



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: CALAHORRANO PACCHA, RAMIRO RUBÉN

TEMA: VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO
DE MEDICIÓN DE CARBÓN ORGÁNICO DISUELTO Y
CONDUCTIVIDAD PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD DE
AGUA.

DIRECTOR: QUIM. ERIKA MURGUEITIO MG.

CODIRECTOR: ING. RAFAEL VARGAS VERDESOTO

SANGOLQUÍ, AGOSTO 2014

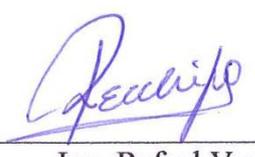
CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la RAMIRO RUBÉN CALAHORRANO PACCHA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, agosto de 2014

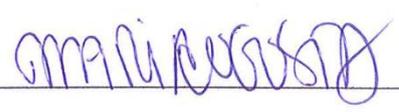


Quim. Erika Murguétio Mg.
DIRECTOR



Ing. Rafael Vargas
CODIRECTOR

REVISADO POR:



Dra. María Augusta Chávez

DIRECTORA DE LA CARRERA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Ramiro Rubén Calahorrano Paccha

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE MEDICIÓN DE CARBÓN ORGÁNICO DISUELTO Y CONDUCTIVIDAD PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD DE AGUA” ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las página correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración me responsabilizo de su contenido, veracidad y alcance científico.

Sangolquí, agosto de 2014



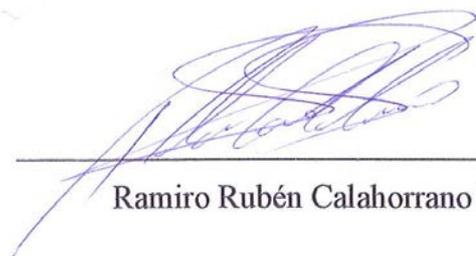
Ramiro Rubén Calahorrano Paccha

AUTORIZACIÓN

Yo, Ramiro Rubén Calahorrano Paccha

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución el trabajo “VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE MEDICIÓN DE CARBÓN ORGÁNICO DISUELTO Y CONDUCTIVIDAD PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD DE AGUA” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, agosto de 2014



Ramiro Rubén Calahorrano Paccha

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a DIOS, por darme la vida, a mi madre Cecilia, que desde el cielo, es un ángel que me guía y me cuida, a mi mamita Leonor, quien siempre se preocupa y me aconseja, a mi padre Ramiro, gracias a su apoyo se alcanzó esta meta, a mis hermanos Lucho y Gaby, a mi abuelo Lucho que desde el cielo me guía, y a todos mis familiares quienes esperaron con ansias esta meta alcanzada.

A quien se convirtió en un eje fundamental, Cristina P., que gracias a su apoyo, cariño y esfuerzo, supo darme el impulso necesario para concluir este proyecto, esta dedicatoria con mucho cariño para ti.

A mi hermosa facultad de Ingeniería en Biotecnología, especialmente a María Augusta Chávez, Erika Murgueitio, por creer en mí, Rafael Vargas por su apoyo, Geomar Zumárraga, quien fue como una madre para mí, este trabajo se lo dedico a usted y a todos quienes conforman mi linda facultad como docentes y amigos.

Al Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM) de la Escuela Politécnica Nacional, Carola Fierro, por darme más que un lugar de trabajo, una hermosa familia, los quiero infinitamente.

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su generoso amor.

Rubencho

AGRADECIMIENTO

A mi madre, que nunca se apague esa estrellita en el cielo reflejada desde allí en mi querida Mamita Leonor, a mi padre, cuya vida me enseñó que siempre se puede ser mejor, a mis hermanos que con sus consejos me han ayudado, a mis familiares en general por todo su apoyo, agradezco todos sus consejos.

A mi hermosa facultad de Ingeniería en Biotecnología, y a todos quienes la conforman como docentes y amigos quienes han dejado en mi todo su conocimiento y amistad.

Al Centro de Investigaciones y Control Ambiental de la Escuela Politécnica Nacional, Carola Fierro, Cristina Torres, Anita Velasco, Nelson Salazar, Patricia Corella, Don Tibaldo, Cristina Pavón, Jimena Cahuasquí, Martín Ortiz, especialmente a Carito por darme una oportunidad, regalarme su amistad y enorme cariño.

A Cristina Pavón por todo, gracias por creer en mí.

A mi querido amigo Alejo Lascano, a quien agradezco ese infinito apoyo, fe y admiración espero nunca defraudarte querido amigo, te espero en la meta.

A Sole, Jael, Gato Nel, Paul, Tiguar, Alexito, Sebas, Shojita, Diego, Diana, entre otros, todas esas personas importantes en todo este tiempo que llegaron y partieron de mi vida, dejándome todas sus enseñanzas y por aquellas de quienes sigo aprendiendo cada día

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su generoso amor.

Rubench

LISTADO DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	2
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	3
AUTORIZACIÓN	4
DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTO	6
LISTADO DE CONTENIDOS	7
LISTADO DE TABLAS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	12
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	12
1.2 JUSTIFICACIÓN	14
1.3 OBJETIVOS.....	16
1.3.1 <i>Objetivo General</i>	16
1.3.2 <i>Objetivos Específicos</i>	17
1.4 MARCO TEÓRICO.....	17
1.4.1 <i>Trabajos relacionados y o complementarios al presente proyecto</i>	17
1.4.2 <i>Calidad en laboratorios de análisis de agua</i>	19
1.4.3 <i>Carbono orgánico</i>	20
1.4.4 <i>Conductividad</i>	24
1.5 SISTEMA DE HIPÓTESIS	27
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1 PARTICIPANTES.	28
2.1.1 <i>Instituciones</i>	28
2.1.2 <i>Responsable del proyecto</i>	28
2.1.3 <i>Colaboradores científicos</i>	28
2.2 ZONA DE ESTUDIO.	29
2.2.1 <i>Laboratorio</i>	29
2.2.2 <i>Campo</i>	29
2.3 PERIODO DE TIEMPO DE INVESTIGACIÓN.....	29
2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
2.4.1 <i>Diseño experimental para la validación de carbono orgánico disuelto</i> .	29
2.4.2 <i>Diseño experimental para la validación del método de análisis de conductividad electrolítica</i>	31
2.5 PROCEDIMIENTO.....	32
2.5.1 <i>Conductividad electrolítica</i>	32

2.5.2	<i>Carbono orgánico disuelto</i>	35
2.6	<i>Análisis de datos</i>	39
2.6.1	<i>Validación de carbón orgánico disuelto</i>	39
2.6.2	<i>Validación de conductividad electrolítica</i>	62
2.6.2.1	<i>Cálculo de la precisión</i>	62
2.6.2.2	<i>Cálculo de la incertidumbre de medida</i>	64
2.6.2.3	<i>Cálculo del factor de cobertura (K)</i>	65
2.6.2.4	<i>Cálculo de la exactitud del método</i>	65
2.6.2.5	<i>Intervalo de trabajo</i>	66
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		67
3.1	<i>Resultados de la validación de carbón orgánico disuelto</i>	67
3.2	<i>Resultados de la validación de conductividad electrolítica</i>	69
CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES		71
CAPÍTULO 5: RECOMENDACIONES		73
BIBLIOGRAFÍA		74

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.....	26
Tabla 2.....	33
Tabla 3.....	35
Tabla 4.....	36
Tabla 5.....	48
Tabla 6.....	49
Tabla 7.....	62
Tabla 8.....	63
Tabla 9.....	70

RESUMEN

El principal objetivo del presente trabajo es la validación e implementación de un método de medición de carbono orgánico disuelto y conductividad para el control de la calidad de agua potable debido a que el carbón orgánico disuelto permite conocer de una forma rápida la presencia de materia orgánica que favorece la formación de biofilms, medio que favorece la proliferación de microorganismos patógenos, así también en casos de excesiva cloración puede darse la formación de compuestos organoclorados cancerígenos a su vez la conductividad electrolítica es un indicador breve de la concentración de sales disueltas mismos que en las condiciones adecuadas pueden fomentar la capacidad corrosiva o incrustante de las redes de distribución del líquido vital. Para la validación de conductividad se empleó un equipo medidor de conductividad marca HACH, modelo SensION 5, el mismo que fue puesto a punto para las mediciones, se lo calibro en cada punto desde 0,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ hasta 12,86 mS/cm empleando material de referencia certificado en cada nivel: 0,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$; 15,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$; 147 $\mu\text{S}/\text{cm}$; 1410 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y 12860 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Se realizaron cinco repeticiones en cada nivel durante tres días, posteriormente empleando un DCA y ANOVA se obtuvo: CV_r , todos inferiores a 7%, CV_R inferiores a 7,5%, la recuperación estuvo situada entre el 105% y 99% respectivamente, los valores de incertidumbre para cada punto fueron: 122% para 0,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y entre 2,5 y 4% para los niveles entre 15,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y 12860 $\mu\text{S}/\text{cm}$. El único nivel excluido de la validación fue 0,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ debido al aporte de la incertidumbre del material de referencia que fue el más alto e impidió su validación, el resto de niveles cumplió con los objetivos de validación. El parámetro de carbono orgánico disuelto, (DOC) por sus siglas en inglés, fue validado bajo el método APHA 5310B del standard methods for analysis of water and waste water, se empleó un medidor de carbono orgánico total marca Shimadzu modelo TOC-5050 A, con catalizador normal, el gas transportador fue aire sintético con <1ppm de CO_2 y THC, el método se validó obteniéndose un L.D. de 0,35mg/L; L.C. de 1,16 mg/L; % de recuperación entre 91,3 y 95,2% y finalmente una incertidumbre para TOC y DOC de 26,49%, considerándose así validado el rango de trabajo entre 1,156 – 20 mg/L cumpliendo todos los objetivos de validación.

