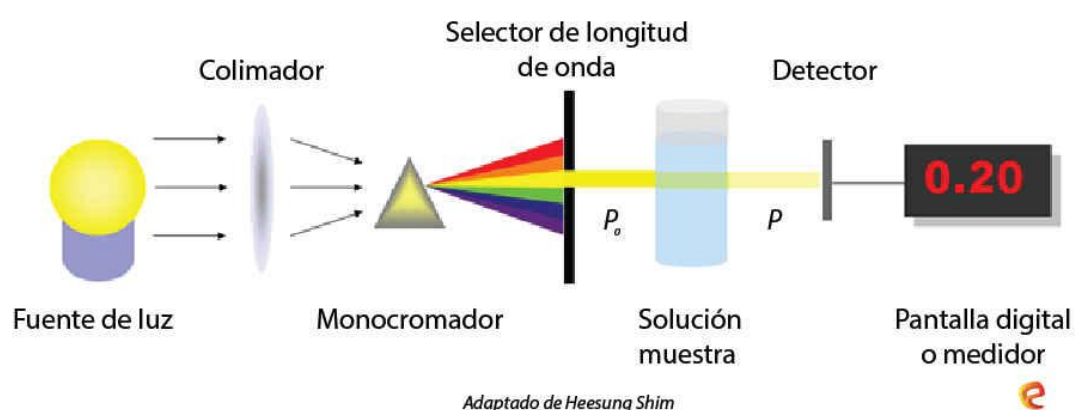


Figura 7: Espectrofotómetro tipo y partes del mismo. (<https://www.elespectrofotometro.com/partes>)

Para conocer el funcionamiento del equipo, es necesario verificar el instrumento mediante mediciones de control, en un período de tiempo relacionado a la actividad del mismo. Estas determinaciones específicas nos permiten asegurar el funcionamiento adecuado, siempre que estos cumplan con los parámetros de fábrica y la comparación frente a materiales de referencia certificados. Los controles del equipo deben quedar documentados para asegurar la trazabilidad de los resultados de los análisis realizados en el espectrofotómetro (ISO 9001:2008).

### 1.2.2 Identificación y descripción del procedimiento de ensayo

El analista debe redactar un procedimiento de ensayo bajo las condiciones del sistema de gestión de calidad, el cual establezca los límites de aplicación y los objetivos del mismo, para asegurar que la técnica puede ser realizada por cualquier analista (FABRO, 2015).

### 1.2.3 Definición de parámetros o criterios de calidad a cumplir

Validar un método consiste en verificar y documentar determinados requisitos previamente establecidos para poder resolver el problema analítico en particular. Estos requisitos son los que definen los parámetros o criterios de calidad que se deben cumplir.

Estos pueden ser de tipo estadístico o bien de tipo operativo /económico. Para el presente proyecto de validación se decidió utilizar: la linealidad, los límites de cuantificación y detección, el rango de trabajo, la repetibilidad, la precisión intermedia y exactitud. A continuación se detallan de acuerdo al orden establecido en el proyecto de validación (MOLINA, 2012).

En primer lugar se define la *linealidad*, que es la relación entre la concentración del analito y la respuesta del método instrumental. Para su determinación se prepara una serie de diluciones de concentración conocida que corresponden al estándar del analito a analizar; éstas varían dentro del rango del método. Se deben leer al menos por duplicado cada concentración para dar origen a la curva de calibración. Para evaluar la linealidad de la curva de calibración se debe analizar el coeficiente de correlación simple lineal ( $r$ ), que representa la medida de asociación lineal entre las variables  $x$  e  $y$ , y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), que mide la bondad del ajuste realizado y permite decidir si el ajuste lineal es suficiente o se debe buscar otro modelo alternativo.

Una vez realizada la evaluación de asociación se debe determinar la curva de regresión lineal,  $y = b x + a$ ; esta ecuación permite conocer la pendiente de la curva y su ordenada al origen (QUATTROCCHI, 2015)

A la concentración mínima que puede reproducir el método de ensayo con un nivel aceptable de exactitud y precisión, se la denomina *límite de cuantificación*; éste se debe determinar midiendo diez estándares independientes del analito a analizar, que correspondan al primer punto de la curva, para lo cual hay que tener en cuenta que el máximo valor legislado del analito a ensayar esté incluido en el límite fijado. Sin embargo para el *límite de detección* se considera la menor magnitud que puede ser detectada como respuesta del método instrumental, pero no necesariamente cuantificada con un valor

exacto. Se determina diluyendo al cincuenta por ciento la concentración establecida para el límite de cuantificación.

Las series de datos obtenidos por la aplicación del método a validar deben permitir establecer los parámetros de repetitividad o precisión intermedia, considerando todo el *rango de trabajo* definido por el método; éste representa al intervalo de concentración en el que puede obtenerse la exactitud y la precisión adecuadas al objetivo del método; éste se confirma una vez obtenidos los resultados después de haberse llevado a cabo la validación (O.A.A, 2013).

Cuando el método se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos durante una misma sesión de trabajo en un período corto, se dice que se trabaja bajo las mismas condiciones de *repetitividad*, para lo cual se realizan una serie de lecturas repetidas de la misma concentración del analito y el estadístico que caracteriza a este estudio es la desviación estándar o en algunos casos el coeficiente de variabilidad. Sin embargo, si las determinaciones se realizan sobre la misma muestra homogénea pero en condiciones que aporten variabilidad como: diferentes días, materiales de vidrio y analistas se pueden obtener, a partir de ello, datos estadísticos de desviación estándar o coeficiente de variación que me permitan evaluar la *precisión intermedia*.

La *exactitud* es el parámetro que indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. Este parámetro refleja el error sistemático o la tendencia a él, a diferencia de la precisión que refleja el error aleatorio.

La prueba de t-Student es una herramienta estadística que permite evaluar si la exactitud cumple con el criterio de aceptación establecido en el programa de validación. Existen distintos diseños para definir experimentalmente la exactitud del método a ensayar; es habitual enriquecer por triplicado la muestra con una concentración conocida del analito y recuperar dicha concentración aplicando la curva de calibración del método (FABRO, 2015)

#### **1.2.4 Evaluación y aceptación de los parámetros de validación según los criterios de conformidad establecidos**

Es necesario establecer los criterios de conformidad cuando se elabora un programa de validación; éstos se definen como el valor o requisito asignado para establecer el cumplimiento de los parámetros de calidad definidos con anterioridad. La decisión de la aceptación o no de dichos parámetros se basa en la evaluación de los mismos a partir de herramientas estadísticas, de estudios bibliográficos y/o de normativas vigentes y en algunos casos en el historial de prácticas de los laboratorios especializados en métodos de validación. Existen ejemplos que sirven de guía tales como la teoría de Kolthoff y Hortwitz, que reportan tablas para establecer el coeficiente de variación máximo aceptable de un método analítico en función del porcentaje del analito en la muestra.

Para el estudio de la precisión intermedia, se analiza el coeficiente de variación que debe ser igual o mayor que el obtenido en el estudio de repetibilidad, ya que esta práctica presenta menor fuente de error para la misma cantidad o concentración del analito. Es importante una vez definidos exhaustivamente todos los parámetros o criterios de calidad en el programa de validación incluir de forma clara el cumplimiento de éstos a través de los criterios de aceptación (FABRO, 2015).

### **1.3 Incertidumbre**

La incertidumbre es el parámetro asociado al resultado de una medida que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mesurando.

En análisis químico, el mesurando se refiere al analito o a la propiedad que estamos determinando, por lo tanto éste debe interpretarse correctamente para considerar todas las fuentes de incertidumbre asociadas al análisis.

Hoy en día cada vez es más importante que los resultados analíticos vayan acompañados de su incertidumbre, debido a que el resultado de una medición es sólo una aproximación o estimación del valor verdadero y está completo cuando va acompañado por la incertidumbre de esta estimación. El conocimiento de ésta implica un aumento de la confianza en la validez del resultado de una medición (MAROTO, 2002).

### **1.3.1 Error e incertidumbre**

El error y la incertidumbre están relacionados entre sí, ya que la incertidumbre debe considerar todas las posibles fuentes de error del proceso de medida; pero hay diferencias importantes entre ambos conceptos. Si diferentes analistas realizan una misma determinación analítica para una muestra de forma repetida, cometen un error diferente cada uno de ellos en cada repetición realizada. Sin embargo, la incertidumbre de todos los resultados obtenidos es siempre la misma ya que se utiliza el mismo método analítico. Por lo tanto, si la incertidumbre se ha calculado para un método puntual y un tipo de muestra determinado, todos los resultados obtenidos para todas las muestras de ese tipo, que se analicen con ese método, tendrán la misma incertidumbre pero no tienen por qué tener el mismo error asociado. Existen diferentes componentes de errores, que se pueden cometer en el momento de la validación del método seleccionado. Los errores aleatorios se originan por variaciones impredecibles de las variables estudiadas; estos efectos no se pueden corregir pero sí disminuir incrementando el número de observaciones. Sin embargo los errores sistemáticos, como equipos mal calibrados o como vidrios dilatados por calentamiento entre otros, son parte del error total que permanece más o menos constante a lo largo de una serie de mediciones del mismo mensurando; estos son independientes del número de mediciones, pero se pueden corregir si se conoce su efecto sobre el resultado de la medición (FABRO, 2015).

### **1.3.2 La incertidumbre de medida**

La incertidumbre se centra en el rango de valores que el analista cree que puede ser atribuido razonablemente al mensurando.

Al estimar la incertidumbre global puede ser necesario tomar cada fuente de incertidumbre y tratarla de forma separada para obtener la contribución de esa fuente particular. Cada una de las contribuciones separadas a la incertidumbre es un componente y existen dos tipos de evaluaciones para su estudio, la tipo A y la tipo B.

La tipo A se relaciona con los errores aleatorios y pueden ser evaluados a partir de distribuciones estadísticas de serie de resultados, que pueden caracterizarse por

desviaciones estándar (EURACHEM/CITAC, 2016). La tipo B, se evalúa mediante un procedimiento distinto al análisis estadístico de una serie de observaciones. En este caso, la estimación de la incertidumbre se basa en otros conocimientos científicos, tales como fuentes de información externa u obtenida por experiencia; éstas pueden ser: certificados de calibración, manuales del instrumento de medición, especificaciones de fabricación del instrumento, Normas o literatura, valores de mediciones anteriores o conocimiento sobre las características o el comportamiento del sistema de medición, entre otros (FABRO, 2015).

Si se realiza la estimación mediante la propagación de errores con base en las incertidumbres individuales, y se suman cuadráticamente estamos calculando la *incertidumbre combinada* " $\mu_{c(y)}$ ", si la base de las incertidumbres individuales es la estándar, se la denomina incertidumbre combinada estándar. Sin embargo, para la mayor parte de los propósitos en química analítica se debe utilizar la *incertidumbre expandida* "U", la cual proporciona un intervalo en el que se cree que está el valor del mensurando con un mayor nivel de confianza. La incertidumbre expandida se obtiene multiplicando la incertidumbre estándar combinada o incertidumbre combinada, por un factor de cobertura k. La elección del factor k se basa en el nivel de confianza que se desea. Para un nivel aproximado de confianza del 95%, k es igual a 2 (EURACHEM/CITAC, 2016).

Para calcular la incertidumbre estándar a partir de la expandida, de un componente como fuente de incertidumbre individual, se debe adoptar una distribución de probabilidad. Se puede asociar a una *distribución normal* cuando los resultados de una medición repetida, afectada por una o más magnitudes de influencia aleatoria, siguen generalmente una buena aproximación a una distribución normal; como el caso de los certificados de calibración que presentan valores de incertidumbre expandida "U". Para obtener a partir de ellos la incertidumbre estándar se debe dividir "U" por el factor de cobertura k. Sin embargo, si se asocia a una *distribución rectangular* responde a que cada valor de un intervalo dado tiene la misma probabilidad de ocurrencia. La función de probabilidad es constante en este intervalo, entonces para obtener la incertidumbre estándar se debe dividir "U" por  $\sqrt{3}$ . Cuando hay evidencia de que la probabilidad es más alta para los

valores del centro del intervalo y se reduce hacia los límites, es adecuado basar la estimación de la incertidumbre en una *distribución triangular*. Para obtener la incertidumbre estándar a partir de la incertidumbre expandida "U" hay que dividir "U" por  $\sqrt{6}$  (FABRO, 2015).

A continuación la figura 8 representa las diferentes distribuciones de probabilidad anteriormente detalladas.

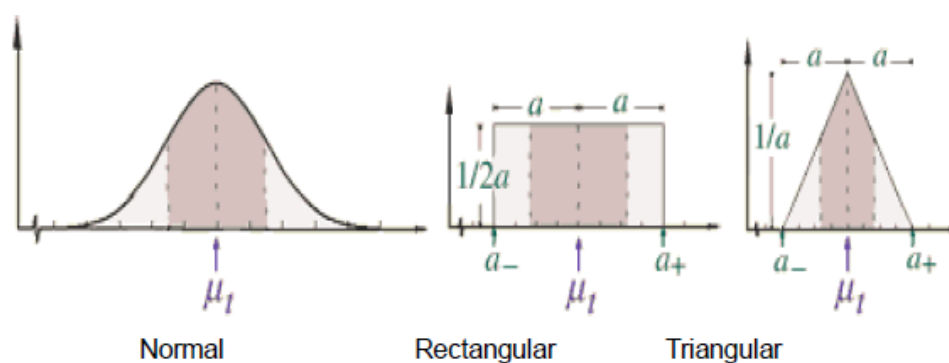


Figura 8: Distribución de probabilidad. (Mabel Fabro, 2015).

Para el análisis de la incertidumbre se deben evaluar las distintas contribuciones a la misma, se identifican todas las posibles fuentes de incertidumbre asociadas con el proceso de medición, incluido el estudio de los resultados de precisión y exactitud o veracidad.

### 1.3.3 Incertidumbre y exactitud

La exactitud de un resultado se define como el grado de concordancia entre el valor medio medido, obtenido a partir de una serie de resultados de ensayo, y un valor de referencia aceptado. La incertidumbre y la exactitud están muy relacionadas entre sí ya que, si no se ha verificado la exactitud de un resultado, no se puede garantizar que se hayan corregido todos los posibles errores sistemáticos del mismo y, por lo tanto, es imposible asegurar que el intervalo *valor estimado  $\pm$  Incertidumbre* contenga al valor considerado verdadero con una determinada probabilidad (FABRO, 2015).

Por lo tanto, al expresar un resultado analítico como *valor estimado  $\pm$  Incertidumbre*, el analista debería verificar que el *Valor estimado* no contenga un error sistemático.

#### **1.3.4 Incertidumbre y precisión**

La precisión intermedia de una serie de resultados tiene en cuenta la variabilidad de los mismos debido a las condiciones en que se hace el análisis, tales como día de ensayo, ensayos por duplicados, diferentes analistas, o como la calibración del equipo instrumental. Sin embargo, la incertidumbre no solamente incluye esta variabilidad sino que también debe incluir el error asociado a la estimación de los errores sistemáticos. Esto hace que la incertidumbre siempre sea mayor que la variabilidad de los resultados debida a la precisión intermedia. Es decir que cuanto más preciso es el método menor es la incertidumbre de los resultados (MAROTO, 2002).

#### **1.3.5 Proceso de estimación de la incertidumbre de medida**

Para obtener la estimación de la incertidumbre de medida asociada a un resultado, existen una serie de pasos relacionados con los datos obtenidos durante el estudio de la validación. Hay diferentes guías que se pueden consultar para calcular la incertidumbre, una de ellas es la Guía para la Expresión de Incertidumbres de la Medición (G.U.M.) que muestra un diagrama de varios pasos a seguir para completar el proceso de estimación y otra es la Adecuación al uso de los métodos analíticos (EURACHEM/CITAC) que cita un esquema que consta una serie de ítems que están agrupados en cuatro etapas. Esta última es una guía práctica y clara; por lo tanto se eligió de referencia para el presente trabajo. Las etapas se detallan a continuación.

##### **1.3.5.1 Etapa I: Especificación del mesurando**

En esta etapa se debe escribir una declaración sobre qué es lo que se va a medir, incluyendo la relación entre el mesurando y las magnitudes de entradas. *La especificación del mesurando* requiere una declaración clara y sin ambigüedades de lo que se va a medir, y una expresión cuantitativa que relacione el valor del mesurando con los parámetros de los que depende. Se debe tener en cuenta el tipo particular de magnitud que se va a medir, el material que se va a analizar y, si es necesario, adjuntar información adicional sobre la posición en el objeto de ensayo.



### **1.3.5.2 Etapa II: Identificación de las fuentes de incertidumbre**

En esta etapa se debe realizar una exhaustiva lista de *fuentes de incertidumbre*. Esto incluirá las fuentes que contribuyen a la incertidumbre de los parámetros asociados a su valor especificado en la etapa I; pero debe incluir otras fuentes no relacionadas al mesurando como por ejemplo tiempo y temperatura. El diagrama de causa y efecto o llamado también espina de pescado es una forma de listar las fuentes de incertidumbre; este muestra cómo se relacionan entre ellas e indica su influencia sobre la incertidumbre del resultado. A menudo se utilizan en la evaluación de las necesidades para ayudar a ilustrar y/o reflejar las relaciones existentes entre varias causas potenciales (o reales) de un problema de rendimiento. Los diagramas permiten un análisis en profundidad, evitando así dejar de lado las posibles causas de una necesidad (o sea las diferencias entre resultados esperados y reales). Esta técnica es fácil de aplicar y crea una representación visual clara sobre las categorías de causas y necesidades. La ventaja que presenta la aplicación del diagramas de causa y efecto sobre la incertidumbre es la de poder visualizar de forma clara todas las posibles fuentes de error que contribuyen con la misma, sin dejar pasar a ninguna de ellas por alto. Sin embargo, para el caso en el que se presente un número mayor de fuentes de incertidumbre en el análisis de la estimación, este diagrama puede resultar poco claro y se debe tomar la decisión de utilizar otro sistema de identificación de fuentes de incertidumbres más apropiado (MAROTO, 2002).

Es también habitual en química analítica considerar incertidumbres asociadas con elementos del desempeño global del método, tales como la precisión y la exactitud. Otras fuentes típicas que se consideran son el tipo de muestreo, las condiciones de almacenamiento, los efectos instrumentales, la pureza de los reactivos, el efecto de las muestras y el modelo de línea recta de una curva de calibración, entre otros (EURACHEM/CITAC, 2016).

### **1.3.5.3 Etapa III: Cuantificación de la incertidumbre**

Una vez identificadas las fuentes de incertidumbre, el siguiente paso es la *cuantificación de la incertidumbre* asociada a ellas; se debe evaluar las mismas de forma individual y

finalmente combinar, o se debe determinar directamente la contribución combinada a la incertidumbre de los resultados, usando los datos proporcionados por el método en estudio.

Para evaluar la incertidumbre es importante saber que no todos los componentes tendrán una contribución significativa a la combinada; en la práctica es probable que solo un pequeño número de ellos la tengan. Se debe hacer una evaluación de la contribución preliminar de cada componente o de la combinación de ellos y los que no sean significativos deben ser eliminados. (FABRO, 2015).

#### 1.3.5.4 Etapa IV: Cálculo de la incertidumbre combinada y expandida

Antes de combinar todas las contribuciones de la incertidumbre, las mismas deben estar expresadas como incertidumbres estándar. Para calcular la *incertidumbre estándar combinada*, la forma del término diferencial de la expresión matemática general determina si las fuentes de incertidumbres son combinadas como varianza simple o varianza relativa. Si el modelo de ecuación contiene solo adiciones o subtracciones, se deben usar las incertidumbres absolutas o estándar y combinarlas como varianza simple.

$$u_c(y(p, q, \dots)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots}$$

La *incertidumbre absoluta* " $\Delta A$ " se define como, dada una medida experimental de una magnitud,  $a$ , y una incertidumbre absoluta  $\Delta A$ , el valor verdadero,  $A$ , debe estar contenido con razonable certeza, es decir con mayor probabilidad, dentro del siguiente intervalo

$$a + \Delta A \geq A \geq a - \Delta A.$$

Sin embargo, si la ecuación contiene sólo multiplicaciones o divisiones, se deben usar las incertidumbres relativas y combinarlas como desviaciones estándares relativas.

$$u_c(y) = y \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \dots}$$

La *incertidumbre relativa* " $u_r$ " es el cociente entre la incertidumbre absoluta y la unidad de medida,  $a$ ; ésta es un valor adimensional que nos informa de la precisión de la medida,

$$u_r = \Delta A/a$$

Si el modelo de ecuación contiene combinaciones de sumas y/o diferencias, productos y/o cocientes, la incertidumbre relativa se calcula combinando las reglas anteriormente mencionadas.

Se puede considerar que los valores de las incertidumbres que son menores a 1/3 de la total, no contribuyen significativamente a la combinada y pueden ser descartadas.

En la etapa final se debe multiplicar la incertidumbre estándar combinada por el factor de cobertura escogido para obtener la *incertidumbre expandida*, la cual se requiere para proporcionar un intervalo que se espere que comprenda una gran fracción de la distribución de valores y estos puedan ser atribuidos razonablemente al mesurando.

El avance de la metrología analítica y de los sistemas de calidad en los últimos años está disminuyendo el riesgo del mal uso del concepto de incertidumbre.

Los químicos están siendo apremiados a reportar el cálculo de la incertidumbre de sus mediciones. La misma debe ser expresada de manera simple, clara y de forma internacionalmente aceptada (G.U.M, 2000).

#### **1.4 Objetivo de la tesis de grado**

Esta tesis pretende desarrollar un programa fácilmente aplicable para la validación de la determinación del ión nitrito en aguas, y estimar la incertidumbre de la metodología a partir del mismo. Para realizar la validación se requiere definir ciertos parámetros y criterios, basados en evidencias objetivas y en el cumplimiento de éstos.

La metodología para el cálculo de la estimación de la incertidumbre se basa en aprovechar la información generada en el programa de validación, teniendo en cuenta las posibles fuentes de incertidumbre halladas durante el proceso de la realización del método en estudio. Una vez obtenido el cálculo de la misma, es necesario aplicarlo a los resultados del método, haciendo que los mismos sean seguros y confiables.

Para cumplir la finalidad del presente trabajo, se han planteado los siguientes objetivos:

- Validar el método 4500-B, aprobado por el Comité de Standard Methods revisión 2011, que desarrolla y cita la metodología oficial para la determinación de ión nitrito en aguas no coloreadas, con una concentración del ión entre 0,084 y 0,657 mgL<sup>-1</sup>.
- Realizar el cálculo para la estimación de incertidumbre expandida para el método seleccionado en la validación y evaluar si la misma puede ser razonablemente atribuida al mesurando, teniendo en cuenta los valores de ión nitrito analizados en muestras de agua para consumo.

### **1.5 Hipótesis del trabajo**

De acuerdo al estudio de investigación realizado el presente trabajo se plantea como hipótesis que “Es posible determinar la concentración del ión nitrito en agua no coloreada, con un contenido de nitrito entre 0,084 y 0,657 mgL<sup>-1</sup>, mediante el método 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> B colorimétrico por espectrofotometría uv-visible, citado en el Standard Methods.”

## *Capítulo II: Materiales y métodos para la validación*



## 2. Planificación y desarrollo del procedimiento de validación

### 2.1 Introducción

El procedimiento de validación se debe planificar y estudiar rigurosamente antes de llevar a cabo su ejecución. El material bibliográfico y las normas de control son las bases para su desarrollo. Es importante evaluar, verificar y revisar cada etapa del proceso, durante su elaboración, para asegurar el éxito de su aplicación y dejar documentado con evidencias cada punto con sus modificaciones y ensayos realizados.

Un procedimiento exitoso es aquel que permite a cualquier analista del laboratorio, reproducir en la práctica su contenido para obtener resultados confiables y seguros.

### 2.2 Planificación para el procedimiento de validación

En la planificación de un procedimiento de validación se debe estudiar cada etapa y realizar un esquema de las mismas indicando los objetivos a alcanzar en concordancia a los objetivos del trabajo y el tiempo estimado para su ejecución. A continuación se muestra la planificación para la validación del método colorimétrico 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - B, que se encuentra publicado en el Standard Methods.

PLANIFICACIÓN PARA EL DESARROLLO DEL PROCESO DE VALIDACIÓN											
Etapas	Tiempo planificado: Meses										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Busqueda y actualización bibliografica	x	x									
Adquisición de insumos y acondicionamiento de equipos		x	x								
Aplicación del método seleccionado y realización de la curva de calibración				x							
Evaluación de la metodología seleccionada				x							
Preparación de muestras y de blanco para los ensayos de validación del método y evaluación de los parámetros					x	x	x				
Evaluación estadística de los parámetros de validación							x	x			
Evaluación estadística de la incertidubre del método a validar								x	x		
Correcciones y toma de desiciones según los resultados obtenidos										x	
Conclusiones y redacción del procedimiento de validación											x

Figura 9: Cronograma de actividades para la planificación y desarrollo del procedimiento de validación.

## **2.3 Desarrollo del procedimiento de validación**

Es importante para el desarrollo de un procedimiento de validación dejar evidencias en una primera etapa de la justificación de la selección del método a validar.

Esta etapa debe ser respaldada por normativas específicas que avalen las razones perseguidas por la metodología, es decir el impacto del analito en la humanidad.

Se presentaron evidencias, anteriormente mencionadas, de que el ión nitrito en agua se vuelve tóxico, en concentraciones mayores a las legisladas, causando un efecto nocivo sobre la salud humana, razón suficiente para la justificación de la validación del método normalizado colorimétrico 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-B seleccionado. El Código Alimentario Argentino establece como límite máximo un valor de 0,10 mgL<sup>-1</sup> de ión nitrito en aguas destinadas para consumo.

Los expertos del Comité Mixto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (F.A.O) y la Organización Mundial de la Salud (O.M.S) en la actualidad han fijado la dosis diaria admisible para el ión nitrito en 0,113 mgKg<sup>-1</sup> corporal. El agua no es la única fuente en la que normalmente consumimos el ión nitrito está presente también en vegetales, carnes, conservas y chacinados.

Una vez que se tiene en cuenta los aspectos normativos, se debe proceder a desarrollar la metodología seleccionada.

### **2.3.1 Materiales y Métodos**

La finalidad de la metodología analítica seleccionada es la determinación de nitrito en aguas no coloreadas publicada en el Standard Methods; dicha técnica es la colorimétrica 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - B. Es importante aclarar que con el método mencionado se va a estudiar determinar concentraciones de nitrito entre 0,084 mgL<sup>-1</sup> y 0,657 mgL<sup>-1</sup>, para probar la hipótesis del presente trabajo.

El ión nitrito se determina por la formación de una solución coloreada azo púrpura rojiza, producido a pH 2,0 a 2,5 por acoplamiento de sulfamida diazotizada con clorhidrato de N-(1naftil)-etilendiamina (diclorhidrato de NED).

Se debe acondicionar la muestra para la aplicación de la técnica, si presenta sólidos en suspensión, se debe filtrar a través de un filtro de membrana de 0,45 µg de poro y si el pH de la misma no estuviera comprendido entre 5 y 9, ajustar a ese valor con ácido clorhídrico 1N o hidróxido de amonio según convenga. Para conservar la muestra a corto plazo, de 1 o 2 días máximo, se debe congelar la misma a -20°C o conservar a 4°C en refrigeración.

Para la ejecución de los ensayos se utilizó como droga patrón nitrito de sodio de alta pureza (≥ 98 %), disuelto en agua de grado 3 según I.S.O 3696 que la define como, adecuada para la preparación de soluciones esta puede ser obtenida por destilación simple, desionización o por osmosis inversa y debe ser usada para trabajos analíticos de rutina.

El listado de materiales, equipos y preparación de soluciones utilizadas y la valoración de las mismas, puede consultarse en los puntos 1 y 2 del anexo I.

#### **Preparación de las soluciones de nitrito que darán origen a la curva de calibración.**

a) *Preparación de la solución madre de nitrito, donde un mL equivale a 0,8214 mg de  $\text{NO}_2^-$ .*

Para la preparación de la solución madre, se utilizó una balanza analítica con una precisión de 0,001 g marca Sartorius. Esta balanza esta verificada bajo el sistema de control de metrología legal, lo que asegura que la pesada es correcta. Se pesó la cantidad de 1,232 g de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) de alta pureza, luego se llevó a 1000 mL en un matraz calibrado con agua destilada. Para aumentar el tiempo de su conservación se agregó 1 mL de cloroformo.





Figura 10: Balanza analítica marca Sartorius.

Se estandarizó la solución madre preparada; se colocó en un erlenmeyer 50 mL de la solución de permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) 0,05 N y se agregó 5 mL de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), finalmente se incorporó 50 mL de solución madre de nitrito. Se agitó suavemente y se calentó entre 70-80 °C sobre placa calentadora, controlando con un termómetro calibrado dicha temperatura. Para eliminar la coloración de permanganato de potasio se agregó 2 porciones de 10 mL de la solución (0,05 N) de oxalato de sodio ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ).

Una vez decolorado el permanganato de potasio, se tituló el exceso de oxalato de sodio con la solución 0,05 N de permanganato de potasio hasta el punto final rosa pálido gastando 8 ml.

Paralelamente se preparó un blanco, con agua destilada en lugar de la solución madre y se realizó el procedimiento tal cual se explicó anteriormente. Se tuvo en cuenta el gasto del mismo, para hacer las correcciones necesarias en el cálculo final de la estandarización.

Figura 11



Figura 12



Figura 11 y 12: Representan la estandarización de la solución madre de nitrito de sodio preparada

Figura 13



Figura 13: Representa el punto final de la titulación

En el punto d del anexo I se encuentra detallada la ecuación para el cálculo de la valoración de la solución madre de nitrito (A) expresada en  $\text{mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$  que posteriormente se convirtió a  $\text{mgL}^{-1}$  de nitrito, para poder evaluar los resultados respecto al especificado en el Código Alimentario Argentino.

Una vez preparada y estandarizada la solución madre de nitrito; ésta se utilizó para la preparación de la solución intermedia.

b) *Preparación de la solución intermedia de nitrito, donde un mL equivale a 0,164 mg de  $\text{NO}_2^-$*

En primer lugar se calculó cuantos mL de la solución madre necesito medir para preparar la solución intermedia utilizando la formula,  $G=12,5/ (A)$ . El valor de G representa al volumen necesario para preparar 250 mL de solución intermedia de nitrito.

$$G=12,5/ 0,2443 \text{ mg NL}^{-1}$$

**G= 51 ,2 mL**

Una vez conocido el volumen a medir de solución madre, se lo colocó en un matraz calibrado de 250 mL y se llevó a volumen con agua destilada.

c) *Preparación de la solución de trabajo de nitrito, donde un mL equivale a 0,0164 mg de  $\text{NO}_2^-$*

La solución de trabajo se preparó a partir de la solución intermedia de nitrito; se midió 10 mL con una pipeta calibrada de doble aforo en un matraz calibrado de 1000 mL de capacidad, el cual se llevó a volumen con agua destilada libre de nitrito.

### **Preparación de los patrones de nitrito para la curva de calibración**

La curva de calibración permite calcular la concentración de nitrito, expresada en  $\text{mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$ , presente en la muestra de forma directa.

Para preparar la curva de calibración se estableció en una primera instancia el rango de la misma, es decir los puntos máximos y mínimos, de manera que el valor límite establecido por el Código Alimentario Argentino para agua potable quede comprendido en él. Por lo tanto, se utilizaron distintas concentraciones de patrones estableciendo cuatro puntos: 0,084 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup>; 0,164 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup>; 0,328 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup> y 0,657 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup> dichos puntos se prepararon como se describe a continuación:

Para preparar la concentración de 0,084 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup>, se midieron 5,2 mL de solución de trabajo con una pipeta automática calibrada y se diluyó a 1000 mL en un matraz calibrado con agua destilada. Para el punto de la curva que representa a 0,164 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup>, se preparó 10 mL de solución de trabajo con pipeta doble aforo calibrada y se diluyó a 1000 mL en un matraz calibrado con agua destilada. Para preparar la concentración de 0,328 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup>, se tomó 20 mL de solución de trabajo con pipeta doble aforo calibrada y se diluyó a 1000 mL en un matraz calibrado con agua destilada y por último el punto más alto de la curva que representa el 0,657 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup>, se preparó midiendo 40 mL de solución de trabajo con pipeta de 20 mL doble aforo calibrada y se diluyó a 1000 mL en un matraz calibrado con agua destilada. En todos los casos en que se utilizó agua destilada se verificó que la misma estuviese exenta de nitrito.