Palabras Clave: *Carbon orgánico disuelto, DCA, ANOVA, CV_r , CV_R , $\mu\text{S}/\text{cm}$, material de referencia, THC, L.D., TOC, incertidumbre, validación.*

ABSTRACT

The main objective of this work is to validate and implement a method for measuring dissolved organic carbon and conductivity for the quality control of the drinking water as a quick way to know the presence of organic matter that favors the formation of biofilms, a medium that favors the proliferation of pathogenic microorganisms, also in cases of excessive chlorination and the formation of organochlorine compounds which are carcinogenic can occur. The electrolytic conductivity is a brief indicator of dissolved salts concentration that in the suitable conditions may promote corrosive or scale capacity of water in the distribution pipes. To validate a conductivity method, a conductivity meter HACH brand, model was SensION 5 was used, the same that was tuned for measurements, at each point it was calibrated from 0.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ to 12.86 mS/cm , a certified reference material for calibration was used and as a sample on every level: 0.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$; 15.2 $\mu\text{S}/\text{cm}$; 147 $\mu\text{S}/\text{cm}$; 1410 $\mu\text{S}/\text{cm}$ and 12860 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Five replicates were performed at each level for three days, previously a ANOVA DCA was obtained: CVr, all less than 7%, less than 7.5% CVR, recovery was located between the 105% and 99% respectively, the uncertainty values for each point were 122% to 0.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ and between 2.5 and 4% for levels between 15.2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ and 12860 $\mu\text{S}/\text{cm}$. The only excluded validation level was 0.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ due to the contribution of uncertainty of the reference material that was the highest and made it impossible for the validation at this level, the other levels accomplished the validation objectives. The parameter of dissolved organic carbon (DOC), was validated under the APHA 5310B method of standard methods for analysis of water and waste water, for the validation was used a total organic carbon analyzer brand Shimadzu, model TOC-5050 A, with normal catalyst, the carrier gas was synthetic air with less than 1 ppm of CO₂ and THC, the method was validated obtaining: LD of 0,35mg / L; L.C. 1,16 mg / L; Recovery between 91,3% and 95,2% and finally an uncertainty for TOC and DOC of 26.49%, so the working range was situated between 1.156 to 20 mg / L accomplishing all the objectives of validation.

Keywords: *Dissolved Organic Carbon, DCA, ANOVA, rVC, CVR, mS / cm, reference materials, THC, LD, OCD, uncertainty, validation.*

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El agua es un recurso fundamental de la humanidad por ende este debe ser precautelado, es así que en el Ecuador dentro del Plan Nacional del Buen Vivir se consideran los objetivos cuarto “Garantizar los derechos de la naturaleza y promover un ambiente sano y sustentable” y tercero “Mejorar la calidad de vida de la población”, promoviendo así la buena calidad de este recurso para todos sus fines (SENPLADES, 2009).

En este contexto se muestra la importancia de la calidad del agua, para lo que es relevante una evaluación adecuada, así instituciones como el Organismo de Acreditación Ecuatoriano (OAE), cuya misión es “Acreditar la competencia técnica de los organismos que operan en materia de evaluación de la conformidad” (OAE, 2013), evalúan la capacidad técnica de laboratorios de análisis, es decir se encarga de velar que los laboratorios de análisis entreguen resultados verdaderos, empleando métodos precisos y exactos además de veraces.

El Centro de Investigaciones y Control Ambiental de la Escuela Politécnica Nacional creado en el año de 1997 como parte del programa de Ciencia y Tecnología BID-FUNDACYT, ha sido el resultado a la necesidad de un centro de investigaciones que permita abordar múltiples problemas ambientales y que además proporcione servicios a entidades cuyo ámbito de acción esté relacionado con el medio ambiente y que brinde facilidades para controlar, prevenir y dar soluciones a problemas ambientales, tanto a nivel local como regional, de esta forma el CICAM, por sus siglas, está en la facultad de desarrollar proyectos e investigaciones a fin de proporcionar los servicios antes mencionados (Fierro, Centro de Investigaciones y Control Ambiental, 2012).

La evaluación técnica se lleva a cabo en el marco de la norma ISO/IEC 17025 donde se describen todos los requerimientos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración si desean demostrar que son técnicamente competentes y capaces de producir resultados técnicamente válidos, asegurando así su credibilidad y calidad (ISO, 2013).

Dada la importancia de la calidad del agua especialmente para consumo humano cabe mencionar algunos análisis de importancia como lo son la conductividad electrolítica y el carbón orgánico total.

La conductividad electrolítica en este contexto se define como la cantidad de iones disueltos en una matriz acuosa que permiten la conducción de electricidad a través de la misma (APHA, AWWA, & WEF, 2012), entonces es también un parámetro indicador que define por medio del índice de Langelier, la ecuación de la capacidad corrosiva o incrustante de una matriz acuosa, conocer si el líquido es incrustante o corrosivo (Chi Wu & Berezansky, 1995), en estos términos se puede conocer si el líquido puede afectar las diversas redes de distribución de agua potable, para así tomar decisiones que ayuden a mantener las mencionadas redes en buen estado para el transporte del líquido vital (Terence, 2001).

El Carbón Orgánico Total (TOC) por sus siglas en inglés, es un parámetro indicador del contenido de materia orgánica presente en el líquido vital (APHA, AWWA, & WEF, 2012), se considera un método de análisis rápido, efectivo y de bajo costo cuya importancia radica en que la presencia de materia orgánica en los procesos de cloración puede generar compuestos que se han demostrado son cancerígenos en bajas concentraciones (OMS, 2012), así también la materia orgánica presente en una matriz acuosa puede ser fácilmente empleado por microorganismos presentes que a su vez representan un riesgo para la salud como lo son las bacterias coliformes y enterobacterias en general (Reynolds, 2007).

La finalidad del presente proyecto radica en la validación e implementación de un método de medición de carbón orgánico disuelto y conductividad en aguas para su aplicación en muestras reales provenientes de la red de distribución de agua potable del cantón Rumiñahui y de esta forma evaluar la calidad de las mismas además de conocer si estas pudieran presentar o no contaminación por materia orgánica o si son o no corrosivas o incrustantes.

1.2 Justificación

El Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM) de la Escuela Politécnica Nacional (EPN) en su afán de colaborar con los principios del Plan Nacional del Buen Vivir, presta servicios de análisis físico – químicos y microbiológicos en torno a la calidad del agua procurando que cada uno de ellos se encuentre debidamente acreditado ante la OAE bajo las normas INEN ISO/IEC 17025 en este contexto el CICAM tiene en bien brindar servicios de análisis validados y acreditados para así promover la calidad de sus servicios (Fierro, 2012).

Instituciones como el Gobierno Autónomo Descentralizado del Cantón Rumiñahui desde el año 2009 en su afán de velar por el bienestar de la comunidad y brindar calidad en sus servicios ha delegado a la Dirección de Agua Potable del cantón y en contratación al CICAM de la Escuela Politécnica Nacional para el monitoreo y análisis de la calidad de este recurso en función de la norma INEN 1108:2011 cuarta revisión (Rumiñahui, 2013).

Mes a mes un equipo de técnicos de la Escuela Politécnica Nacional (EPN) y de la Dirección de Agua Potable del Municipio de Rumiñahui desde el año 2009 recogen un total de 85 muestras mensuales en diferentes puntos del cantón a fin de dar un control al servicio de agua potable, dentro de los análisis que se realizan son de dos tipos: físico - químicos y microbiológicos. (Rumiñahui, 2013). Los análisis realizados a nivel microbiológico contemplan la cuantificación del número más probable de

coliformes fecales y totales, así también los análisis físico-químicos contemplan en varias muestras conductividad, turbidez, pH y metales pesados varios (Rumiñahui, 2013).

Actualmente el municipio del cantón Rumiñahui ha considerado la importancia de evaluar la cantidad de carbón orgánico total en sus redes de suministro, al tomar en cuenta su importancia como un índice de calidad por diferentes aspectos (Fierro, Analisis de calidad de agua potable en el cantón Rumiñahui, 2013). Uno de estos aspectos es la insalubridad que ocasiona la formación de bio-film que puede ser detectado por la liberación de glucocalix, un polímero con amplio contenido de carbón orgánico (Piera, 2003), otro aspecto fundamental es el control de la red que al fraccionarse puede permitir la lixiviación de compuestos orgánicos, en algunos casos pesticidas de granjas, contaminantes resultantes de lixiviación entre otros que pueden deteriorar la calidad del agua potable (Eugene, 1986). En este contexto la medición de carbón orgánico disuelto en muestras de agua potable se establece como un índice de calidad del recurso, tanto que su presencia en agua para consumo humano en niveles elevados genera compuestos organoclorados los cuales han sido documentados como cancerígenos en dosis bajas (Castro & Benavides, 1987).

El carbón orgánico total disuelto o carbón orgánico disuelto en aguas representa un gran riesgo sanitario cuando estas matrices se emplean para el consumo humano, debido a que los compuestos carbonados de origen orgánico pueden interactuar en el proceso de cloración formando diferentes compuestos que se han clasificado por la USEPA (United States Enviromental Protection Agency) como cancerígenos con suficiente evidencia en estudios en animales como son: cloroformo, dibromoclorometano, bromoformo, ácido dicloroacético, tricloroacetnitrilo, 2,4,6-triclorofenol; entre otros (Lázaro, 2008).

La Conductividad es una clara medida de la cantidad de iones que se encuentran presentes en una solución es así que en las matrices acuosas de diversos tipos tenemos rangos muy amplios y variables tanto en aguas marinas, claras, residuales y de

diferentes usos como en el área industrial, farmacéutica y de laboratorio, donde la concentración de iones puede actuar de forma corrosiva en calderos, afectar una preparación inyectable o alterar un análisis de laboratorio, esto hace que sea importante determinar con precisión y exactitud este parámetro para asegurar que los datos obtenidos de cualquier medición sean veraces incluyendo las mediciones de carbón orgánico disuelto.

En este contexto, es necesario alcanzar objetivos que nos permitan lograr cuantificaciones con exactitud y precisión lo que representa también manejar una trazabilidad verificable y permitir una flexibilidad tanto en repetitividad como en reproducibilidad del método empleado (Guardado & Mercader, 2006).