Una vez preparadas las distintas concentraciones correspondientes a cada punto de la curva, se tomó 50 mL de cada una de ellas y se les agregó 2 mL del reactivo colorante. Se homogeneizó bien para asegurar la formación de la solución coloreada azo púrpura rojiza. La siguiente figura muestra la escala colorimétrica de los cuatro puntos de la curva de calibración.



Figura 15: Coloración adquirida en la preparación de los cuatro puntos de la curva de calibración, de derecha a izquierda:  $0,084 \text{ mg NO}_2\text{L}^{-1}$ ;  $0,164 \text{ mg NO}_2\text{L}^{-1}$ ;  $0,328 \text{ mg NO}_2\text{L}^{-1}$  y  $0,657 \text{ mg NO}_2\text{L}^{-1}$  luego de formación de la solución coloreada azo púrpura rojiza.

### **Medidas espectrofotométricas**

Para realizar las medidas espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro uv-visible marca Shimatzu, que presenta un paso óptico de un centímetro. El equipo realiza un checklist completo de su funcionamiento antes de empezar a trabajar, comparando los resultados de los controles con parámetros previamente estandarizados. Para su control interno, el responsable del equipo debe realizar controles de medición semestrales mediante el uso de un material de referencia específico, además anualmente se solicita el control externo a un proveedor calificado para ello. Antes de efectuar la validación del método se debe realizar los controles de limpieza del compartimento, asegurándose que el mismo se encuentre en condiciones óptimas de trabajo.

Para la medición se utilizó cubetas de vidrio de 1 cm de espesor que debieron ser controladas previamente a la lectura. La verificación de las mismas es un control importante y se basa en colocar agua destilada en ellas y se las debe medir a una longitud de onda de 543 nm, que es la utilizada en la metodología en estudio. Como criterio se

estableció que dichas cubetas no deben presentar entre ellas diferencias superiores a 0,01 unidades de absorbancia.

Para proceder a la lectura de los patrones, se programó el equipo para leer a una absorbancia de 543 nm, la lectura de los patrones se debe efectuar entre 10 minutos y dos horas después de añadir el reactivo de color, y se compararon frente a un blanco de 50 mL de agua destilada libre de nitrito que fue tratado igual que los patrones de la curva de calibración. El tiempo que detalla el método para dejar las muestras y/o patrones en contacto con el reactivo colorante se probó, para asegurar que este no influye ocasionando errores en los resultados finales; los cuales pueden consultarse en el punto 5 del anexo I.

En el caso de las medidas espectrofotométricas de las muestras se debe proceder de igual forma teniendo en cuenta las mismas precauciones que las descritas en la lectura de los patrones de la curva de calibración. Los patrones de la curva de calibración se midieron por triplicado. Cuando el valor de absorbancia supera el límite máximo del rango lineal de la curva de calibración, se debe hacer una dilución adecuada y repetir el ensayo.

Es importante verificar la curva de calibración para asegurarnos que los resultados obtenidos a partir de ella sean confiables. Esto se aconseja realizarlo cada día que se realiza la determinación, para lo cual se debe utilizar un patrón de nitrito de sodio diferente al utilizado en la preparación de la curva, y se realiza la misma metodología detallada anteriormente. El criterio de aceptación que se tiene en cuenta para la verificación de la curva de calibración es de dos veces la desviación estándar  $2s$ . En el caso que la verificación no sea aceptable, se prepara una segunda solución del patrón de nitrito de sodio y se repite la verificación, si la segunda verificación no cumple el criterio de aceptación, se procede a la realización de una nueva curva de calibración.

La figura 16 muestra el instrumental utilizado en el laboratorio para la medición según la técnica en estudio.



Figura 16: Espectrofotómetro uv-visible, marca Shimadzu.

### **Expresión de los resultados**

Los resultados de la concentración expresados en  $\text{mg NO}_2\text{L}^{-1}$  fueron calculados, a partir de la ecuación de la recta de calibración obtenida en la validación del método; la misma se encuentra detallada en el punto 3.1 del anexo I.

### **2.3.2 Definición de los parámetros de validación**

Existen diferentes guías de referencia que describen los criterios o parámetros, tales como La unión internacional de química pura y aplicada (I.U.P.A.C), Vocabulario internacional de metrología- conceptos básicos y general y términos asociados (I.S.O/I.E.C 99:2007) y Organismo Argentino de Acreditación (O.A.A.) entre otros.

A continuación se detallan cuáles fueron los parámetros elegidos y evaluados para llevar a cabo la validación del método, basados en las guías anteriormente mencionadas.

Los resultados de los mismos se encuentran expresados en detalle, en el capítulo 3 del presente trabajo, que se titula " Resultados y discusión de los parámetros establecidos para la validación".

### **Linealidad**

Para el estudio de la linealidad del método, se realizó la curva de calibración. Conjuntamente se determinó el rango lineal, que incluye al valor máximo establecido por

el Código Alimentario Argentino. Se prepararon cuatro soluciones de concentraciones conocidas a partir de la solución de trabajo de nitrito de sodio, las cuales fueron 0,084; 0,164; 0,328 y 0,657 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup>, se midió la absorbancia de cada una por triplicado y con los datos obtenidos se ajustó un modelo de regresión simple lineal, graficando en el eje de las ordenadas la variable dependiente (concentración en mgL<sup>-1</sup> de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y en las abscisas, la variable independiente (absorbancias). Para realizar el estudio de la linealidad se utilizó una planilla de cálculo de Microsoft Excel, a partir de la cual se obtuvieron los coeficientes de regresión lineal simple (r) y el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>); además se realizó el análisis de residuos estándares, los cuales deben estar comprendidos en un intervalo de confianza del 95% y se verificó la aleatoriedad de los residuos. Para evaluar la ecuación del modelo de regresión lineal propuesto  $y = \beta_0 + \beta_1 x$  se realizó una prueba de hipótesis aplicando la prueba "t".

Para el análisis de éste parámetro se estudiaron diferentes criterios de conformidad y aceptación basados en guías de referencia; para la curva de calibración se sugiere un valor de coeficiente de correlación (r) mayor a 0,980 y un coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) mayor a 0,990, basados en las diferentes guías (7); (20); (23).

### **Límite de cuantificación**

Para determinar el límite de cuantificación se midieron diez estándares independientes de nitrito de sodio cuya concentración corresponde al primer punto de la curva de calibración de 0,084 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup>. Se consideraron como guías de referencia las indicadas por DeSain, Martin-Smith y Rudd, (2010) los que sugieren que el coeficiente de variación porcentual de la repetitividad para el límite de cuantificación no debe superar al 2% y se debe asegurar que el valor asignado sea menor al del límite establecido por el Código Alimentario Argentino, que es de 0,1 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup> (7).



### **Límite de detección**

El límite de detección se determinó haciendo una dilución al 50% del estándar que corresponde al límite de cuantificación establecido ( $0,084 \text{ mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$ ). Se prepararon cinco estándares de  $0,045 \text{ mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$  y se midieron en el espectrofotómetro uv-visible.

Para la evaluación de este parámetro se utilizó una planilla de cálculo de Microsoft Excel y se establecieron como criterio de aceptación que el coeficiente de variación porcentual de la repetitividad no debe superar al 2%, basado en DeSain, Martin-Smith y Rudd (2010) y que el límite de detección siempre sea menor al límite de cuantificación. (7).

### **Precisión**

En la determinación de la precisión del método se eligió una concentración de nitrito de sodio en el rango lineal de la curva de calibración; esta corresponde a  $0,084 \text{ mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$ . Enriqueciéndose diez muestras de agua libre de nitrito de sodio. Las diez dosificaciones fueron medidas por espectrofotometría uv-visible y cuantificadas mediante la curva de calibración obtenida a partir del método en estudio.

Para evaluar este parámetro se utilizó una planilla de cálculo de Microsoft Excel con los datos de la repetitividad y precisión intermedia, además se estudiaron los diferentes criterios de conformidad y aceptación entre duplicados basados en guías de referencia como I.U.P.A.C basada en el empleo de el Test de Fisher y así reconocer si son estadísticamente semejantes ambas repeticiones, donde el F experimental puede ser menor o mayor al tabulado y DeSain, Martin-Smith y Rudd,( 2010) los que sugieren que el coeficiente de variación porcentual de la repetitividad no debe superar el 2% .

### **Exactitud**

En el estudio de la exactitud del método se prepararon tres ensayos a los cuales se adicionaron tres concentraciones distintas del patrón de nitrito de sodio a partir de la solución madre; éstas fueron de  $0,084$ ;  $0,164$  y  $0,383 \text{ mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$ . Todas las dosificaciones se realizaron sobre una muestra de agua destilada libre de nitrito de sodio.

El ensayo nº 1, se preparó a partir de la solución madre de nitrito de sodio de 0,840 mg  $\text{NO}_2^- \text{mL}^{-1}$ , se hizo una dilución 1:10 de la misma, con material de vidrio calibrado.

Para el ensayo nº 2, se preparó una solución madre de 0,328 mg  $\text{NO}_2^- \text{mL}^{-1}$ , se hizo una dilución 1:2 con material de vidrio calibrado y posteriormente se midió 1mL de esta solución enrasándose en un matraz de 1000 mL con agua libre de nitrito, para obtener una solución de 0,164 mg  $\text{NO}_2^- \text{L}^{-1}$ .

Por último se preparó el ensayo nº 3, para el cual se utilizó la solución madre de 0,76 mg  $\text{NO}_2^- \text{mL}^{-1}$  con la cual se hizo una dilución 1:2 con material de vidrio calibrado. Luego se agregó 1mL de la misma y se colocó en un matraz de 1000 mL, donde se efectuó el enrase con agua libre de nitrito, para obtener 0,383 mg  $\text{NO}_2^- \text{mL}^{-1}$ . Una vez preparados los ensayos se procedió a la lectura de los mismos en el equipo espectrofotómetro uv-visible, utilizando la curva de calibración del método en estudio para obtener los resultados de recuperación. Las lecturas se realizaron por triplicado para cada una de las concentraciones.

Al evaluar las recuperaciones, se realizó una prueba de hipótesis y se aplicó la prueba "t", se utilizó una planilla de cálculo de Microsoft Excel, para analizar los resultados obtenidos y establecer el criterio de aceptación a partir de la guía I.S.O/I.E.C 99:2007, y lo especificado por Fabro M., 2015 los cuales establecen una recuperación mayor al 98%. Los resultados se encuentran detallados en la tabla del anexo II.

A continuación se presenta un resumen de los criterios de conformidad y aceptación establecidos en el presente trabajo y como efectuar el análisis de los datos obtenidos para cada uno de los parámetros de validación analizados.

Tabla 1: Representa los criterios de conformidad y aceptación establecidos

CRITERIOS DE ACEPTACION								
Parámetros	¿Cómo?	Responsable	Plazos	Criterios de conformidad	Resultados	Conforme		Guía
						SI	NO	
Linealidad	Coefficiente de correlación (r)	Técnico	3 semanas	> 0,990	r = 0,998	x		O.A.A./Fabro,2015/ Quattrocchi
	Coefficiente de determinación (R <sup>2</sup> )			> 0,980	R <sup>2</sup> = 0,997	x		O.A.A./Fabro,2015
	Prueba de t			t <sub>exp</sub> > t <sub>tab</sub> pend≠ 0	t <sub>exp</sub> = 55,69 y t <sub>tab</sub> = 2,228	x		Esta dística
	Intervalo de confianza del intercepto			Debe incluir al cero	β <sub>0</sub> = -0,002 y β <sub>1</sub> = 1,077	x		Esta dística
Limite de cuantificación (LC)	Determinación de 10 estándares independientes	Técnico	1 día	cc < Lím. Lejislación	cc = 0,084 mgL <sup>-1</sup> < 0,1 mgL <sup>-1</sup>	x		C.A.A.
	cv %			< 2%		x		DeSain, Martin-Smith y Rudd
Limite de detección (LD)	Dilución al 50% del LC	Técnico	1 día	LD < LC	LD 0,045 mgL <sup>-1</sup> < LC 0,084 mgL <sup>-1</sup>	x		Fabro, 2015
	cv %			< 2%		x		DeSain, Martin-Smith y Rudd
Repetitividad	cv %	Técnico	2 días	< 2%	0,60%	x		DeSain, Martin-Smith y Rudd
Reproducibilidad (presición intermedia)	cv %	Técnico	2 días	< 2%	11%	x		DeSain, Martin-Smith y Rudd
	Test de fisher "F"	Técnico		F <sub>EXP</sub> < F <sub>TAB</sub>	0,64 < 3,18	x		IUOAC
Exactitud	Recuperación %	Técnico	1 día	> 92%recuperación	101%	x		Fabro, 2015/ISO/IEC Guide 99:2007
	Prueba de t		1 día	t <sub>exp</sub> < t <sub>tab</sub> %R=100%	t <sub>exp</sub> = y t <sub>tab</sub> = 2,31	x		Esta dística
Intervalo de trabajo	curva de calibración	Técnico	1 día	-	(0,084 - 0,657) mgL <sup>-1</sup>	x		Esta dística

## *Capítulo III: Resultados y discusión para la validación*



### 3. Evaluación de los parámetros establecidos para la validación del método colorimétrico 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - B publicado en el Standard Methods

Para evaluar los parámetros definidos en la validación del método se utilizaron herramientas estadísticas y guías nacionales e internacionales en vigencia. Se realizó un análisis completo de cada parámetro considerando los criterios de conformidad ya establecidos. A continuación se detallan los resultados y la discusión de los mismos.

#### 3.1 Determinación de la linealidad de la curva de calibración

Al determinar la linealidad del método se elaboró una tabla con las concentraciones medidas a partir de los patrones de nitrito, por espectrofotometría uv-visible, según las especificaciones detalladas en el capítulo anterior.

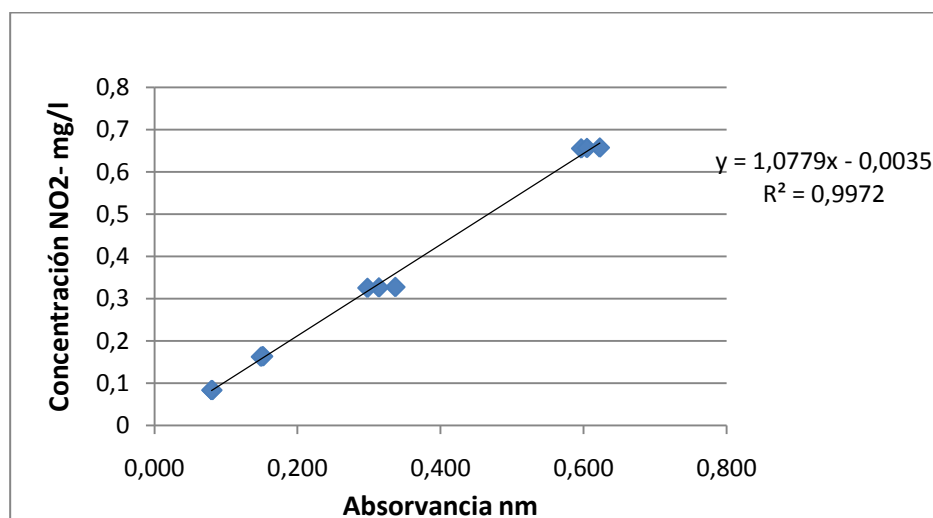
La siguiente tabla representa las doce lecturas de los cuatro patrones seleccionados que se midieron por triplicado.

Tabla 2: Resultados obtenidos del ensayo de linealidad para el ión NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en agua

N° lecturas	abs 542 nm	CC mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> L <sup>-1</sup>
1	0,080	0,084
2	0,081	0,084
3	0,080	0,084
4	0,152	0,164
5	0,149	0,163
6	0,151	0,164
7	0,337	0,328
8	0,314	0,327
9	0,298	0,326
10	0,597	0,656
11	0,605	0,657
12	0,623	0,658

Los resultados obtenidos se utilizaron para visualizar mediante un gráfico, el ajuste del modelo de regresión simple lineal, que se muestra a continuación.

Gráfico 1: Representa la curva de calibración del estándar de nitrito para cuatro niveles de concentración



El coeficiente de correlación simple lineal  $r = 0,998$  lo que indicó una alta asociación positiva entre las variables de absorbancia y la concentración de nitritos. Además cumple con el criterio de aceptación de ser mayor a 0,990, sugerido por las guías seleccionadas.

La ecuación del modelo de regresión simple lineal resultó  $y = 1,0779 x - 0,0035$ . Esta ecuación permite predecir valores de concentración en función a los valores de absorbancia entre los límites en que se hizo la determinación.

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para el ión nitrito fue de 0,997, esto indica que el 99,7 % de la variación de la variable *concentración de nitritos* (variable y) es explicada por el modelo y cumple con el criterio de los parámetros de validación establecidos, el cual debe ser mayor a 0,980.

Se estudió también que el intervalo de confianza del intercepto incluye al cero para cumplir con el requisito de proporcionalidad, como se exige para la Ley de Lambert-Beer en los métodos espectrofotométricos.

Tabla 3: Representa el intervalo de confianza que incluye al cero obtenido de planilla de cálculo Microsoft Excel

<i>confianza 95%</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
Intercepción	-0,017570758	0,01178133

Para evaluar la ecuación del modelo de regresión lineal propuesto se realizó una prueba de hipótesis sobre el parámetro del modelo  $\beta_1$ , es decir para la pendiente de la recta. Se

espera que la pendiente de la recta sea significativamente distinta de cero, ya que es esencial que los valores de "x" e "y" estén altamente correlacionados.

Se probó la hipótesis científica de que existe regresión simple lineal, por lo tanto se planteó:

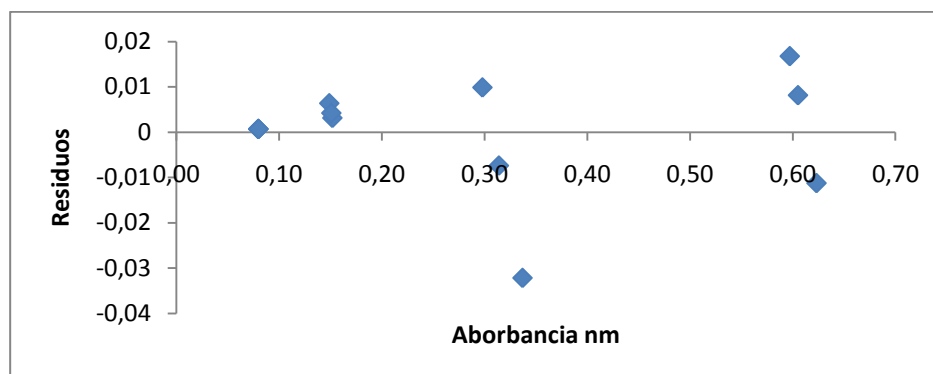
$$H_0 : \beta_1 = 0$$

$$H_1 : \beta_1 \neq 0$$

Con un  $\alpha = 0,05$  los resultados fueron  $t_{\text{muestral}} = 58,43$  y  $t_{\text{crítico}} = 2,228$ , es decir el  $t_{\text{muestral}} > t_{\text{crítico}}$  por lo que se rechaza la hipótesis nula. Esto explica que existe regresión simple lineal entre ambas variables (absorbancia y concentración), para las condiciones experimentales evaluadas. En el anexo I se puede consultar la tabla t-student en el apartado de tablas auxiliares.

También se realizó el análisis de los residuos demostrando que se distribuyen en forma aleatoria sin presentar tendencia alguna, como se muestra en el gráfico 2.

Gráfico 2: Diagrama de dispersión de los residuos vs la absorbancia del conjunto de datos completos



### 3.2 Determinación de él límite de cuantificación (LC)

Se estableció para el LC un valor de  $0,084 \text{ mgNO}_2\text{L}^{-1}$ , debido que es la menor concentración de la curva de calibración para la cual se evaluaron las diez repeticiones, teniendo en cuenta el coeficiente de variación de la repetitividad como criterio de aceptación que corresponde a un valor  $< 2\%$ . Además se debe cumplir con que el límite de cuantificación sea menor al legislado por el C.A.A. ( $0,1 \text{ mg NO}_2\text{L}^{-1}$ ). A continuación en la tabla 4 se puede observar los resultados finales obtenidos del ensayo para determinar el límite de cuantificación.

Tabla 4: Resultados obtenidos del ensayo de límite de cuantificación para el ión  $\text{NO}_2^-$  en agua

<b>Nº lecturas 10</b>	<b>ABS nm</b>	<b>CC mg <math>\text{NO}_2^- \text{L}^{-1}</math></b>
Media	0,0807	0,084
Desviación estándar	0,0009	0,00048
<b>CV %</b>	<b>1,2</b>	<b>0,6</b>

### 3.3 Determinación de él límite de detección (LD)

Se diluyó al 50 % la concentración establecida para el límite de cuantificación, y se obtuvo una concentración de  $0,045 \text{ mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$ , valor que se definió para el LD. Se prepararon cinco concentraciones y se midieron por espectrofotometría uv-visible. A continuación se muestran en la tabla 5 los resultados del estudio.

Tabla 5: Resultados obtenidos del ensayo de límite de detección para el ión  $\text{NO}_2^-$  en agua

<b>Nº lecturas 5</b>	<b>ABS nm</b>	<b>CC mg <math>\text{NO}_2^- \text{L}^{-1}</math></b>
Media	0,039	0,039
Desviación estándar	0,0038	0,0043
<b>CV %</b>	<b>9,8</b>	<b>11,0</b>

Como criterio de conformidad para este parámetro se estableció que el mismo debería cumplir con un coeficiente de variación para la repetitividad  $< 2\%$  para poder cuantificarlo. En la tabla 4, se pueden observar los resultados y que los mismos no cumplen con los criterios pre establecidos de ser  $< 2\%$ ; Se lo considera un punto que detecta pero no es reproducible, por lo tanto no se puede cuantificar pero sí cumple que el valor de su concentración debe ser menor al del límite de cuantificación.

### 3.4 Determinación de la precisión del método

La precisión del método se estableció a partir de la repetitividad y de la precisión intermedia del mismo. Los ensayos se pueden observar en detalle en el anexo II, en el apartado de precisión.

En una primer instancia se analizó el coeficiente de variación para el analista número uno en condiciones de trabajo del laboratorio. El valor obtenido fue del  $0,98\%$ , a partir de las lecturas de las diez dosificaciones de  $0,084 \text{ mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$ . A continuación se muestran en la tabla 6, los resultados finales del estudio para la repetitividad del método analítico.



Tabla 6: Resultados obtenidos del ensayo de repetitividad para el ión  $\text{NO}_2^-$  en agua

<b>Media ( mg <math>\text{NO}_2^- \text{L}^{-1}</math> )</b>	0,084
<b>Desviación estándar ( mg <math>\text{NO}_2^- \text{L}^{-1}</math> )</b>	0,0008
<b>CV %</b>	<b>0,98</b>

Además de la repetitividad se tuvo en cuenta el análisis de la precisión intermedia. El coeficiente de variación obtenido a partir de los valores de concentración de nitrito de las diez determinaciones efectuadas por el analista número uno y de las diez determinaciones realizadas por el analista número dos, bajo las mismas condiciones de trabajo en días diferentes, fue de 1,73 %. En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos del análisis de la reproducibilidad del método.

Tabla 7: Resultados obtenidos del ensayo de reproducibilidad para el ión  $\text{NO}_2^-$  en agua

<b>Media ( mg <math>\text{NO}_2^- \text{L}^{-1}</math> )</b>	0,084
<b>Desviación estándar ( mg <math>\text{NO}_2^- \text{L}^{-1}</math> )</b>	0,001
<b>CV %</b>	<b>1,73</b>

El coeficiente de variación fue aceptable ya que es menor al máximo establecido por DeSain, Martin-Smith y Rudd que es  $< 2\%$ .

Se evaluó el test de Fisher "F", siguiendo la guía de referencia de I.U.P.A.C, con un  $\alpha = 0,05$  para n-1 grados de libertad, los resultados fueron  $F_{(9,9;95)} = 3,18$  y  $F_{\text{experimental}} = 0,64$ . Esto explica que no hay diferencias estadísticas significativas entre ambas repeticiones, ya que el F experimental fue menor al F tabulado.

### 3.5 Determinación de exactitud del método

Para evaluar la exactitud se realizó una prueba de recuperación a partir de tres concentraciones conocidas de nitrito (0,084; 0,164 y 0,383  $\text{mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$ ) la preparación de las mismas están detalladas en el capítulo 2, inciso 2.3.2. Se midieron por triplicado cada una de ellas y se calculó el porcentaje de recuperación para el método analítico.

Los resultados del ensayo se observan a continuación en la tabla 8.

Tabla 8: Resultados obtenidos del ensayo de recuperación para el ión  $\text{NO}_2^-$  en una muestra enriquecida

Dosificación $\text{mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$	Recuperación (%R)
<b>Media</b>	<b>101</b>
DS	2,17
CV%	2,14

Mediante una prueba de hipótesis se comprobó que los valores de recuperación son cercanos al 100%. En dicha prueba se plantearon las siguientes hipótesis:

$$H_0: \mu\% R = 100 \%$$

$$H_1: \mu\% R \neq 100 \%$$

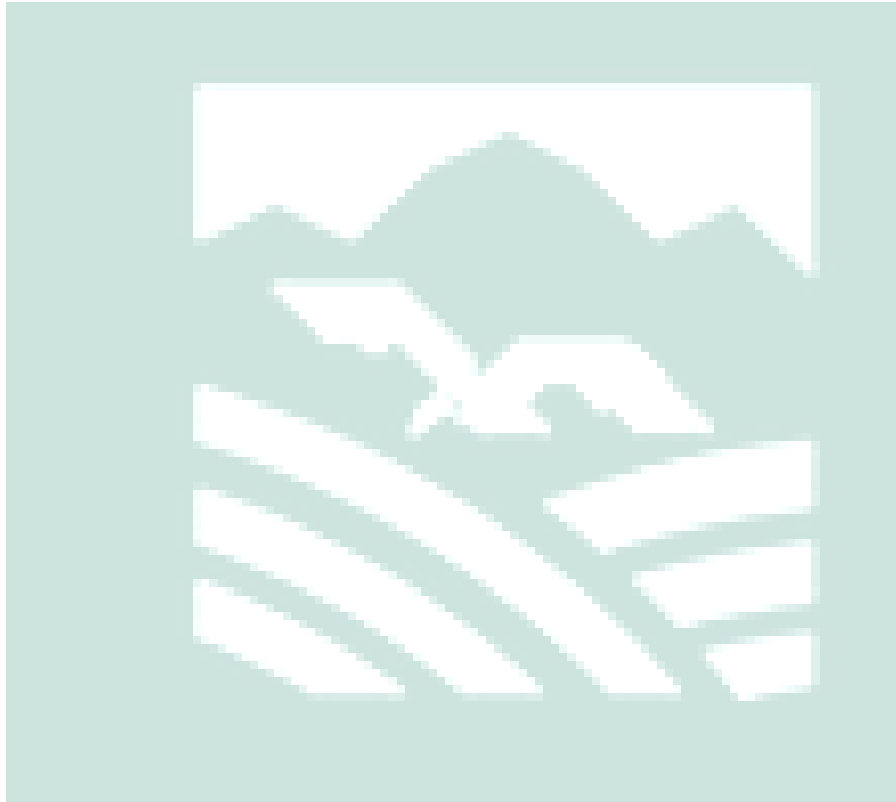
Se calculó un valor t experimental usando la ecuación citada en el anexo II, en el apartado de exactitud del mismo.

El  $t_{\text{experimental}}$  fue de 1,71 el cual resultó menor al  $t_{\text{tabular}}$  que fue 2,31, para n-1 grados de libertad,  $v_{n-1} = 8$  y  $\alpha/2 = 0,025$ . Entonces se acepta la hipótesis nula planteada y se concluye que el método presenta la exactitud requerida, es decir, se acepta el supuesto de que no existen diferencias significativas entre el valor medido y el 100 % de recuperación.

Los datos obtenidos para este ensayo se pueden consultar en la planilla de cálculo de Microsoft Excel, en el anexo II.

Una vez establecidos y evaluados los parámetros para la validación del método en estudio se continuó con la estimación de la incertidumbre del mismo.

## *Capítulo IV: Incertidumbre*



## 4. Introducción

En el presente trabajo se ha hecho referencia a la importancia de calcular la misma de los resultados. No obstante, el cálculo de la incertidumbre no es sencillo debido al elevado número de fuentes de error presentes en un procedimiento analítico. Existen varias aproximaciones y guías para calcularla.

### 4.1 Estimación de la incertidumbre

Para el cálculo de la incertidumbre se utilizó como guía el diagrama de proceso citado en EURACHEM/CITAC y se estableció cuatro grandes etapas que facilitaron el proceso de estimación.

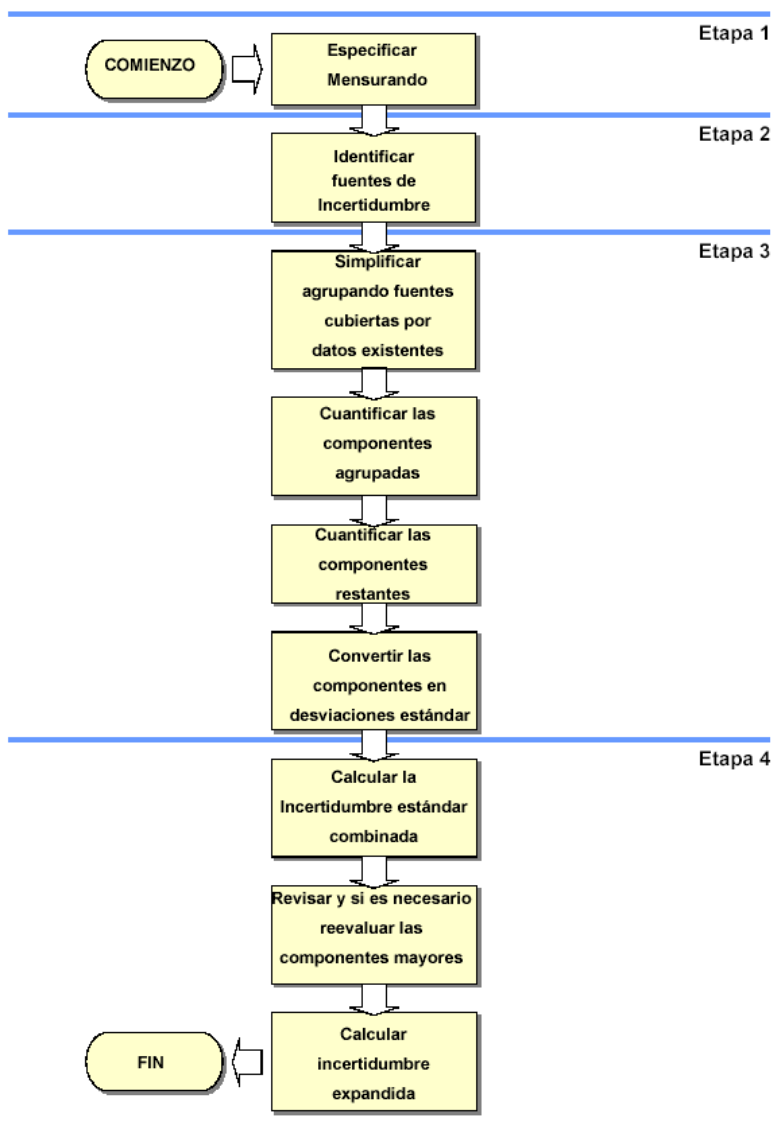


Figura 17: Esquema del proceso de la estimación de la incertidumbre (EURACHEM/CITAC guide 2016).

#### 4.1.1 Etapa I: Especificación del mesurando

Se estableció que el modelo que vincula las variables fue la determinación de la concentración de nitrito en aguas no coloreadas en asociación con la absorbancia medida en las distintas muestras. El modelo de medición fue el espectrofotométrico que responde a la Ley de Lambert- Beer.

$$\text{Concentración de NO}_2^- \text{ mgL}^{-1} = \text{valor mgL}^{-1} \text{ medido} \pm \text{correcciones}$$

#### 4.1.2 Etapa II: Identificación de las fuentes de incertidumbre

Para la identificación de las fuentes de incertidumbre se aplicó el diagrama de causa y efecto, conocido como diagrama de causa y efecto o diagrama de espina de pescado.

Como primer paso se describió en forma breve y clara la problemática a analizar, luego se identificó las categorías o causas que se consideraron importantes en el método; se propusieron tantas como fueron posibles. Una vez que se identificaron las principales procedemos a preguntarnos; ¿Por qué ha surgido determinada causa principal? Esto nos permitió identificar las causas secundarias que surgieron a partir de las principales.

Se elaboró un diagrama en tres pasos:

**Paso n° 1:** Se estudió la valoración de las soluciones, preparación de la solución intermedia y preparación de la solución madre.