Acorde al Organismo de Acreditación Ecuatoriano (OAE) los laboratorios de análisis acreditados deberán cumplir entre otras con la norma ISO/IEC 17025, obligados a mantener métodos validados para su acreditación, así también deberán dar trazabilidad a sus mediciones así como una razonable estimación de su incertidumbre de análisis a fin de garantizar la calidad de los medidos. En este marco se implementó los métodos de análisis de conductividad y carbón orgánico total previamente validados a fin de cubrir las crecientes necesidades del Centro de Investigaciones y Control ambiental de la Escuela Politécnica Nacional para la entrega de adecuados análisis a sus clientes entre otros el municipio del cantón Rumiñahui así como también su posterior acreditación ante la OAE para así asegurar el adecuado control de la calidad del agua potable entre otras matrices acuosas.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Validar e implementar un método de medición de carbono orgánico disuelto y conductividad para el control de calidad de agua para el centro de investigaciones y control ambiental de la Escuela Politécnica Nacional.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Alcanzar la puesta a punto de los equipos y desarrollar un manual de uso de equipos y un procedimiento específico de ensayo, tanto del equipo medidor de conductividad HACH SensION 5, como del Analizador de carbono orgánico total Shimadzu TOC 5050A.
- Desarrollar un procedimiento para la preparación de estándares para calibración del analizador de carbono orgánico total.
- Realizar ensayos, analizar estadísticamente los datos y determinar los resultados de la validación se encuentren dentro de valores razonables (inferiores al 35% en cuanto a incertidumbre, CVr, CVR, reproducibilidad, repetitividad, precisión y exactitud) para su posterior acreditación ante la OAE.
- Evaluar muestras reales de agua potable del cantón Rumiñahui.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Trabajos relacionados y o complementarios al presente proyecto

En el Ecuador y extranjero existen proyectos de investigación en el área de validación de métodos analíticos sin embargo no todos relacionados a la determinación de carbón total disuelto y sus fracciones orgánicas e inorgánicas disueltas en matrices acuosas también se han desarrollado investigaciones para validación de conductividad en matrices acuosas.

A continuación se presentan algunos de los artículos científicos más destacados:

- Aguiar Meugniot, R., Becerril Santa Cruz, S., Bonilla López, D., & et.al. (1 de Enero de 2013). Guía Técnica de Trazabilidad Metrológica e Incertidumbre de Medida en las Mediciones Analíticas que Emplean la Técnica de Medición de Conductividad Electrolítica. México.

El presente estudio es una guía con los últimos lineamientos de aplicación en general para la medición de conductividad electrolítica, lo que puede contribuir como una guía para el presente estudio.

- Suazo, M. F. (2012). VALIDACIÓN DEL SISTEMA COMPUTARIZADO DEL ANALIZADOR “TOC”. México, México. Recuperado el 25 de Mayo de 2014, de <http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/1779/tesis.pdf.pdf?sequence=1>

En el presente estudio se evalúa el control electrónico de un sistema de medición de TOC en flujo continuo, se habla también de una validación del método, lo que se acerca mucho a nuestro tema de interés sin embargo el equipo y las condiciones así como el fin del proyecto distan del presente tema de investigación.

- Sancho García, L. M. (Marzo de 2013). DISEÑO DE UN MÉTODO GENERAL DE VALIDACIÓN DE ENSAYOS QUÍMICOS DE CEMENTOS. Madrid, España. Recuperado el 24 de Mayo de 2014, de http://oa.upm.es/14980/1/PFC_Laura_Sancho_Garcia.pdf

En esta tesis se realiza un análisis profundo de los métodos de medición de TOC en piedra caliza como materia prima para la elaboración de cementos, también se realiza una validación de métodos, sin embargo el método elegido fue Rock Eval, que es diferente a la medición por luz infrarroja.

- Shimadzu. (2011). Cleaning Validation by TOC Analyzer. Obtenido de <http://www2.Shimadzu.com/applications/TOC/041.pdf>.

En este estudio se realiza un procedimiento para una validación limpia de TOC sin embargo el equipo empleado difiere significativamente en método y especificaciones por lo que es distinto a lo propuesto en el presente estudio, sin embargo se lo puede emplear como base para el presente estudio.

1.4.2 Calidad en laboratorios de análisis de agua

El primer comité acerca de calidad de aire y agua en 1971 enfocado hacia el mejoramiento de calidad desarrolló en 1987 la norma ISO 9000 conocido como el estándar de la gerencia de calidad, este último aplicable a cualesquier empresa que desarrolle productos y servicios (ISO, 2013).

Con respecto a los ensayos de laboratorio ISO ha desarrollado desde el año 2000 la norma de requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración conocida como la norma ISO/IEC 17025, la cual ha sido adoptada por los organismos de acreditación y competencia a nivel mundial y Ecuador no es la excepción, el Organismo de Acreditación Ecuatoriano, OAE por sus siglas, en su misión establece “Acreditar la competencia técnica de los organismos que operan en materia de evaluación de la conformidad” (OAE, 2013).

1.4.2.1 Validación de métodos analíticos

Según la norma INEN ISO/IEC 17025:2005 los laboratorios deberán validar los métodos no normalizados, normalizados o modificados de tal manera que se confirme su competencia para el fin previsto, la norma incluye como una nota, pero no

mandatoria el emplear técnicas como la calibración con materiales de referencia, comparación de resultados con otros métodos, programa interlaboratorios, evaluación sistemática de factores que afecten al desempeño del método y sobre todo la evaluación de la incertidumbre con conocimientos científicos y también prácticos (ISO, 2005).

1.4.3 Carbono orgánico

Se denomina Carbono Orgánico Total (TOC, siglas en inglés) al carbón que forma parte de las sustancias orgánicas de las aguas superficiales. Actualmente existen muchas sustancias naturales y artificiales que contribuyen a incrementar los niveles de TOC en el ambiente, no obstante, esta sustancia puede ser descompuesta por microorganismos, durante el proceso de consumo de oxígeno (Castro & Benavides, 1987). Los microorganismos están fuertemente involucrados en el ciclo del carbono interactuando con formas orgánicas como inorgánicas del mismo (Manahan, 2007).

1.4.3.1 Fuentes de carbón orgánico.

Las aguas naturales que más tarde se destinarán al consumo humano naturalmente pueden acarrear cantidades de carbono orgánico total provenientes de diferentes fuentes, por ejemplo, dentro de la matriz acuosa tenemos, bacterias, virus y microorganismos heterótrofos que se nutren de los minerales que arrastra en su curso el líquido vital como parte del ciclo del carbono transformándolos en carbón orgánico o materia orgánica (Baird, 2001). Otro aporte de carbón orgánico es el efecto de lixiviación, proveniente de vertederos, campos agrícolas, fugas de alcantarillado, derrames de hidrocarburos entre otros (Páez, 2010).

1.4.3.2 Ámbito medioambiental.

El parámetro de carbón orgánico total se emplea para el control de la calidad de agua de esta manera se puede caracterizar la materia orgánica presente, en EEUU normalmente la concentración en aguas subterráneas se encuentra alrededor de 1 ppm y en aguas superficiales alrededor de 5 ppm. (Baird, 2001). Por convención el carbono orgánico total se encuentra de forma suspendida y disuelta, al atravesar un filtro de 0.45 μm se considera carbón orgánico disuelto (APHA, AWWA, & WEF, 2012).

1.4.3.3 Riesgos para la salud

El carbón orgánico presente en agua para consumo humano representa a la materia orgánica, la forma de carbono orgánico disuelto en cuerpos de agua determina la presencia de hidratos de carbono, ácidos húmicos y fúlvicos entre otros compuestos presentes de forma natural por las diversas interacciones entre el líquido vital y el ecosistema (Lázaro, 2008), sin embargo el detrimento de la calidad del agua puede verse gravemente aumentado cuando en el cuerpo de agua se encuentran bacterias y compuestos químicos carbonáceos que sean nocivos para la salud o que representen un riesgo para la calidad organoléptica y físico-química del agua (Baird, 2001).

En los procesos de potabilización de agua para consumo humano, ya sea que esta proviene de fuentes subterráneas o superficiales, la presencia de carbón orgánico representa un gran riesgo para la salud humana por cuanto en dicho proceso la presencia de materia orgánica genera una interacción con el cloro libre en concentraciones elevadas, disminuyendo la actividad anti-microbiana del cloro y también estableciendo interacciones químicas que generan compuestos organoclorados representando así un riesgo para la salud humana inclusive en pequeñas concentraciones, todo esto evidenciado por USEPA (Lázaro, 2008) como compuestos con potencial riesgo carcinogénico.

1.4.3.4 Métodos de Análisis

Existen varias metodologías, descritas en el Standard Methods for Water and Waste Water edición 22, tales como la oxidación de alta temperatura (5310 B), la oxidación de persulfato calentado o persulfato- ultravioleta (5310 C) y oxidación húmeda (5310 D). (APHA, AWWA, & WEF, 2012). Para la oxidación de alta temperatura se emplea equipos medidores de luz infrarroja no dispersiva que en una longitud de onda no mayor a 4,3 μm pueden determinar la concentración de carbono que se encuentra en una muestra de naturaleza acuosa. (APHA, AWWA, & WEF, 2012)

1.4.3.5 Importancia del Carbón Orgánico Total

El contenido de carbono orgánico total en aguas para consumo humano es un indicativo de presencia de materia orgánica que puede provenir de varias fuentes (Reynolds, 2007). Como se ha mencionado antes su presencia significa un deterioro en la calidad de agua potable, por ende la importancia de su análisis para el control de la calidad tanto del recurso como de la línea de distribución y la calidad del servicio. Los factores que afectan la calidad del recurso agua en las redes de distribución, que podrían contribuir a su detrimento son:

1.4.3.5.1 Generación de bio-films en redes de distribución de agua potable

Las redes de distribución de agua potable son una fuente de preocupación con respecto a la contaminación del agua debido al crecimiento de microorganismos que resisten el proceso de potabilización, la proliferación de estos microorganismos genera una bio-película (Dominguez, y otros, 2010), una sustancia protectora formada de un polímero conocido como glucocalix, que forma un medio protector para los microorganismos lo que dificulta su eliminación y favorece la adhesión de otros microorganismos como la *Legionella* o el complejo *Mycobacterium Avium* los cuales generan efectos adversos para la salud (Reynolds, 2007).

Para que se forme bio-film se requiere de varios factores entre ellos: la disponibilidad de nutrientes en el agua, temperatura, la eficacia de desinfección, el tiempo de residencia, entre otros, las fuentes de nutrientes, en su mayoría pueden ser carbonáceas así el carbono presente como carbono orgánico disuelto, en su formas: lábil, asimilable o biodegradable están ampliamente asociados al crecimiento bacteriano, su disponibilidad luego del tratamiento permite que la presencia de organismos complejo *Mycobacterium Avium* (CMA) sean en promedio 25000 veces mayores en las redes de distribución que en la planta de tratamiento (Dominguez, y otros, 2010).