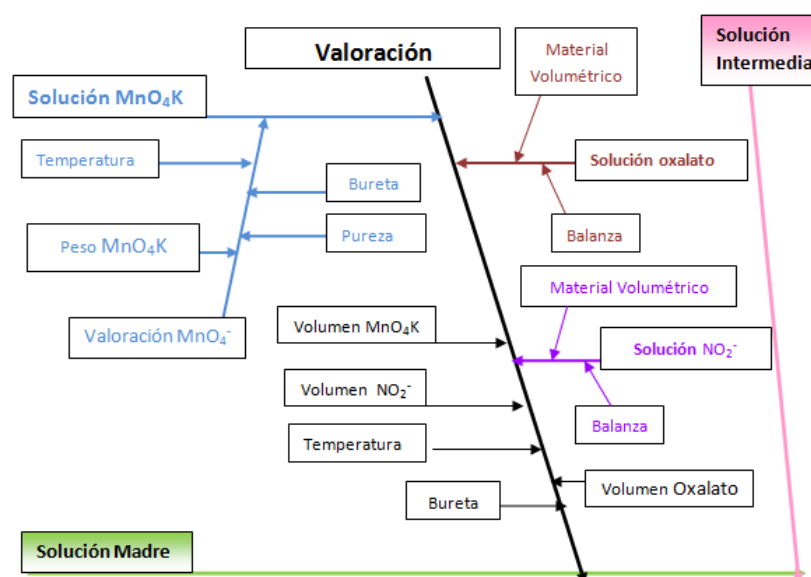


Figura 18: Paso n° 1 representa el diagrama de las posibles fuentes de errores asociadas a la valoración de las soluciones y a la preparación de la solución intermedia.

**Paso n° 2:** Se analizó el proceso de la preparación de la solución de trabajo, la preparación de los patrones para la calibración, la exactitud del método, la precisión del método y lectura espectrofotométrica para la elaboración de la curva de calibración. A continuación se muestra el diagrama originado a partir del paso n° 2.

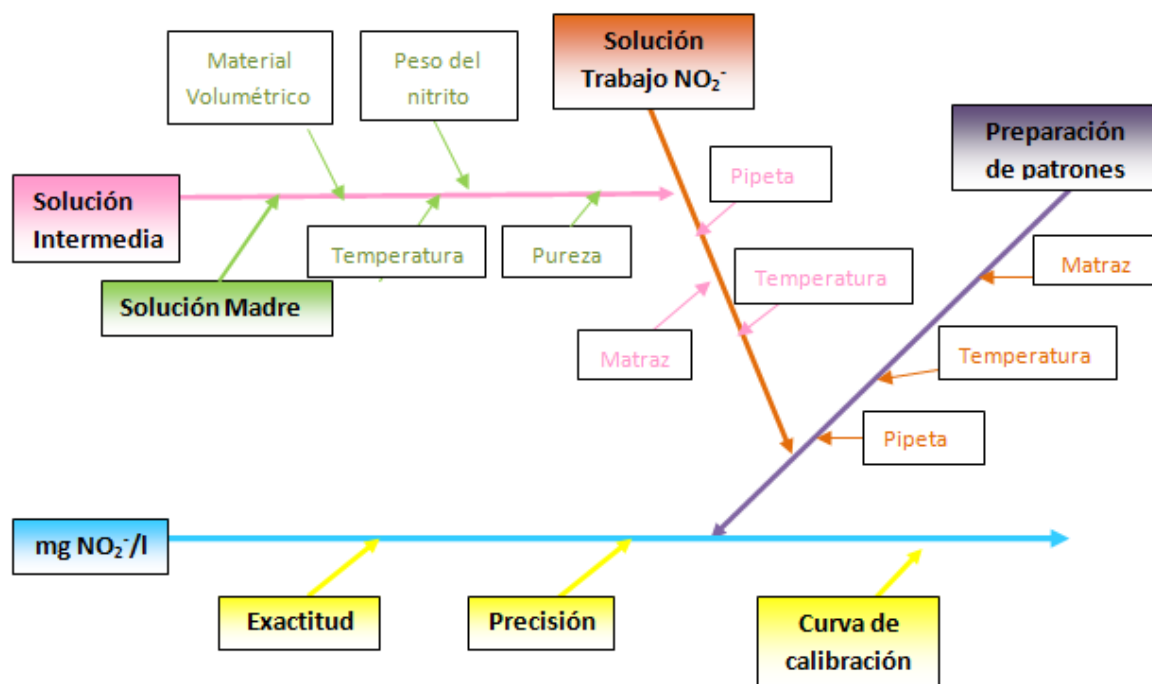


Figura 19: **Paso n° 2** representa el diagrama de las posibles fuentes de error asociadas a la preparación de la solución de trabajo y a preparación de patrones.

**Paso n° 3:** Finalmente, una vez identificadas tanto las causas principales como las causas secundarias, se procedió al análisis detallado de cada una de ellas para seleccionar las causas que son las fuentes principales de error y que están en condiciones de corregir inmediatamente

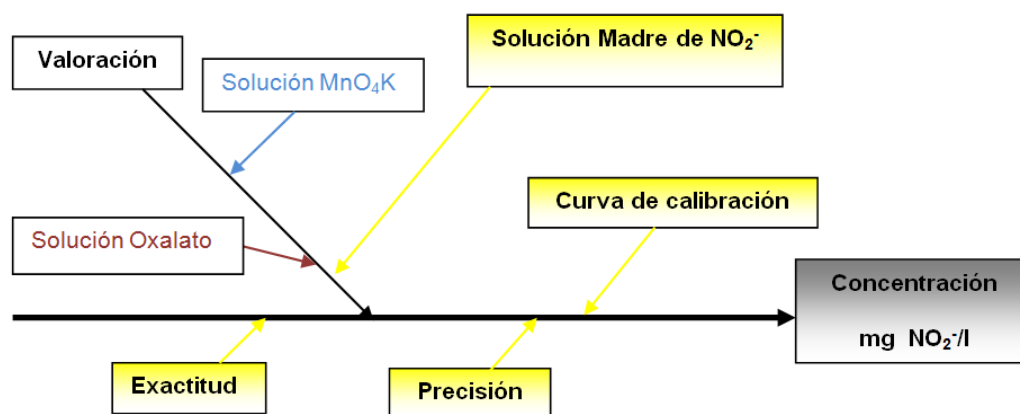


Figura 20: **Paso n° 3** representa al diagrama causa-efecto final del análisis de fuentes de errores para el método colorimétrico 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - B, que se encuentra publicado en el Standard Methods.

Se estudió el diagrama de causa-efecto final y se observó la existencia de cuatro fuentes de error a analizar: la fuente n°1 asociada a la preparación y valoración de la solución madre de nitrito, la fuente n°2 asociada a la curva de calibración y la lectura de la misma en un equipo espectrofotométrico, la fuente n°3 asociada a la precisión del método y finalmente la fuente n°4 asociada a la exactitud del mismo.

#### 4.1.3 Etapa III: Cuantificación de la incertidumbre

Cada fuente de incertidumbre se analizó por separado; se calculó la incertidumbre estándar y relativa de cada una y finalmente se combinaron todas las fuentes de incertidumbre (3); (5).

##### **Fuente de error n° 1: Asociada a la preparación y valoración de la solución madre de nitrito**

En primer lugar se calculó la incertidumbre asociada a la preparación de la solución madre; para estimarla se estudiaron las características del reactivo de nitrito de sodio, tales como: la pureza, el peso del reactivo y el uso de la balanza apropiada para la pesada según la metodología citada. Además se consideró el material volumétrico utilizado en la disolución de la droga nitrito de sodio empleada. A continuación se detallan los cálculos para la estimación de la incertidumbre estándar y relativa asociada.

Para el análisis de la pureza del reactivo nitrito de sodio se consideró la información aportada por la hoja técnica del proveedor marca Merck, la cual informó que la incertidumbre expandida del patrón fue de  $0,999 \pm 0,001$  mg, para poder obtener la Incertidumbre estándar a partir de ella se la asoció a una distribución de probabilidad rectangular ya que cada valor de un intervalo dado tiene la misma probabilidad de ocurrencia. El resultado de la incertidumbre estándar es de 0,001 mg.

$$\mu_{\text{Pureza (nitrito de sodio)}} = \frac{0,001}{\sqrt{3}} = 0,001 \text{ mg}$$

A continuación se estudió la incertidumbre aportada por la balanza analítica con la que se realizó la pesada de 1,232 g del patrón de  $\text{NO}_2\text{Na}$ . El certificado de calibración de la misma estableció que la incertidumbre expandida fue de 0,0001g para un  $k=2$ . Para calcular la incertidumbre estándar se la asoció a una distribución normal, dividiendo la incertidumbre expandida por el factor  $k$ . El resultado de la incertidumbre estándar es de 0,00005 mg. Sin embargo el fabricante informó que la precisión de la misma es de 0,01 mg considerándola como incertidumbre estándar; por lo que la suma cuadrática de ambas dieron como resultado de incertidumbre total 0,05 mg. A continuación se muestran los resultados.

$$\mu_{\text{balanza}} = \frac{0,0001}{2} = 5 \times 10^{-5} \text{ g} \quad \text{igual a decir } 0,05 \text{ mg}$$

$$\mu_{\text{balanza}} = \sqrt{(0,05)^2 + (0,01)^2}$$

$$U_{\text{balanza}} = 0,05 \text{ mg}$$

También se consideró el material de vidrio volumétrico, un matraz de 1000 ml identificado como SV70, con el que se hizo la disolución la droga patrón, con la información del certificado del fabricante  $\pm 0,35$  mL de volumen interno del matraz y considerando que responde a una distribución normal con un  $k=2$ . El resultado de la incertidumbre estándar es de 0,175 mL.



$$\mu_{\text{matraz 1000ml}} = \frac{0,35}{2} = 0,175 \text{ mL}$$

Al observar los resultados de las incertidumbres asociadas a la preparación de la solución madre de nitrito se descartó la aportada por la pureza del reactivo, ya que en relación a la pesada y el volumen medido en material de vidrio, ésta fue despreciable.

En segundo lugar se calculó la incertidumbre asociada a la estandarización o valoración de la solución madre, como etapa final de la estimación relacionada a la fuente de error nº 1. Para dicho fin se utilizó un volumen de 50 mL de permanganato de potasio 0,05 N, que se midió en un matraz identificado como SV72 y cuya incertidumbre expandida según su certificado fue de  $\pm 0,094$  mL de volumen interno, para obtener la incertidumbre estándar se lo asoció a una distribución normal con un  $k=2$ . A continuación se muestra el cálculo de la misma.

$$\mu_{\text{matraz 50 ml}} = \frac{0,094}{2} = 0,05 \text{ mL}$$

Debido que la valoración de la solución madre de nitrito de sodio se realizó sobre 50 mL que se midieron en el mismo matraz calibrado e identificado como SV72, la incertidumbre asociada al matraz resultó ser la misma anteriormente calculada.

$$\mu_{\text{matraz 50 ml}} = \frac{0,094}{2} = 0,05 \text{ mL}$$

La reacción química, según las especificaciones de la determinación, debía llevarse a cabo a una temperatura entre 70-80°C, para ello se utilizó una plancha calefactora; por lo que se debió tener en cuenta el efecto de la temperatura sobre el cálculo de la incertidumbre estándar; se consideró el uso de un termómetro identificado como SV81 de 25 °C, cuyo certificado del fabricante indicó una incertidumbre expandida de  $\pm 0,01^\circ \text{C}$ , se lo asoció a una distribución rectangular ya que cada valor del intervalo dado tenía la misma

probabilidad de ocurrencia y se obtuvo la incertidumbre estándar del mismo . El resultado fue de 0,006 °C

$$\mu_{\text{termómetro}} = \frac{0,01}{\sqrt{3}} = 0,006 \text{ °C}$$

Para eliminar la coloración de permanganato de potasio se agregó porciones de 10 mL de la solución 0,05 N de oxalato de sodio ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ). Por lo tanto se considero la incertidumbre aportada por la pipeta de 10 mL de libre escurrimiento, identificada como SV 21 y cuya incertidumbre expandida según su certificado fue de  $\pm 0,07$  mL de volumen interno, para obtener la incertidumbre estándar se lo asoció a una distribución normal con un  $k=2$ .

$$\mu_{\text{bureta 10 ml}} = \frac{0,07}{2} = 0,035 \text{ mL}$$

y finalmente para evaluar el efecto de la temperatura en la dilatación del material volumétrico, se consideró una variación de temperatura ambiental de  $\pm 10$  °C, respecto a la temperatura de calibración de la bureta de 25 mL y un coeficiente de expansión del agua igual a  $2,1 \times 10^{-4}/\text{°C}$ .; dichos datos se los asoció a una distribución rectangular. El resultado de la incertidumbre estándar es de 0,03 ml, los cálculos de incertidumbre se muestran a continuación.

$$\mu_{\text{Temp expansión}} = \frac{25\text{ml} \times 10\text{°C} \times 2,1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0,03 \text{ mL}$$

Al analizar esta fuente de incertidumbre nº 1, se debió calcular previamente la estimación de la incertidumbre estándar de las soluciones de permanganato de potasio de 0,05 N y la del oxalato de sodio 0,05 N, las cuales fueron utilizadas en la valoración de la solución madre de nitrito de sodio, pueden consultarse en el anexo I.

Antes de realizar la suma cuadrática de todas las incertidumbres estándares involucradas en esta etapa, se presenta una tabla de resumen relacionado a la estimación de las distintas incertidumbres estándares y relativas asociadas a la fuente n°1, la que permite preparar los patrones para la elaboración de la curva de calibración para el método en estudio.

Tabla 9: Resultados obtenidos de la estimación de la incertidumbre estándar y relativa para la preparación y valoración de la solución madre de nitrito de sodio.

Descripción	Valor X (unidad de medida)	$\mu$ estándar	$\mu$ relativa
<b>Preparación de la solución de Permanganato de potasio <math>MnO_4K</math></b>			
Peso del reactivo	1600 mg	0,05 mg	$3,1 \cdot 10^{-5}$
Material volumétrico	1000 mL	0,175 mL	$1,8 \cdot 10^{-5}$
<b>Preparación de la solución de Oxalato de sodio</b>			
Peso del reactivo	3350 mg	0,05 mg	$1,5 \cdot 10^{-5}$
Pureza del reactivo	0,998 g	0,00057 g	$5,7 \cdot 10^{-4}$
Material volumétrico	250 mL	0,155 mL	$6,2 \cdot 10^{-4}$
<b>Valoración de la solución de Permanganato de potasio</b>			
Material volumétrico	25 mL	0,08 mL	$3,2 \cdot 10^{-3}$
Termómetro	25 ° C	0,006 ° C	$2,4 \cdot 10^{-4}$
Efecto de la temperatura en mat. Volumétrico (bureta)	25 mL	0,015 mL	$6,0 \cdot 10^{-4}$
<b>Preparación de la solución Madre de nitrito</b>			
Peso del reactivo	1232 mg	0,05 mg	$4,1 \cdot 10^{-5}$
Pureza del reactivo	0,999 g	0,00057 g	$5,7 \cdot 10^{-4}$
Material volumétrico	1000 mL	0,175 mL	$1,8 \cdot 10^{-5}$
<b>Valoración de la solución Madre de nitrito</b>			
Volumen de solución de $MnO_4K$	50 mL	0,05 mL	$1,0 \cdot 10^{-3}$
Solución Oxalato de sodio	10 mL	0,035 mL	$3,5 \cdot 10^{-3}$
Solución de nitrito	50 mL	0,05 mL	$1,0 \cdot 10^{-3}$
Termómetro	25 ° C	0,006 ° C	$2,4 \cdot 10^{-4}$
Efecto de la temperatura en mat. Volumétrico (bureta)	25 mL	0,03 mL	$1,2 \cdot 10^{-3}$

En la tabla 9 se pueden observar los datos de incertidumbre relativa de cada etapa en la valoración de la solución madre de nitrito de sodio, que se obtiene a partir de la división de la incertidumbre estándar por la unidad de medida o valor x.

Se consideró la suma cuadrática de las incertidumbres relativas individuales para conocer la incertidumbre relativa total.

$$u(p; q) = \sqrt{(\frac{u}{p})^2 + (\frac{u}{q})^2}$$

$$\mu_{\text{sol. Madre}} = \sqrt{(3,1 \cdot 10^{-5})^2 + (1,8 \cdot 10^{-5})^2 + (1,5 \cdot 10^{-5})^2 + (5,7 \cdot 10^{-4})^2 + (6,2 \cdot 10^{-4})^2 + (3,2 \cdot 10^{-3})^2 + (2,4 \cdot 10^{-4})^2 + (6,0 \cdot 10^{-4})^2 + (4,1 \cdot 10^{-5})^2 + (5,7 \cdot 10^{-4})^2 + (1,8 \cdot 10^{-5})^2 + (1,0 \cdot 10^{-3})^2 + (3,5 \cdot 10^{-3})^2 + (1,0 \cdot 10^{-3})^2 + (2,4 \cdot 10^{-4})^2 + (1,2 \cdot 10^{-3})^2}$$

$$\mu_{\text{sol. Madre}} = \sqrt{5,024 \cdot 10^{-5}}$$

$$\mu_{\text{sol. Madre}} = 0,007$$

Se puede observar que la incertidumbre asociada a la preparación y valoración de la solución madre es un valor que se lo puede considerar despreciable o muy pequeño.

### **Fuente de error nº 2: Asociada a la incertidumbre directa de la curva de calibración medida en el instrumento espectrofotométrico**

A partir de la solución madre de nitrito, se prepararon diferentes patrones que participaron en la creación de la curva de calibración. Al obtener la recta de regresión mediante el método de mínimos cuadrados, se considera que la desviación estándar de una concentración es la incertidumbre de la misma.

Esta fuente se la consideró como el error de la concentración estimada a partir de la interpolación de la intensidad de la muestra en la curva de calibración, y se calculó su incertidumbre a partir de la siguiente ecuación citada en el documento de Entidad Nacional de Acreditación de Madrid (CEA-ENAC, 2000).

$$\mu_{\text{Cal}} = (S_{y/x}/b) * \sqrt{1/m + 1/n + (x_{\text{pred}} - X_{\text{cal}})^2 / \sum (X_i - X_{\text{cal}})^2}$$

Siendo:

$\mu_{\text{Cal}}$  = Incertidumbre del mesurando obtenida por el instrumento calibrado.

$S_{y/x}$  = Desviación estándar residual del cálculo de la regresión lineal.

b = Pendiente de la recta.

m = Número de réplicas de la muestra en estudio.

n = Número de patrones utilizados para obtener la curva de calibración.

$X_{\text{pred}}$  = Concentración del analito leído en la muestra.

$\bar{X}_{cal}$ =Valor medio de las concentraciones de los patrones empleados en cada uno de los puntos de la curva de calibración.

$X_i$ =Cada una de las concentraciones de los patrones de la curva de calibración.

A continuación se muestra tabla 10, que muestra el resumen de la estimación de la incertidumbre para la fuente de error nº 2, los cálculos auxiliares pueden consultarse en el anexo I, punto nº7.

Tabla 10: Resultados obtenidos de la estimación de la incertidumbre estándar y relativa asociada a la curva de calibración medida en el instrumento espectrofotométrico

Concentraciones de patrones	0,084 mgL <sup>-1</sup>	0,164 mgL <sup>-1</sup>	0,328 mgL <sup>-1</sup>	0,657 mgL <sup>-1</sup>
$\mu_{Cal}$ (mg/l)	0,009551	0,008405	0,0075098	0,011872
$\mu$ relativa	0,1137	0,05125	0,022896	0,018070
Sumatoria cuadrática $\mu$ Cal relativa	<b>0,128</b>			

Si se suma cuadráticamente las incertidumbres relativas individuales para cada concentración del patrón nitrito de sodio se obtiene que la incertidumbre relativa total es igual a 0,128.

Si se observa el valor asociado a la incertidumbre de la lectura de la curva de calibración en el instrumental, se puede decir que la incertidumbre estimada para esa fuente de error es considerable y se estima que aportará directamente a la incertidumbre total del método en estudio.

### **Fuente de error nº 3: Asociada a la incertidumbre de la precisión del método en estudio**

La incertidumbre asociada al error aleatorio es aquella relacionada a la precisión intermedia del método; es importante recordar que la reproducibilidad como fuente de error tiene en consideración la repetición de la técnica por diferentes analistas en días distintos, bajo las mismas condiciones de ensayo, mediante el análisis estadístico de una esta serie de observaciones. Se calculó la desviación típica de acuerdo a los datos obtenidos en la validación y dividiendo por la raíz cuadrada de las 10 determinaciones realizadas, resulta que la incertidumbre estándar estimada para la precisión intermedia fue de 0,00032 mgL<sup>-1</sup>.

A continuación se presentan los cálculos.

$$\sigma = \frac{S_r}{\sqrt{n}} = \frac{0,001}{\sqrt{10}} = 0,0003 \text{ mgL}^{-1}$$

La relativización permite visualizar la incertidumbre por unidad de medida para su obtención se debe dividir la incertidumbre estándar por la concentración medida que es 0,084 mgL<sup>-1</sup>, lo que resultó como valor de incertidumbre relativa 0,004 adimensional. A continuación se pueden observar los resultados representados en la tabla 11.

Tabla 11: Resultados obtenidos de la estimación de la incertidumbre estándar y relativa asociada a la precisión intermedia del método en estudio

$\mu \text{ mgL}^{-1}$	Concentración $\text{mgL}^{-1}$	$\mu$ relativa
0,00032	0,084	<b>0,004</b>

Se puede observar que la incertidumbre relacionada a la precisión intermedia, reflejó un valor despreciable, es decir se espera que esta fuente de error no aporte a la incertidumbre total del método en cuestión. Los cálculos de la estimación pueden consultarse en el punto 8 del anexo I.

#### **Fuente de error nº 4: Asociada a la incertidumbre de la exactitud del método en estudio**

Teniendo en cuenta que el análisis de la exactitud en la validación del método se obtuvo a partir de la recuperación de un patrón de nitrito de sodio de alta pureza dosificado en concentraciones conocidas, se consideró para el cálculo de la estimación de incertidumbre asociada a esta fuente a la incertidumbre relativa de la pureza del analito y la desviación estándar más significativa de la concentración de nitrito de sodio utilizada en la exactitud del método durante su validación.

La incertidumbre relacionada a la pureza del patrón nitrito de sodio fue calculada para la fuente asociada a la preparación y valoración de la solución madre de nitrito de sodio; se puede observar en la tabla 9 de la página 51, su valor hace concluir que la misma es despreciable; ya que no aportaría significativamente en la incertidumbre total del método. Sin embargo; la desviación estándar que presenta la exactitud para la recuperación de la concentración de 0,0164 mgL<sup>-1</sup> de nitrito de sodio es de 0,0031 mgL<sup>-1</sup> que al relativizarla

entregó un resultado de 0,019, fue el valor de incertidumbre que se aceptó como aporte significativo a la incertidumbre total.

Tabla 12: Resultados obtenidos de la estimación de la incertidumbre estándar y relativa asociada a la exactitud del método en estudio

Incertidumbre estándar	valor x	$\mu_{\text{relativa}}$
0,00057 g	0,9999 g	0,000570
0,0031 mgL <sup>-1</sup>	0,1634 mgL <sup>-1</sup>	0,019
$u(p; q) = \sqrt{(\mu/p)^2 + (\mu/q)^2}$	<b>0,019</b>	

Los cálculos para la estimación de la incertidumbre pueden observarse en el punto 9 del anexo I.

#### 4.1.4 Etapa IV: Cálculo de la incertidumbre combinada y expandida

##### Calcular la incertidumbre combinada del método en estudio

Para poder estimar la incertidumbre total del método, una vez analizadas las distintas fuentes que aportaron un valor de incertidumbre de forma individual, se deben combinar las mismas, es decir se deben sumar cuadráticamente cada una y obtener una única incertidumbre para el método colorimétrico 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - B publicado en el Standard Methods.

Siendo la Incertidumbre relativa estándar asociada a la fuente de error n°1 (Asociadas a la soluciones)= 0,007, la asociada a la fuente de error n°2 (Asociadas a la curva de calibración)= 0,128, la asociada a la fuente de error n°3 (Asociada a la precisión)= 0,004, y finalmente, la Incertidumbre relativa estándar asociada a la fuente de error n°4 (Asociada a la exactitud)= 0,019, por lo tanto, la incertidumbre combinada es:

$$uc(p; q) = \sqrt{(\mu/p)^2 + (\mu/q)^2}$$

$$\mu_c = \sqrt{(0,007)^2 + (0,128)^2 + (0,004)^2 + (0,019)^2}$$

$$\mu_c = \sqrt{0.01681}$$

<b><math>\mu_c = 0,129</math></b>
-----------------------------------

Se puede observar que la incertidumbre asociada a la preparación y valoración de la solución madre de nitrito y la asociada a la precisión del método en estudio, reflejaron valores despreciables, es decir que estas fuentes de errores no aportarán significativamente a la incertidumbre total del método en cuestión.

### **Elección del nivel de confianza y cálculo de la incertidumbre expandida**

El último paso a obtener es la incertidumbre expandida (U), que se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada final por el factor de cobertura llamado k, asegurando así que el resultado se encontrará dentro del intervalo establecido con una probabilidad del 95% de confianza, considerando a k=2 bajo una distribución normal. El cálculo de la estimación fue

$$U = \mu_{\text{COMB}} \times k$$

$$U = 0,129 \times 2$$

<b>U = 0,26</b>
-----------------

Se concluye que la mayor fuente de incertidumbre fue la asociada a la lectura de la curva de calibración en el espectrofotómetro uv-visible. Por lo tanto se puede considerar que la incertidumbre del método colorimétrico 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - B publicado en el Standard Methods y desarrollado bajo las condiciones de la validación es de ± 0,26 por cada unidad de resultado, es decir, que para obtener el valor de incertidumbre de una concentración dada se debe multiplicar a ésta por 0,26 y el resultado corresponde al valor de incertidumbre expandida del método para la concentración obtenida. El cual es un valor razonable teniendo en cuenta el rango de valores analizados y que los mismos serán expresados con una confianza del 95%.

El conocimiento de la incertidumbre del método implica un aumento de la confianza del resultado de medición.



## Capítulo V: Conclusiones



## 5. Conclusiones

Se logró evaluar una metodología analítica para la determinación del ión nitrito en aguas no coloreadas, (basada en el método colorimétrico 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - B publicado en el Standard Methods) mediante el análisis de los parámetros linealidad, límites lineales, precisión, exactitud y estimación de la incertidumbre.

Bajo las condiciones dadas se pudo establecer una respuesta lineal del método. Se obtuvo un coeficiente de correlación y un coeficiente de determinación acordes a lo establecido por las guías y normativas consultadas. El modelo de línea recta propuesto es el adecuado y los límites lineales fueron aceptados por los criterios establecidos por DeSain, Martin-Smith y Rudd y cumpliendo el límite legislado por el Código Alimentario Argentino.

En la determinación de la precisión del método, el CV% obtenido cumplió con lo establecido por I.U.P.A.C y DeSain, Martin-Smith y Rudd, además con respecto a la exactitud, los valores de recuperación obtenidos fueron satisfactorios debido a que están dentro del rango recomendado por la normativa vigente; con lo que se concluye que el método es preciso y exacto para determinar la concentración de ión nitrito en aguas no coloreadas para consumo.

La estimación de la incertidumbre total del método se obtuvo exitosamente, dando lugar a un método confiable para controlar los niveles de concentración de nitrito de sodio establecidos por la legislación regida en Argentina. Con los resultados obtenidos se puede concluir que se cumple la hipótesis planteada, ya que fue posible determinar la concentración en mgL<sup>-1</sup> de ión nitrito en aguas no coloreadas para consumos humano utilizando una metodología analítica validada y de resultados confiables.

## 6. Bibliografía

1. ANAYA, PAJUELO R. 1999. "Investigación de la acción de los nitratos y nitritos contenidos en algunos vegetales como causantes de metahemoglobinemia". Vol 2, número 1. 2-3 p. <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe>. [consulta: 5 de noviembre 2016].
2. Apunte técnico "Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas". Universidad de Córdoba. Departamento de Bioquímica y biología molecular. 2017. <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biologia/practicagenerales.htm>. [consulta: 20 de noviembre 2016].
3. C.E.N.A.M. Guía para estimar la incertidumbre de la medición. W. Schmid y R. Lazos, febrero, 2004. <http://www.cenam.mx> . [Última consulta: 20 de julio 2017].
4. CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, 2010. Capítulo XII. Art.982 Agua. [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp). [Última consulta: 15 de octubre 2017].
5. Documento CEA-ENAC-LC/02, "Guía para la expresión de la incertidumbre de medida de las calibraciones". Entidad Nacional de Acreditación. Madrid, 2000.
6. ENRIQUEZ, PEDRO A. Monografía: "Evaluación del riesgo ambiental a la liberación de plaguicidas". <http://www.monografias.com/trabajos10/evaries/evaries.shtml>. [consulta: 20 de noviembre 2015].
7. EURACHEM/CITAC "La Adecuación al uso de los métodos analíticos – guía del laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados". 1º Edición 2016. <http://www.eurachem.org>. [Última consulta: 6 de agosto 2017].
8. FABRO, MABEL. 2015. "Validación de metodologías analíticas". Curso Teórico Práctico dictado el 6 y 7 de abril 2015. INTI Mendoza.
9. FABRO, MABEL. 2015. "Calculo de Incertidumbre en metodologías analíticas". Curso Teórico Práctico dictado el 7 y 8 de septiembre 2015. INTI Mendoza.

10. F.A.O "Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación". <http://www.fao.org>. Fundación 16 de octubre 1945. [Última consulta: 6 de enero 2016].
11. FERNANDEZ, MIGUEL 2006. "Origen de los nitratos y nitritos y su influencia en la potabilidad de las aguas subterráneas". <https://revista.ismm.edu.cu/index.php/revistamg/article/view/pdf>. [consulta: 20 de noviembre 2015].
12. GONZALES, FERNANDO 2011. "Contaminación por fertilizantes: Un serio problema ambiental". <http://fgonzalesh.blogspot.com.ar/2011/01/contaminacion-por-fertilizantes-un.html>. [consulta: 11 de diciembre 2017].
13. GUIFFRE, LIDIA. 2001, "Impacto ambiental en ecosistemas"1° Edición 7-8; 98-100 p.
14. GUIFFRE, LIDIA. 2003, "Impacto ambiental en ecosistemas". 2° Edición. 176-182 p.
15. G.U.M. "Guías para la Expresión de Incertidumbres de la Medición". Segunda impresión INTI, 2000.Traducción INTI-CEFIS. [Última consulta: 16 de agosto 2017].
16. ISO 99: 2007 "Vocabulario internacional de metrología- conceptos básicos y general y términos asociados". 1° Edición 2007. Versión corregida 2010. <http://www.iso.org>. [Última consulta: 16 de julio 2017].
17. ISO 3696: 1987 "Water for Analytical laboratory use- specification and test methods". 1<sup>st</sup> Edition 1987. <http://www.iso.org>. [Última consulta: 16 de julio 2017].
18. ISO 9001: 2008 "Sistemas de gestión de calidad- requisitos". 4° Edición. Suiza. 11-31p. <http://www.iso.org>. [Última consulta: 16 de julio 2016].
19. I.U.P.A.C "La unión internacional de química pura y aplicada". Fundada en 1919 <https://iupac.org> [Última consulta: 10 marzo 2016].
20. LINDER, ERNEST; (Traducción Torromé Pérez, Aurora). 1995, "Toxicología de los alimentos". 2° Edición. 177-184 p.
21. MAROTO, SANCHEZ ALICIA. 2002 Tesis doctoral. "Incertidumbre en métodos analíticos de rutina". Facultad de Química Universidad Rovira I Virgili, Tarragona. España. Bibliografía citada y consultada no expresamente citada.

22. MOLINA, I. 2012. Metodología para la determinación de plaguicidas bencimidazoles en vino por cromatografía líquida de alta resolución. Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Agrarias. Mendoza, Argentina. Bibliografía citada y consultada no expresamente citada.
23. O.A.A. ORGANISMO ARGENTINO DE ACREDITACION “Guía para la Validación de Métodos de Ensayo”. Código: GUI-LE-03. Versión n°1. Edición junio 2013. <http://www.oaa.ar/docs>. [Última consulta: 16 de julio 2017].
24. O.A.A. ORGANISMO ARGENTINO DE ACREDITACION “Expresión de la incertidumbre de medida en las calibraciones/ensayos”. Código: GUI-LE-01. Versión n° 1. Edición junio 2013. <http://www.oaa.ar/docs> . [Última consulta: 15 de agosto 2017].
25. O.M.S "Organización Mundial de la Salud". Fundación Suiza 1948. <http://www.who.int>. [Última consulta: 5 de enero 2016].
26. QUATTROCCHI, O. 2015. Modulo 6: “Validación de metodologías analíticas por HPLC” Curso Teórico Práctico dictado el 27 y 28 de abril 2015. INV, Mendoza.
27. SILVESTRE, ALEJANDRO A., 1995, “Toxicología de los alimentos”. 1° Edición. Buenos Aires. 250-254 p.
28. STANDARD METHODS ONLINE, 2011, “Método colorimétrico- 4500- NO<sub>2</sub><sup>-</sup> B”, 22° Edición. Capítulo IV. 1-2 p. <http://www.standardmethods.org>. [Última consulta: 20 de noviembre 2017].