1.4.3.5.2 Presencia de materia orgánica en agua pre-tratada

La materia orgánica se compone básicamente de moléculas de origen carbonáceo, pueden ser hidratos de carbono, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, proteínas, aminoácidos, entre otras (Rodríguez, 2003), dependiendo del recurso sea este cuerpo de agua superficial o fuente subterránea, se ve expuesto a varios factores que contribuyen a su detrimento como son la contaminación antropogénica dada por lixiviación o por contacto con cuerpos de agua servida (Buitrón & Fernández, 2010), esta problemática afecta nuestro país ampliamente ya que no existe un adecuado seguimiento a los cuerpos de agua que en muchos casos puede acarrear no solo

microorganismos sino también metales pesados resultado de actividades mineras, representando así un riesgo para la salud de quienes consumen este líquido (SENAGUA, 2011).

1.4.3.6 Limites

Según la organización mundial de la salud, las interferencias entre la materia orgánica y el cloro se dan cuando los niveles de TOC se encuentran sobre los 4mg/L en un proceso de cloración de agua tratada para consumo humano (Levy, 2004). Por otro lado según el proyecto de norma de calidad de agua para consumo humano de los Estados Unidos Mexicanos se establece un límite más restrictivo de 2 mg/L. (Secretaria de Salud - Estados Unidos Mexicanos, 2006) Existen otras normativas como la de la división de protección ambiental del gobierno de Columbia Británica el cual establece que para aguas de consumo humano que han sufrido un tratamiento de desinfección por cloración debe ser menor a 4 mg/L (Fast, 2001). En Ecuador, tanto en la norma INEN: 1108 como en el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria (TULAS), libro seis, anexo uno, todas las tablas, como en otras normativas que rigen la calidad de agua para consumo humano no se establecen límites para este parámetro (MINISTERIO DEL AMBIENTE, 2003), con iguales resultados se revisó la propuesta TULSMA, sin embargo debe destacarse la importancia del mismo para asegurar un adecuado suministro de calidad y evitar el detrimento de la salud y bienestar de los usuarios del servicio.

1.4.4 Conductividad

La medida de conductividad electrolítica se define como la capacidad de conducir corriente eléctrica a través de una solución acuosa (APHA, AWWA, & WEF, 2012). Este fenómeno se realiza al someter la solución a un campo eléctrico donde los iones

de la solución se mueven en un sentido u otro de acuerdo a su carga propiciando así la migración iónica (Gómez, González, & Viruela, 2009).

1.4.4.1 Método de análisis

La conductividad de una disolución es la conductancia de la misma encerrada en un cubo de 1 cm^3 por lo tanto su medición se la realiza empleando una celda electrolítica típicamente según las especificaciones técnicas del equipo de medición se tiene una constante de celda y con ello se establece la conductancia específica de la solución realizando un proceso de calibración a temperatura constante, ya que la conductividad se ve influenciada por la temperatura, de esta manera obtenemos una conductancia específica respecto a un valor conocido, material de referencia certificado, el resultado de una medición se expresa en unidades internacionales, donde el inverso de la resistencia es la conductividad y se expresa en mili siemens/centímetros (mS/cm) o en micro Siemens sobre centímetro ($\mu\text{S/cm}$). El método comúnmente empleado en laboratorio es el descrito en la sección 2510B del Standard Methods for Water and Waste Water (APHA, AWWA, & WEF, 2012).

1.4.4.2 Importancia de la conductividad electrolítica

La conductividad electrolítica se emplea ampliamente en industrias, laboratorios y control ambiental. Dentro de los laboratorios, el empleo de la conductividad sirve para realizar un control de la calidad de agua empleada para los ensayos (Gómez, González, & Viruela, 2009). Es muy conocido que los diferentes métodos de ensayo pueden sufrir interferencias por la presencia de iones ajenos al analito, por lo que esta línea de control se vuelve importante, especialmente cuando el analito en cuestión se encuentra de forma común en aguas purificadas (Chi Wu & Berezansky, 1995).

1.4.4.3 Relación de la conductividad electrolítica con otros parámetros

La conductividad electrolítica está relacionada a la cantidad de iones presentes en una disolución, por lo tanto está relacionada también directamente a los iones que pudieran encontrarse presentes y su concentración (Aquarius Technologies Pty. Ltd., 2002), así se han establecido algunas relaciones, como por ejemplo la relación entre la conductividad y los sólidos disueltos totales, se establece que la cantidad de sólidos totales disueltos es aproximadamente la mitad del valor de conductividad (Infoagro Systems, S.L., 2013), sin embargo cuando la conductividad es elevada, esta relación no se debe aplicar debido a que se vuelve mucho mayor, 0.9 veces el valor de conductividad (Lentech, 2013).

Como se puede ver en la Tabla 1 existe una diferencia de conductividad en cada compuesto que pueda conformar una solución a la misma concentración, esto debido a las características propias de cada molécula.

Tabla 1

Conductividades de soluciones de 1000ppm de diferentes compuestos. (Aquarius Technologies Pty. Ltd., 2002)

<i>Conductividades de Soluciones de 1000 ppm</i>	
<i>Compuesto</i>	<i>μS/cm @ 25 °C</i>
<i>Bicarbonato de Sodio</i>	<i>870</i>
<i>Sulfato de Sodio</i>	<i>1300</i>
<i>Cloruro de Sodio</i>	<i>1990</i>
<i>Carbonato de Sodio</i>	<i>1600</i>
<i>Hidróxido de Sodio</i>	<i>5820</i>
<i>Hidróxido de Amonio</i>	<i>189</i>
<i>Ácido Clorhídrico</i>	<i>11000</i>
<i>Ácido Fluorhídrico</i>	<i>2420</i>
<i>Ácido Nítrico</i>	<i>6380</i>

<i>Ácido Fosfórico</i>	2250
<i>Ácido Sulfúrico</i>	6350

Por lo tanto podríamos establecer una relación entre la conductividad y la presencia de carbonatos, así estimar a breves rasgos la concentración de carbón inorgánico en una solución, que se estima en alrededor del 90% como carbonatos en la relación entre dureza y conductividad (Infoagro Systems, S.L., 2013). Esta relación entre conductividad y carbón inorgánico contribuye para predefinir el rango de medición según el tipo de muestra para una medición de carbono orgánico total con el método 5310B del Standard Methods for Water and Waste Water (Aquarius Technologies Pty. Ltd., 2002).

1.5 Sistema de hipótesis

Tanto el método analítico de medición de carbón orgánico disuelto como el método de medición de conductividad, cumplen los objetivos de validación y son aplicables para el análisis de calidad de agua potable por lo tanto pueden ser implementados por el Centro de Investigaciones y Control Ambiental CICAM.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes.

2.1.1 Instituciones.

El trabajo de tesis fue ejecutado por Ramiro Calahorrano y la institución donde se realizó la investigación fue el Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM) Bajo la supervisión de la Ing. Carola Fierro Naranjo, Directora de calidad del CICAM, y bajo la dirección de la Quim. Erika Murgueitio Mg.

2.1.2 Responsable del proyecto

Ramiro Rubén Calahorrano Paccha

2.1.3 Colaboradores científicos.

Ing. Cesar Yambay.	Experto en validación de métodos analíticos y acreditación de laboratorios bajo la norma ISO/IEC 17025.
Ing. Carola Fierro.	Directora de calidad del Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM) de la Escuela Politécnica Nacional.
Quim. Erika Murgueitio Mg.	Director de tesis
Ing. Rafael Vargas Verdesoto.	Codirector de tesis

2.2 Zona de estudio.

2.2.1 Laboratorio.

El proceso de puesta a punto de los métodos analíticos requeridos para la elaboración del presente trabajo así como el proceso de validación e implementación se lo desarrolló en los laboratorios del Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM) de la Escuela Politécnica Nacional ubicados en el sector de La Vicentina, cantón Quito, provincia de Pichincha, Ecuador. Ubicación geográfica: -0.211223, -78.490982 (0°12'40.4"S 78°29'27.5"W) y bajo condiciones de laboratorio.

2.2.2 Campo.

El proceso de muestreo se lo realizó en el Cantón Rumiñahui abarcando las redes de distribución de agua potable, se almacenó los puntos y fotografías empleando un GPS marca Magellan® Explorist® 610 en coordenadas WGS84 UTM.

2.3 Periodo de tiempo de investigación.

La presente investigación fue llevada a cabo en 16 meses, desde octubre de 2012 hasta enero de 2014.

2.4 Diseño experimental

2.4.1 Diseño experimental para la validación de carbono orgánico disuelto

Se elaboró una curva de calibración cuyo rango de medición fue de 0 mg/L hasta 20 mg/L con material de referencia interno, cada día, durante tres días, tanto para TC (total carbon siglas en inglés), como para IC (inorganic carbon siglas en inglés). Las concentraciones de las soluciones empleadas para la elaboración de cada una de las curvas fueron: 0; 5; 10 y 20 mg/L respectivamente siendo la solución de 0 mg/L agua

ASTM tipo I y cubriendo así los cuatro niveles que requirió el equipo para cada curva de calibración.

Para el resto del experimento se realizó una lectura de cada una de las 5 soluciones preparadas a partir de una solución madre de 1000mg/L con una concentración de 20 mg/L tanto de IC como de TC bajo condiciones de repetibilidad. El experimento se lo repitió durante 4 días en condiciones de reproducibilidad.

Para el tratamiento de los datos se descartó toda curva obtenida cuyo R^2 sea inferior a 0.997, con las curvas restantes, mínimo 3, se realizó una estimación lineal para determinar la linealidad del método así como los límites de confianza, límites de cuantificación y detección para cada uno de los parámetros, IC y TC respectivamente. El límite de detección y cuantificación para carbón orgánico total o carbón orgánico disuelto fue determinado con 10 lecturas de un blanco, es decir agua de-ionizada y se aplicó los cálculos correspondientes.