## **7. Anexo I**

### **1. MATERIALES**

#### **1.1 Equipamiento de laboratorio**

- Balanza analítica Sartorius.
- Heladera Coventry.
- Plancha calefactora con agitador magnético.
- Material volumétrico calibrado.
- Cubetas de vidrio o cuarzo con tapa y con paso óptico de 1cm.

#### **1.2 Equipamiento utilizado**

- Espectrofotómetro uv-visible. Marca Shimatzu.

#### **1.3 Drogas y reactivos**

- Agua destilada, exenta de nitritos (grado 3).
- Ácido Fosfórico 85%. Ciccarelli.
- Sulfanilamida.
- Diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina.
- Oxalato de sodio. Calidad estándar primario.
- Permanganato de potasio, grado p.a,
- Nitrito de sodio, grado p.a, calidad estándar primario.

## **2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**

- a) Solución de reactivo colorante: Añadir a 800ml de agua destilada, 100 mL de ácido fosfórico 85% y 10 g de sulfanilamida, disolver y añadir 1 g diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina, disolver y enrasar a 1000 mL.
- b) Solución de oxalato de sodio 0,05 N: Pesar 3,350g +/- 0,01g de  $\text{Na}_2 \text{C}_2\text{O}_4$  y colocarlo en matraz de 100 mL. Disolver y enrasar con agua destilada.

- c) Solución de permanganato de potasio 0,05 N: Disolver 1,6g de  $\text{KMnO}_4$  en 1L de agua destilada. Guardar en un frasco color caramelo por lo menos una semana antes de ser usado.

Estandarizar: Pesar de 100 a 200 mg +/- 0,1mg de  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  varias muestra, añadir 100 mL de agua destilada y agitar hasta que se disuelva. Añadir 10 ml de ácido sulfúrico 1+1 y calentar rápidamente entre 90°C y 95 °C, no dejar que la temperatura descienda por debajo de 85°C y agitando constantemente. Titular rápidamente con la solución de permanganato de potasio que se va a estandarizar, hasta un punto final de un ligero color rosa que ha de persistir durante por lo menos 1 minuto. Realizar un blanco a base de agua destilada y ácido sulfúrico. Calcular la media de los resultados de varias titulaciones.

$$\text{Molaridad de } \text{KMnO}_4 = \text{Xg } \text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4 / (\text{A}-\text{B}) \times 0,33505$$

$$\text{Normalidad de } \text{KMnO}_4 = \text{Xg } \text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4 / (\text{A}-\text{B}) \times 0,067$$

Siendo

A= mL de reactivo de titulación para la muestra.

B= mL de reactivo de titulación para el blanco.

Titulación permanganato de potasio 0.01M				
solucion			Blanco	
Gasto ml	Gramos	Molaridad	Gasto ml	Factor
31,825	0,10655	0,010	0,1	1,00

d) Preparación de solución inicial o madre de nitrito de sodio: Ecuación para el cálculo de la estandarización de la solución madre de  $\text{NO}_2^-$

**1,00 mL solución = 250  $\mu\text{g N}$  = 0,8214 mg  $\text{NO}_2^-$ .**

(A)= [(B x C) - (D x E)]x 7/F

Siendo:

(A)= mg  $\text{NO}_2^- \text{ NmL}^{-1}$  en la solución madre de  $\text{NaNO}_2$ .

B= total de  $\text{mL}^{-1}$  utilizados de  $\text{KMnO}_4$  0,05 N.

C= Normalidad de  $\text{KMnO}_4$  patrón.

D= total de mL adicionados del reductor patrón, de  $\text{Na}_2 \text{C}_2\text{O}_4$  0,025 M.

F= mL de solución madre de  $\text{NaNO}_2$  tomados para titular.

Cada 1 mL de  $\text{KMnO}_4$  0,05 N consumido por la solución de  $\text{Na}_2 \text{C}_2\text{O}_4$  0,05 N corresponde a 1750  $\mu\text{g NO}_2^- \text{ N}$ .

Titulación de solución Madre						
solucion			Blanco			mg de nitritos
Gasto ml	ml Oxalato	mg Nitritos en sol	Gasto ml	ml Oxalato	mg Nitritos en sol	reales en solucion
58	20	0,2660	3,1	50	0,0217	<b>0,2443</b>

### 3. CÁLCULOS

#### 3.1 Expresión de los resultados

Para calcular la concentración de nitritos en la muestra de agua directamente a partir de la curva de calibración, se utiliza la siguiente expresión:

$$C = K \times \text{Abs} + B$$

C= valor de la concentración expresado en mg  $\text{NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ .

K= pendiente de la curva patrón.

B= ordenada al origen de la curva patrón.



### 3.2 Criterio de aceptación de resultados

La diferencia entre los dos ensayos duplicados, debe ser menor o igual al 20%, de la media obtenida a partir de dichos resultados.

### 4. ACCIONES CORRECTIVAS

Si los resultados efectuados por duplicado, no se encuentran dentro de los valores establecidos, se aplican las siguientes acciones correctivas:

- Controlar los reactivos empleados.
- Controlar las cubetas empleadas.
- Controlar el ajuste del espectrofotómetro.
- Repetir el ensayo.

### 5. VERIFICACION DE LA NO VARIACION DE LA LECTURA ESPECTROFOTOMETRICA CON RESPECTO AL TIEMPO TRANSCURIDO

Primera lectura media hora después de haber agregado el reactivo colorante a una muestra de concentración  $0,084 \text{ mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$  a 542 nm.

Media hora después de haber agregado el reactivo colorante

Abs	cc
0,080	<b>0,084</b>

Una hora más tarde del agregado del reactivo colorante

Abs	cc
0,081	<b>0,084</b>

Dos horas más tarde del agregado del reactivo colorante

Abs	cc
0,080	<b>0,084</b>

Tres horas más tarde del agregado del reactivo colorante

Abs	cc
0,081	<b>0,084</b>

## 6. ESTIMACIÓN DEL CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR PARA LAS SOLUCIONES DE PERMANGANATO DE POTASIO 0,05 N Y OXALATO DE SODIO 0,05 N UTILIZADAS EN LA VALORACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE NITRITO DE SODIO

*Preparación y valoración de la solución de permanganato de potasio*

Para preparar la solución de permanganato de potasio ( $\text{MnO}_4\text{k}$ ) 0,05 N, se pesó 1,6 g de  $\text{MnO}_4\text{k}$  en 1000 mL. Se utilizó una balanza analítica cuyo certificado de calibración establece que la incertidumbre es de 0,0001g, para un  $k=2$ , considerando una distribución normal y una incertidumbre de precisión de la balanza de 0,01 mg.

$$\mu_{\text{balanza}} = \frac{0,0001}{2} = 5 \times 10^{-5} \text{ g} \quad \text{igual a decir } 0,05 \text{ mg}$$

$$\mu_{\text{balanza}} = \sqrt{(0,05)^2 + (0,01)^2}$$

$$\mu_{\text{balanza}} = 0,05 \text{ mg}$$

Considerando la verificación del material volumétrico para la preparación de la solución de permanganato de potasio: se utilizó un matraz de 1000 mL (SV70), con certificado del fabricante,  $\pm 0,35$  mL de volumen interno del matraz, se supone una distribución normal con  $k=2$ .

$$\mu_{\text{matraz } 1000\text{mL}} = \frac{0,35}{2} = 0,175 \text{ Ml}$$

Para preparar la solución de oxalato de sodio ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) 0,05 N, que se utilizó en la valoración del permanganato de potasio y para la valoración de la solución madre, se pesó 3350 mg de  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , se utilizó una balanza analítica cuyo certificado de calibración establece que la incertidumbre es de 0,0001g, para un  $k=2$ , considerando una distribución normal y una incertidumbre de precisión de la balanza de 0,01 mg.

$$\mu_{\text{balanza}} = \frac{0,0001}{2} = 5 \times 10^{-5} \text{ g} \quad \text{igual a decir } 0,05 \text{ mg}$$

$$\mu_{\text{balanza}} = \sqrt{(0,05)^2 + (0,01)^2}$$

$$\mu_{\text{balanza}} = 0,05 \text{ mg}$$

Para la pureza del oxalato de sodio, se consideró la información aportada por la hoja técnica de Merck.  $0,998 \pm 0,001$ . Por lo que se supone una distribución rectangular.

$$\mu_{\text{Pureza (oxalato de sodio)}} = \frac{0,001}{\sqrt{3}} = 0,00057 \text{ mg}$$

Considerando la verificación de el material volumétrico, para la preparación de la solución de oxalato de sodio: se usó matraz de 250 mL (SV62), con certificado del fabricante,  $\pm 0,31\text{mL}$  de volumen interno del matraz, se supone una distribución normal con  $k=2$ .

$$\mu_{\text{matraz } 250 \text{ ml}} = \frac{0,31}{2} = 0,155 \text{ mL}$$

La incertidumbre de la bureta de 10 mL identificada como SV53 fue calculada, a partir de la información otorgada por el certificado del fabricante, con  $\pm 0,08 \text{ ml}$  de volumen interno y se la asoció a una distribución normal con  $k=2$ .

$$\mu_{\text{bureta } 25 \text{ ml}} = \frac{0,08}{2} = 0,04 \text{ mL}$$

Considerando la verificación de el termómetro (SV81 de  $25^\circ \text{C}$ ), usado para la medición de la temperatura de reacción ( $90\text{-}95^\circ\text{C}$ ), para la valoración de la solución de permanganato de potasio. Se realizó la verificación usando el certificado del fabricante  $\pm 0,01^\circ \text{C}$  de corrección de temperatura, se supone una distribución rectangular.

$$\mu_{\text{termómetro}} = \frac{0,01}{\sqrt{3}} = 0,006 \text{ } ^\circ\text{C}$$

El efecto de la temperatura en la dilatación del agua, con una variación de temperatura ambiental de  $\pm 10 \text{ } ^\circ\text{C}$ , respecto a la temperatura de calibración de la bureta de 25 mL. El coeficiente de expansión del agua es  $2,1 \cdot 10^{-4}/^\circ\text{C}$ . Se considera una distribución rectangular.

$$\mu_{\text{Temp expansión}} = \frac{25 \text{ mL} \times 10 \text{ } ^\circ\text{C} \times 2,1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0,03$$

## 7. FUENTE DE ERROR N° 2 ASOCIADA A LA INCERTIDUMBRE DIRECTA DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN MEDIDA EN EL INSTRUMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO

$$\mu_{\text{Cal}} = (S_{y/x}/b) * \sqrt{1/m + 1/n + (x_{\text{pred}} - \bar{X}_{\text{cal}})^2 / \sum (X_i - \bar{X}_{\text{cal}})^2} \quad (\text{ecuación 1.3})$$

Referencias:

$\mu_{\text{Cal}}$  = Incertidumbre del mesurando obtenida por el instrumento calibrado.

$S_{y/x}$  = Desviación estándar residual del cálculo de la regresión lineal.

b = Pendiente de la recta.

m = Número de réplicas de la muestra en estudio.

n = Número de patrones utilizados para obtener la curva de calibración.

$X_{\text{pred}}$  = Concentración del analito leído en la muestra.

$\bar{X}_{\text{cal}}$  = Valor medio de las concentraciones de los patrones empleados en cada uno de los puntos de la curva de calibración.

$X_i$  = Cada una de las concentraciones de los patrones de la curva de calibración.

	Concentración de los patrones de la curva de calibración			
Xi =	0,084	0,164	0,328	0,657
Sy/x =	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125
b =	1,077	1,077	1,077	1,077
m =	3	3	3	3
n =	12	12	12	12
Xpred =	0,084	0,164	0,328	0,657
Xcal =	0,3083	0,3083	0,3083	0,3083
(Xpred-Xcal)2 =	0,05031049	0,02082249	0,00038809	0,12159169
(Xi-Xcal)2 =	0,05031049	0,02082249	0,00038809	0,12159169
∑(Xi-Xcal)2 =	0,19311276	0,19311276	0,19311276	0,19311276
(Xpred-Xcal)2/ ∑(Xi-Xcal)2=	0,26052	0,10783	0,00201	0,62964
1/m=	0,333333333	0,333333333	0,333333333	0,333333333
1/n=	0,083333333	0,083333333	0,083333333	0,083333333
Sy/x /b =	0,011606314	0,011606314	0,011606314	0,011606314
1/m+1/n+(Xpred-Xcal)2/ ∑(Xi-Xcal)2	0,67719	0,52449	0,41868	1,04631
√1/m+1/n+(Xpred-Xcal)2/ ∑(Xi-Xcal)2	0,822915895	0,72421835	0,647052024	1,022891762
<b>μCal (mg/l)</b>	<b>0,00955102</b>	<b>0,008405505</b>	<b>0,007509889</b>	<b>0,011872003</b>

concentraciones de patrones	0,084 mgL <sup>-1</sup>	0,164 mgL <sup>-1</sup>	0,328 mgL <sup>-1</sup>	0,657 mgL <sup>-1</sup>
μCal (mgL <sup>-1</sup> )	0,00955102	0,008405505	0,007509889	0,011872003
Relativizar	0,113702621	0,051253082	0,022896003	0,018070019
Cuadráticamente	0,012928286	0,002626878	0,000524227	0,000326526
sumatoria cuadrática	<b>0,016405917</b>			

## 8. FUENTE DE ERROR Nº 3 ASOCIADA A LA INCERTIDUMBRE DE LA PRECISIÓN DEL MÉTODO EN ESTUDIO

Se evalúan mediante el análisis estadístico de una serie de observaciones, calculando la desviación típica en condiciones de reproducibilidad, de acuerdo a los datos obtenidos en la validación resulta que:

$$\mu = \frac{S_r}{\sqrt{n}}$$

Referencias:

S<sub>r</sub>= Desviación estándar obtenida en las muestras en condiciones de reproducibilidad.

n= número de repeticiones que se realizan por cada serie.

$$\mu = \frac{S_r}{\sqrt{n}} = \frac{0,001}{\sqrt{10}} = 0,0003 \text{ mg/l}$$

Relativizando:

$\mu$ mg/l	concentración mg/l	$\mu$ relativa
0,00032	0,084	<b>0,004</b>

$\mu$  r precisión= **0,004**

## 9. FUENTE DE ERROR Nº 4 ASOCIADA A LA INCERTIDUMBRE DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO EN ESTUDIO

Desviación estándar del patrón nitrito de sodio para una concentración de 0,0164 mg/l, en la validación del método.

Dosificación mg/l	Abs 543 nm	Resultados cc mg/l	Recuperación (%R)
0,164	0,157	0,166	101
0,164	0,155	0,164	100
0,164	0,151	0,160	98
<b>Media</b>		0,1634	100
<b>DS</b>		<b>0,0031</b>	<b>1,877</b>
<b>CV%</b>		1,8843	1,884

La incertidumbre asociada a la pureza del patrón de nitrito de sodio fue tomada de la tabla 8 del presente trabajo, por lo tanto los cálculos finales para la incertidumbre relativa total de la exactitud es:

Incertidumbre estándar	valor x	$\mu$ relativa
0,00057 g	0,9999 g	0,000570
0,0031 mgL <sup>-1</sup>	0,1634 mg/l	0,019
$u(p; q) = \sqrt{(\mu/p)^2 + (\mu/q)^2}$		<b>0,019</b>

## 10. TABLA DE DISTRIBUCIÓN T-STUDENT

TABLA Nº 22 DE LA DISTRIBUCIÓN  $t$ -Student con  $n$  grados de libertad

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

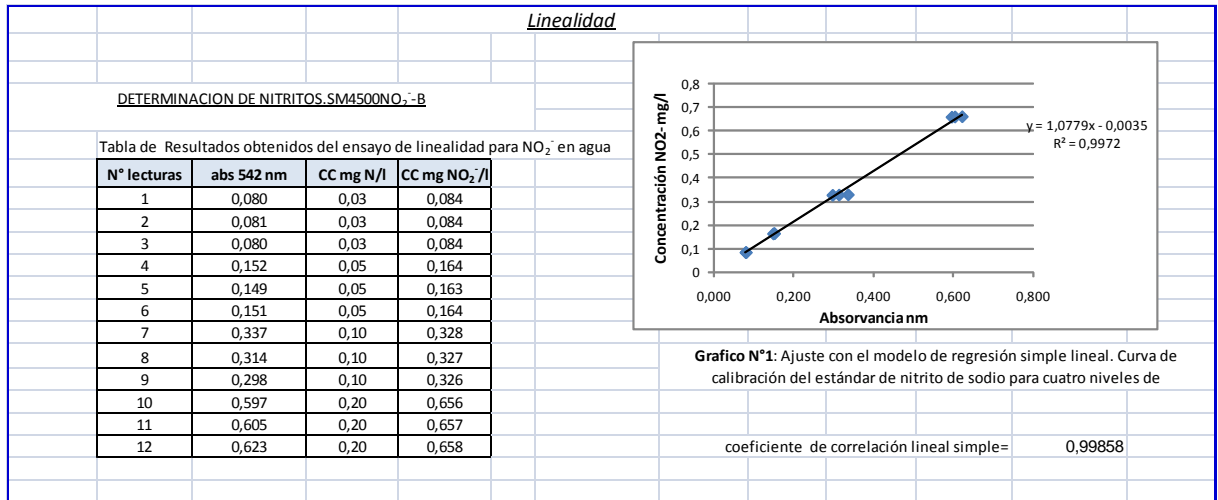
11. TABLA DE FISHER



		Grados de libertad para el numerador																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	
Grados de libertad para el denominador	1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	244	246	248	249	250	251	
	2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.5	19.5
	3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	
	4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	
	5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	
	6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	
	7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	
	8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	
	9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	
	10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	
	11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	
	12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	
	13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	
	14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	
	15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	
	16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	
	17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	
	18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	
	19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	
	20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	
	21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	
	22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	
	23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	
	24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	
	25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79		
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69		
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59		
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50		
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39		



## 8. Anexo II



Resumen						
<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coefficiente de correlación múltiple	0,998506772					
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,997015774					
R <sup>2</sup> ajustado	0,996717351					
Error típico	0,013148675					
Observaciones	12					
$F > F_{crit}$	Se rechaza H <sub>0</sub>					
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	F <sub>crit</sub> < F
Regresión	1	0,577609374	0,577609374	3340,952357	5,83177E-14	hay regresion lineal
Residuos	10	0,001728876	0,000172888			
Total	11	0,57933825				
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,002894716	0,006586682	-0,439480116	0,669658769	-0,017570758	0,01178133
Variable X 1	1,077246564	0,01863717	57,80097194	5,83177E-14	1,03572036	1,11877277
contiene al cero						

Análisis de los residuales			
Observación	Pronóstico para Y	Residuos	Residuos estándares
1	0,083285009	0,000714991	0,057031496
2	0,083285009	0,000714991	0,057031496
3	0,083285009	0,000714991	0,057031496
4	0,160846762	0,003153238	0,251519196
5	0,157615022	0,006384978	0,509300099
6	0,159769515	0,004230485	0,337446164
7	0,360137376	-0,032137376	-2,563449602
8	0,335360705	-0,007360705	-0,58712935
9	0,31812476	0,00987524	0,787702129
10	0,640221483	0,016778517	1,33834459
11	0,648839455	0,008160545	0,65092885
12	0,668229893	-0,011229893	-0,895756564
desviacion estandar S <sub>X<sub>Y</sub></sub>		0,012536769	
pendiente de la curva b		1,077	
S <sub>X<sub>Y</sub></sub> /b		0,011640454	

Cálculo de t para  $\beta_1$  ( $\alpha=0,05$ )

Tabla para Prueba de hipótesis para evaluar la ecuación de regresión lineal

n° de Obs	Absorbancia (X)	Concentración (Y)	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	X . Y
1	0,080	0,084	0,006400	0,0070560	0,006720
2	0,081	0,084	0,006561	0,0070560	0,006804
3	0,080	0,084	0,006400	0,0070560	0,006720
4	0,152	0,164	0,023104	0,0268960	0,024928
5	0,149	0,163	0,022201	0,0265690	0,024287
6	0,151	0,164	0,022801	0,0268960	0,024764
7	0,337	0,329	0,113569	0,1082410	0,110873
8	0,314	0,328	0,098596	0,1075840	0,102992
9	0,298	0,327	0,088804	0,1069290	0,097446
10	0,597	0,656	0,356409	0,4303360	0,391632
11	0,605	0,657	0,366025	0,4316490	0,397485
12	0,623	0,658	0,388129	0,4329640	0,409934
$\Sigma$	3,467	3,698	1,498999	1,7192320	1,604585
( $\Sigma X \cdot \Sigma Y$ )	12,820966				
<b>Sumatorias al cuadrados</b>	12,020089	13,675204			

**Datos utilizados**

Ecuación de la recta=  $y=1,0779x-0,0035$

n= **12**

$\beta_1=$  **1,0779**

$\beta_0=$  **-0,0035**

grados de libertad n-2 = **10**

( $S_{yy}-\beta_1 \cdot S_{xy}$ )= **0,001692766**

**Ecuaciones utilizadas**

$S_{xy}=(\Sigma(X \cdot Y)-(\Sigma X \cdot \Sigma Y)/n)$  0,536171167

$S_{xx}=\Sigma X^2-(\Sigma(X^2)/n)$  0,497324917

$S_{yy}=(\Sigma Y^2)-(\Sigma(Y^2)/n)$  0,579631667

$\sigma^2=(S_{yy}-\beta_1 \cdot S_{xy})/n-2$  0,000169277

var ( $\beta_1$ )=  $\sigma^2/S_{xx}$  0,000340374

Desv. Típ. ( $\beta_1$ )= $\sqrt{\sigma^2/S_{xx}}$  0,018449235

**( $\alpha/2$ ; n-2)**

Para  $\beta_1=0$

**t muestral=** ( $\beta_1/S_{\beta_1}$ )

**t muestral=** **58,42518584**

**t crítico=** tabular ( $\alpha/2$ ; n-2)

**t crítico=** **2,228**

**Se rechaza la hipótesis nula que  $\beta_1=0=0$**

**$t_m > t_c$**

### Límites lineales

#### Limite de cuantificación

Concentración= **0,084 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/l**

Tabla de Resultados obtenidos del ensayo de limite de cuantificación para NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en agua

N° lecturas	ABS nm	CC mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /l
1	0,08	0,084
2	0,082	0,085
3	0,082	0,085
4	0,080	0,084
5	0,081	0,084
6	0,080	0,084
7	0,080	0,084
8	0,080	0,084
9	0,080	0,084
10	0,082	0,085
<b>Muestra</b>	10	10
<b>Media</b>	0,0807	0,084
<b>desviación estándar</b>	0,0009	0,00048
<b>CV %</b>	<b>1,2</b>	<b>0,6</b>

#### Limite de Detección

Concentración= **0,042 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/l** 50% de 0,084 mgNO<sub>2</sub><sup>-</sup>/l

Tabla de Resultados obtenidos del ensayo de limite de detección para NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en agua

N° lecturas	ABS nm	CC mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /l
1	0,04	0,042
2	0,038	0,0370
3	0,045	0,045
4	0,035	0,035
5	0,037	0,036
<b>Media</b>	0,039	0,039
<b>desviación estándar</b>	0,0038	0,0043
<b>CV %</b>	<b>9,8</b>	<b>11,0</b>

## PRECISIÓN

### REPETIVIDAD

Tabla de Resultados obtenidos del ensayo de repetividad para  $\text{NO}_2^-$  en agua para analista 1

Analista 1	Determinación	Lectura abs	Concetración
	1	0,079	0,083
	2	0,08	0,083
	3	0,079	0,083
	4	0,08	0,084
	5	0,079	0,083
	6	0,079	0,083
	7	0,08	0,084
	8	0,08	0,084
	9	0,081	0,085
	10	0,081	0,085
	<b>Media</b> $\text{mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$		0,084
	<b>Desviación estándar</b> $\text{mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$		0,0008
	<b>CV%</b>		0,98

**Repetividad límite,  $r = 0,0023$**

**Analista 2      día 2**

Tabla de Resultados obtenidos del ensayo de repetividad para  $\text{NO}_2^-$  en agua para analista 2

	Determinación	Lectura abs	Concetración
	1	0,080	0,084
	2	0,083	0,087
	3	0,080	0,084
	4	0,080	0,084
	5	0,083	0,087
	6	0,080	0,084
	7	0,080	0,084
	8	0,082	0,085
	9	0,079	0,083
	10	0,084	0,088
	<b>Media</b>		0,085 $\text{mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$
	<b>s</b>		0,001 $\text{mg NO}_2^- \text{L}^{-1}$
	<b>CV%</b>		1,18

**Repetitividad límite,  $r = 0,0028$**

PRESICIÓN INTERMEDIA: Reproducibilidad				
Se evaluaron los datos correspondientes a los dos analistas				
Tabla de Resultados obtenidos del ensayo de reproducibilidad para NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> en agua				
	Lectura abs	mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /l		
1	0,079	0,083		
2	0,08	0,083		
3	0,079	0,083		
4	0,08	0,084		
5	0,079	0,083		
6	0,079	0,083		
7	0,08	0,084		
8	0,08	0,084		
9	0,081	0,085		
10	0,081	0,085		
11	0,080	0,084		
12	0,083	0,087		
13	0,080	0,084		
14	0,080	0,084		
15	0,083	0,087		
16	0,080	0,084		
17	0,080	0,084		
18	0,082	0,085		
19	0,079	0,083		
20	0,081	0,088		
	<b>Media</b>	0,084	mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> L <sup>-1</sup>	
	<b>Desv. Estándar</b>	0,001	mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> L <sup>-1</sup>	
	<b>CV%</b>	1,73		
<b>Reproducibilidad limite, R = 0,00409</b>				

<b>Precisión: Criterios de aceptación</b>			
<i>Test de Fisher</i>			
$F =$	$\frac{S^2_{(1)}}{S^2_{(2)}}$		
$n-1=$	9		
Confianza =	95%		
<b><math>F_{(9,9;95)} = 3,18</math></b>			
$S^2_{(1)}=$	0,00000064		
$S^2_{(2)}=$	0,000001		
<b><math>F = 0,64</math></b>			
No hay diferencias estadísticamente significativas entre las repetibilidades		<b><math>F_{EXP} &lt; F_{TAB}</math></b>	

<b>EXACTITUD</b>			
Tabla de Resultados de las recuperaciones obtenidas			
<b>Dosificacion mgL<sup>-1</sup></b>	<b>Abs 543</b>	<b>Resultados cc mgL<sup>-1</sup></b>	<b>Recuperacion (%R)</b>
0,084	0,080	0,084	100
0,084	0,081	0,085	101
0,084	0,080	0,084	100
Media		<b>0,0843</b>	<b>100</b>
DS		<b>0,0006</b>	<b>0,6873</b>
CV%		<b>0,6846</b>	<b>0,6846</b>
0,164	0,157	0,1660	101
0,164	0,155	0,1642	100
0,164	0,151	0,1600	98
Media		<b>0,1634</b>	<b>99,6</b>
DS		<b>0,0031</b>	<b>1,8774</b>
CV%		<b>1,8843</b>	<b>1,8843</b>
0,383	0,372	0,3976	104
0,383	0,370	0,3962	103
0,383	0,371	0,3969	104
Media		<b>0,3969</b>	<b>103,6</b>
DS		<b>0,0007</b>	<b>0,1828</b>
CV%		<b>0,1764</b>	<b>0,1764</b>
<b>Media total</b>			<b>101</b>
<b>DS total</b>			<b>2,17</b>
<b>CV% total</b>			<b>2,14</b>

$$t_{\text{exp}} = \frac{(100 - \bar{R}) \times \sqrt{n}}{CV\%}$$

Donde;

El 100 % es el valor verdadero o esperado

R es la recuperación media

CV% es el coeficiente de variación porcentual

n es el número de repeticiones

t <sub>exper</sub> =	<b>1,71</b>	
t <sub>tab</sub> =	<b>2,31</b>	
α	0,05	nivel de confianza
α/2	0,025	
v n-1	8	grados de libertad

**Incertidumbre de la curva de calibración en el espectrofotómetro uv-visible**

$$\mu_{cal} = (S_{y/x}/b) + \sqrt{1/m + 1/n + (x_{pred} - \bar{X}_{cal})^2 / \sum (X_i - \bar{X}_{cal})^2}$$

	Concentración de los patrones de la curva de calibración			
Xi =	0,084	0,164	0,328	0,657
Sy/x =	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125
b =	1,077	1,077	1,077	1,077
m =	3	3	3	3
n =	12	12	12	12
Xpred =	0,084	0,164	0,328	0,657
Xcal =	0,3083	0,3083	0,3083	0,3083
(Xpred-Xcal)2 =	0,05031049	0,02082249	0,00038809	0,12159169
(Xi-Xcal)2 =	0,05031049	0,02082249	0,00038809	0,12159169
∑(Xi-Xcal)2 =	0,19311276	0,19311276	0,19311276	0,19311276
(Xpred-Xcal)2/ ∑(Xi-Xcal)2 =	0,26052	0,10783	0,00201	0,62964
1/m =	0,333333333	0,333333333	0,333333333	0,333333333
1/n =	0,083333333	0,083333333	0,083333333	0,083333333
Sy/x / b =	0,011606314	0,011606314	0,011606314	0,011606314
1/m+1/n+(Xpred-Xcal)2/ ∑(Xi-Xcal)2	0,67719	0,52449	0,41868	1,04631
√1/m+1/n+(Xpred-Xcal)2/ ∑(Xi-Xcal)2	0,822915895	0,72421835	0,647052024	1,022891762
<b>μCal (mg/l)</b>	0,00955102	0,008405505	0,007509889	0,011872003
concentraciones de patrones	0,084 mgL <sup>-1</sup>	0,164 mgL <sup>-1</sup>	0,328 mgL <sup>-1</sup>	0,657 mgL <sup>-1</sup>
μCal (mg/l)	0,00955102	0,008405505	0,007509889	0,011872003
Relativizar	0,113702621	0,051253082	0,022896003	0,018070019
Cuadráticamente	0,012928286	0,002626878	0,000524227	0,000326526
sumatoria cuadrática	0,016405917			

**Combinando por tramos**

$$u(p; q) = \sqrt{(u/p)^2 + (u/q)^2} \quad \mathbf{0,128085584}$$

esto explica que la mayor incertidumbre esta relacionada a la lectura de la curva en el instrumental

**Incertidumbre asociada a la precisión del método**

$$\mu = \frac{S_r}{\sqrt{n}} = \frac{0,001}{\sqrt{10}} = 0,00032 \text{ mgL}^{-1}$$

Relativizando μ

μ mgL <sup>-1</sup>	cc mgL <sup>-1</sup>	μ <sub>relat</sub>
0,00032	0,084	0,004

Sumando cuadráticamente y relativizando

**μ R precision = 0,004**



<b>Incertidumbre asociada a la exactitud del método</b>				
<b>1. Incertidumbre asociada al certificado del material patrón</b>				
MC= 0,999 g ± 0,001g				
$\mu_{\text{Purezza (nitrito de sodio)}} = 0,00057\text{g}$				
<b>2. Incertidumbre asociada a la desviación estándar mas significativa del material patrón con un cv % = 1,88%</b>				
Dosificación mgL <sup>-1</sup>	Abs 543	Resultados cc mgL <sup>-1</sup>		Recuperacion (%R)
0,164	0,157	0,166		101
0,164	0,155	0,164		100
0,164	0,151	0,160		98
<b>Media</b>		0,1634		100
<b>DS</b>		0,0031		1,877
<b>CV%</b>		1,8843		1,884
Por lo tanto la incertidumbre de la exactitud es				
Incertidumbre estandar	valor x	$\mu_{\text{relat}}$	<b>calculos Aux.</b>	
0,00057 g	0,9999 g	0,000570	0,0000032496	potencia
0,0031 mgL <sup>-1</sup>	0,1634 mgL <sup>-1</sup>	0,019	0,00035993103	potencia
$u_c(x) = \sqrt{\left(\frac{0,00057}{0,9999}\right)^2 + \left(\frac{0,0031}{0,1634}\right)^2}$		0,019	0,00036025599	sumatoria
			0,019	raiz cuadrada