Luego de completado el experimento en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad los datos se sometieron a una discriminación de datos entre grupos (análisis de Grubbs) y dentro de grupo (test de Dixon) con la finalidad de extraer datos aberrantes que hubiesen podido afectar la validación.

Una vez discriminados los datos estos fueron sometidos a un diseño completamente al azar o DCA, fueron evaluados con un análisis simple de varianza, para lo cual se empleó Microsoft® Excel®, de esta forma se obtuvieron los coeficientes de repetibilidad y reproducibilidad y demás requisitos necesarios para el cálculo de la incertidumbre del método tanto de IC como de TC.

Con los datos obtenidos se aplicaron los diferentes criterios descritos más adelante con la finalidad de estimar la incertidumbre aplicada al método de análisis de carbón orgánico disuelto.

2.4.2 Diseño experimental para la validación del método de análisis de conductividad electrolítica

Para la validación del método de análisis de conductividad electrolítica en agua potable se desarrolló el siguiente diseño experimental:

Se realizaron pruebas de operación del equipo en diferentes modos de operación y condiciones de análisis, para obtener sus condiciones de funcionamiento optimas a la aplicación dada en el laboratorio, estas pruebas con un mínimo de 5 repeticiones en cada una de las mediciones se evaluaron empleando diferencia significativa con una prueba t de student y F de Fisher.

Se calibró el medidor de conductividad HACH SensION 5 en cada uno de los niveles que abarcaron el rango de validación, en los niveles: 0,6; 15,2; 147; 1410; 12860 $\mu\text{S}/\text{cm}$ empleando material de referencia certificado y vigente.

Para la validación del método se realizaron 5 lecturas de la solución con concentración del nivel correspondiente, en cada uno de los 5 niveles de concentración y durante 3 días, dando un total de 75 lecturas.

Los datos obtenidos se evaluaron por medio de un ANOVA para obtener la desviación estándar de repetibilidad y reproducibilidad, así también se obtuvo la incertidumbre del método para cada nivel.

Se realizaron los cálculos necesarios para determinar la incertidumbre en cada uno de los niveles validados para cumplir los objetivos de la validación.

2.5 Procedimiento

2.5.1 Conductividad electrolítica

2.5.1.1 Puesta a punto

- Se recopiló la información bibliográfica necesaria para el adecuado análisis de conductividad electrolítica en muestras de agua potable, estudiando así además de las condiciones de operación como las posibles interferencias en las diferentes mediciones.
- Se colectó los certificados de origen para evidenciar la calidad e incertidumbre de los materiales de referencia empleados.
- Se obtuvo condiciones físicas, equipos, reactivos en lo que respecta materiales de referencia, muestras, entre otros, los cuales deben poseer condiciones idóneas ser para el proceso de validación.

- El instrumental se calibró a fin de tener los datos de incertidumbre de calibración que cumplan los objetivos de validación descritos en la Tabla 2.

Tabla 2
Objetivos de Validación (CICAM, 2013).

PARÁMETRO	OBJETIVO ESTABLECIDO
Selectividad / Especificidad	Aplicable a matriz acuosa
Linealidad / Función respuesta	No aplica
Límite de detección	No aplica
Límite de cuantificación	No aplica
Precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad)	CVr \leq 20 % CVR \leq 20%
Veracidad (% de Recuperación)	80% - 120%
Incertidumbre	\leq 35% (0,6 – 12860 μ S/cm)
Intervalo de trabajo	0,6 – 12860 μ S/cm

- Las muestras para la calibración fueron soluciones de referencia certificadas.
- Se realizaron ensayos de puesta a punto tales como diferencias significativas a diferentes condiciones de operación del instrumental.

2.5.1.2 Preparación de las muestras

El material de referencia certificado empleado para las mediciones y calibraciones fue ambientado durante dos horas a condiciones de laboratorio.

Para la calibración del equipo, se aclimató el material de referencia certificado en un baño termostático marca Cole Parmer a 25°C, con un termómetro calibrado.

2.5.1.3 Procedimiento de medición y calibración

Se siguió paso a paso el procedimiento descrito a continuación:

- **Medición:**

Se realizaron las mediciones de acuerdo, a lo establecido en el procedimiento específico desarrollado para el laboratorio.

- **Calibración:**

Considerando las normas del procedimiento específico de calibración para el conductivímetro.

Se realizó la calibración del equipo a diferentes rangos, utilizando material de referencia certificado.

Para mediciones con valores, con una variación +/-10% del valor del material de referencia certificado, se repitió el proceso de calibración.

2.5.2 Carbono orgánico disuelto

2.5.2.1 Puesta a punto

El equipo para el análisis fue un medidor de carbono orgánico total, marca Shimadzu, modelo TOC 5050 A de origen japonés, el cual tiene las condiciones de operación descritos en la Tabla 3.

Tabla 3

Condiciones de operación Shimadzu TOC 5050 A

Gas transportador: aire sintético con menos de 1ppm de CO₂

Humidificador:	Agua destilada o de-ionizada sobre el nivel inferior o límite mínimo del humidificador
Almacenamiento IC reagent:	nivel sobre 50 mL
Horno:	680°C
Flujo de gas acarreador:	150 ml/min

Los objetivos de validación planteados son descritos en la Tabla 4:

Tabla 4

Objetivos de validación para carbón orgánico total/disuelto (Fierro, 2012).

PARÁMETRO	OBJETIVO ESTABLECIDO
Selectividad / Especificidad	Aplicable a aguas claras.
Linealidad / Función respuesta	$R^2 > 0,99$
Límite de detección	0.5 mg/L
Límite de cuantificación	≈ 1 mg/L
Precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad)	$CV_r \leq 15\%$ $CV_R \leq 20\%$
Exactitud	$\leq 20\%$.
Incertidumbre	$\leq 35\%$
Intervalo de trabajo	LC-20mg/L.

2.5.2.2 Procedimiento de preparación de muestras y material de referencia.

2.5.2.2.1 Solución de referencia para análisis de carbón total/disuelto (TC)

Para la elaboración de la solución madre de carbón total de 1000 ppm se empleó ftalato ácido de potasio grado material de referencia certificado véase ANEXO R, el material de referencia se sometió al pre tratamiento descrito por el Standard Methods, método 5310 (APHA, AWWA, & WEF, 2012).

El material de vidrio empleado para la preparación de las soluciones fue material volumétrico calibrado cuyos certificados se pueden evidenciar en los certificados en el ANEXO R.

La solución preparada se acidificó con ayuda de ácido sulfúrico concentrado a un pH=2 y aforó a 1000mL, se almacenó en refrigeración entre 4 y 8 °C y oscuridad total.

2.5.2.2.2 Solución de referencia para análisis de Carbón Inorgánico (IC)

Para la preparación de la solución madre de carbón inorgánico de 1000ppm se empleó carbonato de sodio y bicarbonato de sodio, ambos con grado material de referencia, cuyos certificados se encuentran en los (ANEXO S y ANEXO T) respectivamente

En un matraz aforado (balón aforado) cuyo certificado se evidencia en el ANEXO U se colocó tanto carbonato de sodio como bicarbonato de sodio previamente adecuados para la preparación de la solución madre de acuerdo al pre tratamiento descrito por el Standard Methods, método 5310 (APHA, AWWA, & WEF, 2012), los reactivos fueron disueltos y la preparación se aforó a 1000mL y almacenó en un frasco libre de aire, la preparación se pudo conservar hasta 6 meses sin disminuir su calidad.

2.5.2.3 Preparación de diluciones para calibraciones de TC e IC

Este blanco será únicamente agua ASTM tipo I, obtenida de un purificador de agua cuya materia prima es agua purificada empleando resinas intercambiadoras aniónicas y catiónicas y osmosis inversa.

Las soluciones de referencia se prepararon empleando pipetas volumétricas de 5, 10 y 20 ml colocando estos volúmenes de la solución madre de 1000 mg/L en un matraces aforado de 1000 ml, según corresponda su concentración.

2.5.2.3.1 Muestras de agua potable

Una muestra tomada de la red de distribución de agua potable del cantón Rumiñahui fue conservada en refrigeración muestreada y tratada en un mismo día, la muestra fue leída tres veces para dar representatividad estadística. La muestra utilizada de la red de agua potable fue contaminada con el estándar de TC con una concentración conocida.

2.5.2.4 Calibración

Para la calibración del equipo se emplearon las soluciones preparadas incluyendo la de blanco o cero, estas fueron 5, 10, 20 mg/L respectivamente.

Se realizaron 3 mediciones en cada punto de calibración para obtener la curva de trabajo. Se repitió el procedimiento de medición hasta terminar con las 4 soluciones para la calibración.

Una vez medidos los cuatro estándares, se registró los datos generados por cada calibración y se imprimió la curva de calibración.

2.5.2.5 Medición de muestras

Para medir la muestra se realizó el procedimiento de medición de muestras una vez alcanzado la puesta a punto del encendido, es decir cumpliendo las características de operación y considerando que la muestra provenga de la red de agua potable.

2.6 Análisis de datos.

Los datos obtenidos de las calibraciones, pruebas y mediciones para la validación fueron almacenados en hojas electrónicas de Microsoft® Excel® 2013, el tratamiento de los datos empleó fórmulas para el cálculo de estimación lineal, diferencia de cuadrados, diferencia significativa, ANOVA, tablas y gráficos, acorde a las necesidades de los cálculos descritos a continuación para cada uno de los métodos validados.

2.6.1 Validación de carbón orgánico disuelto

2.6.1.1 Obtención de la ecuación de la recta de función de respuesta

Para realizar la curva de calibración se utilizan todos los datos obtenidos, obteniendo la respectiva regresión lineal; en el eje de las abscisas (X) se ubica la concentración real de los patrones y en el eje de las ordenadas (Y) las áreas obtenidas. La ecuación de la recta es por tanto:

$$L = mP + Lo \quad \text{ec.1}$$

Donde

L = Lectura observada.

m = Coeficiente de regresión.

P = Concentración de los patrones de IC o TC.

Lo = Coeficiente de la ordenada, en el origen del eje de las abscisas.

El cálculo del coeficiente de regresión (m) y el coeficiente de la ordenada (L_o) se realiza por el método de los mínimos cuadrados. Adicionalmente se calcula el grado de ajuste de la recta, r^2 conocido también como coeficiente de correlación. El criterio para aceptar este grado de ajuste de la recta es $r^2 \geq 0.99$

A partir de la función de respuesta calculada por el método de dispersión lineal de las 3 o más curvas obtenidas se obtiene la ecuación de la recta con su respectivo grado de ajuste. A partir de esta ecuación se calcula S_m , S_{L_o} y $S_{L.P.}$.

$$S_{LP} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2 - m^2 \sum(x_i - \bar{x})^2}{N-2}} \quad \text{ec.2}$$

$$S_m = S_{LP} / \sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2} \quad \text{ec.3}$$

$$S_{L_o} = S_m * \sqrt{\sum \frac{(x_i)^2}{n}} \quad \text{ec.4}$$

Donde:

S_m = Desviación tipo del coeficiente de regresión de la recta.

S_{LP} = Desviación tipo de la recta.

S_{L_o} = Desviación tipo de la ordenada.

y_i = Valores de área.

\bar{y} = Promedio de área.

x_i = Concentración.

\bar{x} = Concentración promedio.

n = número de observaciones.

2.6.1.2 Determinación de la desviación estándar en la estimación de concentración

Para la estimación de la desviación estándar de la estimación de la concentración se empleó la ecuación ec.5:

$$S_{PL} = \frac{S_{LP}}{m} \quad \text{ec.5}$$

Donde:

S_{PL} = Desviación estándar de la concentración (P)

S_{LP} = Desviación estándar de la recta

m = Coeficiente de regresión

2.6.1.3 Cálculo del límite de detección (LD).

Una vez obtenida la curva de calibración con los datos de área=f(concentración) incluido el cero se anexaron los límites de confianza (cálculo 5.3.5) y se extrapolaron el valor de absorbancia que corta el eje de las abscisas del nivel de confianza superior a la recta de calibración obteniendo en las ordenadas en valor correspondiente al límite de detección.

También se pudo calcular el límite de detección en función de la desviación estándar del blanco como sigue:

$$LD = 3 * S(\text{del blanco}) \quad \text{ec.6}$$

2.6.1.4 Determinación del límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación correspondió al mínimo valor de concentración en el cual se obtuvo un resultado de incertidumbre dentro de los objetivos de validación.

A su vez para el límite de cuantificación de TOC/DOC se obtuvo de:

$$LD = 10 * S \text{ (del blanco)} \quad \text{ec.7}$$

2.6.1.5 Determinación de los niveles de confianza de la curva de calibración

El nivel de confianza del coeficiente de la ordenada L_0 (NCLo 95%), se calcula como sigue (Guardado & Mercader, 2006):

$$y_{1,2} = L_0 \pm tS_{LP} \quad \text{ec.8}$$

$$y_1 = L_0 + tS_{LP} \quad \text{Para el NCLo superior.} \quad \text{ec.9}$$

$$y_2 = L_0 - tS_{LP} \quad \text{Para el NCLo inferior.} \quad \text{ec.10}$$

Donde:

$y_{1,2} ; y_1 ; y_2$ = Niveles de confianza calculados.

L_0 = Coeficiente de la ordenada.

t = t de student.

S_{LP} = desviación tipo de la recta.

Finalmente con los valores de los niveles de confianza obtenidos, se determinó el nivel de confianza del método.

En este caso se varió solo la ordenada al origen y se conservó el mismo valor de la pendiente de la recta de calibración por lo que las ecuaciones de los niveles de confianza quedaron de la siguiente manera:

$$Y = Lo + mX \quad \text{ec.11}$$

$$Y_{SUPERIOR} = y_1 + mx \quad \text{ec.12}$$

$$Y_{INFERIOR} = y_2 + mx \quad \text{ec.13}$$

Donde:

$y_{SUPERIOR}$ = valores del nivel de confianza para el límite superior

$y_{inferior}$ = valores del nivel de confianza para el límite inferior

Lo = Coeficiente de la ordenada

m = Pendiente

t = t de student

S_{LP} = desviación tipo de la recta

2.6.1.6 Determinación de la exactitud (% Recuperación y % CV)

- Para el cálculo del porcentaje de recuperación se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor real}} * 100$$

ec.14

Donde:

% Recuperación = Porcentaje de recuperación.

Valor observado = Valor observado del equipo.

Valor real = Valor real del patrón químico y/o material de referencia.

- La media de cada nivel se determinó con la ecuación:

$$\bar{X} = \frac{\sum Y_i}{n} \quad \text{ec.15}$$

Donde:

\bar{X} = Valor medio de las lecturas obtenidas

Y_i = Valores obtenidos

n = número de observaciones

- El porcentaje de recuperación media de cada nivel fue dada por:

$$\overline{\% \text{Recuperación}} = \frac{\bar{X}}{V_{\text{real}}} * 100 \quad \text{ec.16}$$

Donde :

$\overline{\% \text{Recuperación}}$ = Porcentaje de recuperación media.

\bar{X} = Valor medio de las lecturas obtenidas.

V_{real} = Valor real del patrón químico y/o material de referencia.

- El coeficiente de variación de la repetibilidad se obtuvo con la ecuación:

$$\%CV = \frac{S}{X} * 100 \quad \text{ec.17}$$

Donde :

%CV = Coeficiente de variación en porcentaje.

S = Desviación estándar de las lecturas obtenidas.

X = Valor medio de las lecturas obtenidas.

2.6.1.7 Cálculo de la corrección

- Calcular la corrección, mediante la siguiente ecuación:

$$Corr = V_{real} - V_{obs} \quad \text{ec.18}$$

Donde :

Corr = Corrección de la lectura

V_{real} = Valor real del patrón y/o material de referencia

V_{obs} = Valor observado

- Calcular la corrección media cada día con la siguiente ecuación:

$$\overline{Corr} = \frac{\sum Corr}{n} \quad \text{ec.19}$$

donde :

\overline{Corr} = Corrección media de la lectura }
 Corr = Corrección de la lectura

n = número de observaciones

- Calcular la corrección máxima por día y global:

$$C_{m\acute{a}x} = |V_{real} - V_{obs}|_{m\acute{a}x} \quad \text{ec.20}$$

donde :

$C_{m\acute{a}x}$ = Corrección máxima

V_{real} = Valor real del patrón y/o material de referencia

V_{obs} = Valor observado

2.6.1.8 Análisis de Grubbs o exclusión de datos aberrantes.

Para este análisis se extraen los valores, máximo y mínimo del conjunto de datos, el promedio y desviación estándar de todas las desviaciones, para obtener:

$$G_{cal} = \frac{(\bar{X} - X_{i_{min}})}{s} \quad \text{ec.21}$$

$$G_{cal} = \frac{(X_{i_{max}} - \bar{X})}{s} \quad \text{ec.22}$$

G_{cal} = Valor de Grubbs calculado

\bar{X} = Valor promedio de todas las mediciones

$X_{i_{min}}$ = Menor valor de todas las mediciones

$X_{i_{max}}$ = Mayor valor de todas las mediciones

S =Desviación estándar de todas las observaciones

Una vez obtenido este valor se lo comparó con el valor crítico de Grubbs obtenido de la tabla de T de student al 95% de confianza y empleando los grados de libertad (N-K) donde N es el número de observaciones y K el número de grupos.

De haberse obtenido el valor calculado mayor que el valor crítico se hubiese rechazado la hipótesis de que este sea un dato aberrante, caso contrario, se hubiese eliminado el dato y se vuelve a realizar un análisis de Grubbs a fin de eliminar todos los posibles datos aberrantes, al ser un DCA, diseño completamente al azar el número de datos eliminados puede no ser representativo sin embargo por sentido común si se observa una desviación demasiado amplia debería releerse el protocolo de medición y los errores que pudiesen provocar esta clase de datos (Gutiérrez & De La Vara, 2008).

2.6.1.9 Test de Dixon para análisis de datos aberrantes dentro del grupo.

Para discriminar datos aberrantes dentro de los grupos y confirmar así que el test de Grubbs funcionó realizamos el test de la Q de Dixon, el cual consiste en comparar el valor hacia el más cercano de los valores sobre el valor resultante de la resta entre el máximo y el mínimo, de la siguiente manera:

$$Q_{cal} = \left| \frac{\text{Valor estudiado} - \text{valor mas cercano}}{\text{Valor maximo} - \text{valor minimo}} \right| \quad \text{ec.23}$$

Q_{cal} = Valor calculado Q de Dixon

Valor estudiado= Valor a analizar

valor mas cercano= Valor próximo al dato estudiado

Una vez obtenido el valor Q calculado, se lo comparó con el valor Q de tabla o Q crítico, obtenido de la tabla de Dixon al 95% de confianza, y con N observaciones, siendo estas únicamente las del grupo a evaluar.

2.6.1.10 Diseño estadístico

Tabla 5

Diseño para el análisis simple de varianza (ANOVA)

CADA NIVEL	Día			
	1	2	3	4
Observaciones				
1	L_{11}	L_{21}	L_{31}	L_{41}
2	L_{12}	L_{22}	L_{32}	L_{42}
3	L_{13}	L_{23}	L_{33}	L_{43}
4	L_{14}	L_{24}	L_{34}	L_{44}
5	L_{15}	L_{25}	L_{35}	L_{45}

Las medias de cada día están definidas por:

$$\bar{L}_i = \frac{\sum_{j=1}^5 L_{ij}}{5}$$

ec.24

La media general es:

$$\bar{L} = \frac{\sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^5 L_{ij}}{20} = \frac{\sum_{i=1}^4 5\bar{L}_i}{20} = \frac{\sum_{i=1}^4 \bar{L}_i}{4}$$

ec.25

Tabla 6

Análisis ANOVA

Origen de la varianza	Grados de libertad (ν)	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM = SDC/ ν) (varianzas)
Entre grupos (Between)	$\nu_1 = 5-1=4$	$SDC_B = \sum_{i=1}^5 5(\bar{L}_i - \bar{L})^2$	$DCM_B = \frac{SDC_B}{4}$
Dentro del grupo (Within)	$\nu_2 = 20-4=16$	$SDC_W = \sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^5 (L_{ij} - \bar{L}_i)^2$	$DCM_W = \frac{SDC_W}{16}$
Total	$\nu = 20-1=19$	$SDC_T = \sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^4 (L_{ij} - \bar{L})^2$ $= (SDC_B + SDC_W)$	$DCM_T = \frac{SDC_T}{19}$

De acuerdo a ISO 5725 (UNE 82009):

La desviación estándar de repetibilidad (s_r) es $s_r = \sqrt{DCM_W}$ ec.26

La desviación estándar de reproducibilidad (s_R) es $s_R = \sqrt{s_r^2 + s_L^2}$ ec.27

Donde

$$s_L^2 = \frac{DCM_B - DCM_W}{5} \quad \text{ec.28}$$

Siendo el denominador (5) igual al número de observaciones que se realizaron cada día (en cada nivel) [cuando es el caso de un diseño experimental homogéneo de dos factores totalmente anidados como el que se ha planteado].

NOTA: Si, por efectos aleatorios, $s_L^2 < 0$, debe asumirse $s_L^2 = 0$ (normalmente debería cumplirse que $DCM_B > DCM_W$ y en caso contrario deberían existir razones que lo justificaran).

2.6.1.11 Cálculo de la media grupal

Calcular la media para cada día con los datos obtenidos durante el día, utilizando la siguiente ecuación:

$$\bar{L}_i = \frac{\sum_{j=1}^n L_{ij}}{n} \quad \text{ec.29}$$

donde:

\bar{L}_i = Media grupal por día

L_{ij} = Lectura observada en el día

n = número de observaciones del día

2.6.1.12 Cálculo de la media general

Calcular la media general con los datos de los días de experimentación, utilizando la siguiente ecuación

$$\bar{L} = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n L_{ij}}{n} \quad \text{ec.30}$$

donde:

\bar{L} = Media general con los datos de los cuatro días

L_{ij} = Lecturas observadas durante los cuatro días

n = número de observaciones totales

2.6.1.13 Cálculo de las sumas de diferencias cuadráticas de Between: SDC_B

$$SDC_B = \sum_{i=1}^m p^* (\bar{L}_i - \bar{L})^2 \quad \text{ec.31}$$

donde :

SDC_B = Suma de diferencias cuadráticas Between

p = número de observaciones que se realizan por día en cada nivel

\bar{L}_i = media grupal

\bar{L} = media general

2.6.1.14 Cálculo de las diferencias cuadráticas medias de Between: DCM_B

$$DCM_B = \frac{SDC_B}{\gamma}; \quad \gamma = q - 1 \quad \text{ec.32}$$

donde :

DCM_B = Diferencia cuadrática media de Between

SDC_B = Suma de Diferencias cuadráticas Between

γ = grados de libertad

q = número de días de experimentación

2.6.1.15 Cálculo de las sumas de diferencias cuadráticas de Within: SDC_W

$$SDC_W = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (L_{ij} - \bar{L}_i)^2 \quad \text{ec.33}$$

donde :

SDC_W = Suma de diferencias cuadráticas Within

L_{ij} = lectura observada

\bar{L}_i = media grupal

2.6.1.16 Cálculo de las diferencias cuadráticas medias de Within: DCMW

$$DCM_w = \frac{SDC_w}{p * (q - 1)} \quad \text{ec.34}$$

donde :

DCM_w = Diferencia cuadrática media Within

SDC_w = Suma de diferencias cuadráticas Within

p = número de observaciones por día

q = número de días

Los valores de los ensayos realizados se aceptaron cuando las diferencias cuadráticas medias de Between (DCM_B) fueron mayores a las diferencias cuadráticas medias de Within (DCM_w); en caso de que esta condición no se haya cumplido se analizó el proceso experimental a fin de corregir los errores.

A su vez el diseño experimental pudo cambiar si el análisis de Grubbs o Dixon hubieran arrojado un número menor de datos, para lo cual se pudo realizar un reajuste al diseño estadístico.

2.6.1.17 Cálculo de la desviación estándar de repetibilidad: Sr

$$Sr = \sqrt{DCM_w} \quad \text{ec.35}$$

donde :

Sr = Desviación estándar de repetibilidad

DCM_w = Diferencias cuadráticas medias de Within

2.6.1.18 Cálculo S_L .

$$S_L^2 = \frac{DCM_B - DCM_W}{p} \quad \text{ec.36}$$

donde :

DCM_B = Diferencia cuadrática media de Between

DCM_W = Diferencia cuadrática media de Within

p = número de observaciones que se realizan cada día

2.6.1.19 Cálculo de las sumas de diferencias cuadráticas totales: SDC_T

$$SDC_T = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (L_{ij} - \bar{L}_i)^2 = SDC_B + SDC_W \quad \text{ec.37}$$

donde :

SDC_T = Suma de diferencias cuadráticas totales

SDC_B = Suma de diferencias cuadráticas Between

SDC_W = Suma de diferencias cuadráticas Within

2.6.1.20 Cálculo de las diferencias cuadráticas medias totales: DCM_T

$$DCM_T = \frac{SDC_T}{p * (q-1)} \quad \text{ec.38}$$

donde :

DCM_T = Diferencias cuadráticas medias totales

SDC_T = Suma de Diferencias cuadráticas totales

p = número de observaciones por día

q = número de días

2.6.1.21 Cálculo de la desviación estándar de reproducibilidad: S_R

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_L^2} \quad \text{ec.39}$$

donde:

S_R = Desviación estandar de reproducibilidad

S_r = Desviación estándar de repetibilidad

S_L = Desviación de L

2.6.1.22 Cálculo de la incertidumbre de carbono orgánico total/disuelto

La incertidumbre del método se calcula con la siguiente fórmula

$$U_{uso} = |U_M| + |cnr| \quad \text{ec.40}$$

Donde:

U_{uso} = Incertidumbre de uso

U_M = Incertidumbre expandida

$$U_M = u_{mTOC} * k \quad \text{ec.41}$$

Donde:

u_{mTOC} = incertidumbre del método o incertidumbre estándar combinada

k = factor de cobertura

$$u_{mTOC} = \sqrt{u_{IC}^2 + u_{TC}^2} \quad \text{ec.42}$$

Donde:

u_{IC} = incertidumbre del método (IC) = $u_{método}$

u_{TC} = incertidumbre del método (TC) = $u_{método}$

Es decir, ambas incertidumbres se calcularan empleando los mismos cálculos, sin embargo sus valores finales son diferentes.

Por lo tanto los pasos en común de cálculo parten de la siguiente formula:

$$u_{método} = \sqrt{u_{calEq}^2 + u_R^2} \quad \text{ec.43}$$

Donde

u_{calEq} = Incertidumbre de calibración del Equipo

u_R = Incertidumbre de reproducibilidad

El cálculo de estos últimos se detalla en las siguientes secciones

2.6.1.23 Cálculo de la Incertidumbre de calibración del equipo (u_{calEq})

La incertidumbre de calibración del equipo se obtiene de la siguiente expresión:

$$u_{calEq} = \sqrt{u_{MR}^2 + u_{FR}^2 + u_L^2 + u_r^2} \quad \text{ec.44}$$

Donde

u_{MR} = Incertidumbre del material de referencia

u_{FR} = Incertidumbre de la función de respuesta

u_L = Incertidumbre de linealidad

u_r = Incertidumbre de tipo A o de repetibilidad

2.6.1.24 Cálculo de la Incertidumbre del material de referencia (u_{MR}).

La expresión para la dilución, al preparar los estándares se da a continuación:

$$C_2 = \frac{(C_1 \cdot V_1)}{V_2} \quad \text{ec.45}$$

Donde

C_1 = Concentración de la solución estándar

C_2 = Concentración de la solución a preparar

V_1 = Alícuota tomada de solución estándar.

V_2 = Volumen de Aforo

De donde se calcula la incertidumbre para la concentración 2 o solución a preparar. El factor de sensibilidad, para cada parámetro que interviene en la ecuación anterior se calcula derivando la ecuación para el correspondiente parámetro, de la siguiente forma:

$$\frac{\delta C_2}{\delta C_1} = \frac{V_1}{V_2} = A \quad \text{ec.46}$$

$$\frac{\delta C_2}{\delta V_1} = \frac{C_1}{V_2} = B \quad \text{ec.47}$$

$$\frac{\delta C_2}{\delta V_2} = -\frac{C_1 V_1}{V_2^2} = C \quad \text{ec.48}$$

La incertidumbre resulta por tanto:

$$u_{MR}^2 = u_{C_2}^2 = A^2 * u_{C_1}^2 + B^2 * u_{V_1}^2 + C^2 * u_{V_2}^2 \quad \text{ec.49}$$

Donde:

u_{C_1} = Incertidumbre del material de referencia

u_{V1} = Incertidumbre de calibración del material volumétrico utilizado para tomar la alícuota de la solución estándar

u_{V2} = Incertidumbre de calibración del material volumétrico utilizado para el aforo de la solución preparada.

2.6.1.25 Cálculo de la incertidumbre de la solución madre (u_{C1})

La incertidumbre del material de referencia se la obtiene de la siguiente expresión:

$$\mu_{COMB. PREP STD} = \text{conc. std} \sqrt{\left(\frac{\mu_{\text{pureza}}}{\text{pureza}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{\text{balanza}}}{\text{peso}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{\text{balon}}}{\text{vbalon}}\right)^2} \quad \text{ec.50}$$

$\mu_{COMB. PREP STD} = u_{C1}$ = incertidumbre de la solución madre

conc. std = concentración del estándar o solución madre

pureza = la pureza del material de referencia*

μ_{pureza} = incertidumbre del material de referencia*

peso = La masa pesada del material de referencia**

μ_{balanza} = incertidumbre de la balanza empleada para el peso

vbalon = Volumen del balón de aforo para la preparación

μ_{balon} = incertidumbre de tolerancia del matraz o balón aforado empleado.

Notas:

*Para el caso de IC la relación de incertidumbre y pureza al cuadrado será aditiva en el caso del bicarbonato y carbonato de sodio, obteniéndose la siguiente expresión:

$$\left(\frac{\mu_{\text{pureza bicarbonato de sodio}}}{\text{pureza bicarbonato de sodio}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{\text{pureza carbonato de sodio}}}{\text{pureza carbonato de sodio}}\right)^2 \quad \text{ec.51}$$

Esto dado que ambos componentes presentan diferente incertidumbre de pureza y diferente valor de pureza y su aporte es conjunto en la preparación de la solución.

**Para el caso de IC al ser diferentes masas empleadas la expresión deberá incluir ambos pesos de la siguiente manera:

$$\left(\frac{\mu_{\text{balanza}}}{\text{Peso1} + \text{peso 2}}\right)^2 \quad \text{ec.52}$$

2.6.1.26 Cálculo de la incertidumbre por linealidad (u_{FR})

Este cálculo se lo realizó dividiendo la desviación estándar de la ordenada en función lineal ($S_{\frac{x}{y}}$), anteriormente calculada sobre la raíz de N observaciones:

$$\mu_{FR} = \frac{S_{\frac{x}{y}}}{N} \quad \text{ec.53}$$

Donde:

$$S_{\frac{x}{y}} = \frac{S_y}{m} \quad \text{ec.54}$$

Donde $S_{\frac{y}{x}}$ es el error tipo o desviación estándar de los residuales previamente calculado.

Nota: tómese en cuenta que al realizar el cálculo por este método queda excluida la incertidumbre por la lectura.

Esta incertidumbre también se la puede calcular empleando la ley de la propagación de incertidumbres dado que la función de respuesta está dada por la regresión lineal entre la concentración real vs. la concentración obtenida:

$$FR = \frac{L-L_o}{m} \quad \text{ec.55}$$

Donde

L = Lectura obtenida del equipo

L_o = Ordenada al origen

m = coeficiente de regresión o pendiente de la recta

Los factores de sensibilidad se obtienen de:

$$\frac{\delta FR}{\delta L} = \frac{1}{m} = A \quad \text{ec.56}$$

$$\frac{\delta FR}{\delta L_o} = -\frac{1}{m} = B \quad \text{ec.57}$$

$$\frac{\delta FR}{\delta m} = -\frac{L-L_o}{m^2} = C \quad \text{ec.58}$$

De acuerdo a la ley de propagación de incertidumbres se tiene:

$$u_{FR}^2 = A^2 * u_L^2 + B^2 * u_{L_o}^2 + C^2 * u_m^2 \quad \text{ec.59}$$

$$u_{FR} = \sqrt{A^2 * u_L^2 + B^2 * u_{L_o}^2 + C^2 * u_m^2} \quad \text{ec.60}$$

Donde

u_L = incertidumbre de la lectura obtenida

u_{L_o} = incertidumbre del coeficiente de la ordenada al origen

u_m = incertidumbre del coeficiente de regresión.

2.6.1.27 Cálculo de la incertidumbre de la lectura obtenida (u_L)

La incertidumbre de la lectura obtenida está dado por:

$$u_L = \sqrt{u_{\text{resolución}}^2 + u_{\text{deriva}}^2} \quad \text{ec.61}$$

Donde $u_{\text{resolución}}^2$ es la incertidumbre debida a la resolución del equipo; asumiendo una distribución rectangular esta es igual a:

$$u_{\text{resolución}} = \frac{\text{resolución}}{\sqrt{3}} \quad \text{ec.62}$$

La incertidumbre por la deriva del equipo o u_{deriva} se calcula como sigue:

$$u_{\text{deriva}} = \frac{\text{exactitud}}{\sqrt{3}} \quad \text{ec.63}$$

Dado que en la información encontrada del equipo no se pudo obtener la exactitud del equipo, se realizó una búsqueda bibliográfica que se contrasto con una prueba de recuperabilidad la cual arrojo datos con valores inferiores empleando la recuperabilidad de una medición con 3 repeticiones de una prueba interlaboratorio, encontrando un porcentaje de exactitud de 99,58%, sin embargo para seguridad se decide tomar la exactitud de bibliografía de 0,3mg/L de TOC, dado que es la aportación de IC y de TC se asume 0,15mg/L y dividida para 2 que es el factor de cobertura resulta en 0,075 mg/L para cada componente (Gadmar; et.al, 2002).

2.6.1.28 Cálculo de la incertidumbre de la ordenada en el origen (u_{Lo})

Esta incertidumbre se calcula con la desviación estándar de la ordenada en el origen, calculado previamente:

$$u_{Lo} = S_{Lo} \quad \text{ec.64}$$

Cálculo de la incertidumbre del coeficiente de regresión (u_m)

Esta incertidumbre se calcula con la desviación estándar del coeficiente de regresión, calculado previamente:

$$u_m = S_m \quad \text{ec.65}$$

2.6.1.29 Cálculo de la incertidumbre por repetibilidad (u_r) o de tipo A

Esta incertidumbre se calcula como sigue:

$$u_r = \frac{s_r}{\sqrt{n}} \quad \text{ec.66}$$

Donde s , es la desviación estándar de los datos (desviación estándar de repetibilidad) para cada concentración y n el número de datos.

2.6.1.30 Cálculo de la incertidumbre de reproducibilidad

La incertidumbre de reproducibilidad se considera igual a:

$$u_R = S_R \quad \text{ec.67}$$

Donde S_R es la desviación estándar de reproducibilidad obtenida del análisis de ANOVA.

2.6.1.31 Intervalo de trabajo

Se validó el método desde el LC a 2 mg/l

2.6.2 Validación de conductividad electrolítica.

2.6.2.1 Cálculo de la precisión.

El estudio de la precisión se puede realizar calculando, a través del análisis simple de varianza (ANOVA), las desviaciones estándar de repetibilidad (s_r) y de reproducibilidad (s_R) para cada uno de los niveles de ensayo.

Tabla 7

Diseño experimental DCA.

CADA NIVEL Observaciones	Día		
	1	2	3
1	L_{11}	L_{21}	L_{31}
2	L_{12}	L_{22}	L_{32}
3	L_{13}	L_{23}	L_{33}
4	L_{14}	L_{24}	L_{34}
5	L_{15}	L_{25}	L_{35}

Las medias de cada día están definidas por:

$$\bar{L}_i = \frac{\sum_{j=1}^5 L_{ij}}{5}$$

ec.68

La media general es:

$$\bar{L} = \frac{\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^5 L_{ij}}{15} = \frac{\sum_{i=1}^3 5\bar{L}_i}{15} = \frac{\sum_{i=1}^3 \bar{L}_i}{3} \quad \text{ec.70}$$

Tabla 8

Análisis ANOVA

Análisis simple de la varianza

Origen de la varianza	Grados de libertad (ν)	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM = SDC/ ν) (varianzas)
Entre grupos (Between)	$\nu_1 = 5 - 1 = 4$	$SDC_B = \sum_{i=1}^5 5(\bar{L}_i - \bar{L})^2$	$DCM_B = \frac{SDC_B}{4}$
Dentro del grupo (Within)	$\nu_2 = 15 - 3 = 12$	$SDC_W = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^5 (L_{ij} - \bar{L}_i)^2$	$DCM_W = \frac{SDC_W}{12}$
Total	$\nu = 15 - 1 = 14$	$SDC_T = \sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^3 (L_{ij} - \bar{L})^2$ (= $SDC_B + SDC_W$)	$DCM_T = \frac{SDC_T}{14}$

De acuerdo a ISO 5725 (UNE 82009):

La desviación estándar de repetibilidad (s_r) es

$$s_r = \sqrt{DCM_W} \quad \text{ec.71}$$

La desviación estándar de reproducibilidad (s_R) es

$$s_R = \sqrt{s_r^2 + s_L^2} \quad \text{ec.72}$$

Donde

$$s_L^2 = \frac{DCM_B - DCM_W}{5},$$

ec.73

Siendo el denominador (5) igual al número de observaciones que se realizan cada día (en cada nivel) [cuando es el caso de un diseño experimental homogéneo de dos factores (totalmente anidados) (como el que se ha planteado)].

NOTA: Si, por efectos aleatorios, $s_L^2 < 0$, debe asumirse $s_L^2 = 0$ (normalmente debería cumplirse que $DCM_B > DCM_W$ y en caso contrario deberían existir razones que lo justificaran).

2.6.2.2 Cálculo de la incertidumbre de medida.

$$\text{conductividad}_{muestra} = \text{conductividad}_{leido} \quad \text{ec.74}$$

$$\mu_{muestra} = \mu_{leido} \quad \text{ec.75}$$

$$\mu_C = \sqrt{\mu_{cal}^2 + \mu_{deriva}^2 + \mu_{reproducibilidad}^2} \quad \text{ec.76}$$

μ_{cal} se obtiene de la calibración del equipo

$$\mu_{deriva} = \frac{\text{exactitud}}{\sqrt{3}} \quad \text{ec.77}$$

La exactitud de escala se la obtiene de las especificaciones del equipo.

$$\mu_{reproducibilidad} = SR \quad \text{ec.78}$$

$$U_{\text{conductividad}} = K \mu_{\text{conductividad}} + |cnr| \quad \text{ec.79}$$

$$|cnr| = \text{Concentración real} - \text{Concentración observada} \quad \text{ec.80}$$

2.6.2.3 Cálculo del factor de cobertura (K)

$$\gamma_{\text{efectivos}} = \frac{\mu_{\text{total}}^4}{\sum_{i=1}^n \frac{\mu_i^4}{\gamma_i}} \quad \text{ec.81}$$

$$\gamma_{\text{efectivos}} = \frac{\mu_{\text{total}}^4}{\frac{\mu_{\text{calibracion}}^4}{\gamma_{\text{calibracion}}} + \frac{\mu_{\text{deriva}}^4}{\gamma_{\text{deriva}}} + \frac{\mu_{\text{SR}}^4}{nrep - 1}} \quad \text{ec.82}$$

Con los grados de libertad efectivos calculados y con un nivel de confianza de 95% se acudió a la tabla de T-Student para encontrar el valor de K.

2.6.2.4 Cálculo de la exactitud del método.

La exactitud del método puede establecerse por la comparación de los resultados, obtenidos en el diseño experimental, de los Materiales de Referencia (MR_i) con los valores teóricos de los mismos, observando el grado de concordancia entre el valor obtenido y el valor esperado.

La recuperación en cada punto se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{X_{\text{obtenido}}}{X_{\text{esperado}}} \times 100 \quad \text{ec.83}$$

Donde:

X_{obtenido} es el resultado obtenido de la conductividad del material de referencia utilizado, y
 X_{esperado} es el valor teórico del mismo.

2.6.2.5 Intervalo de trabajo.

Se evaluó el intervalo de trabajo acorde a cada estándar desde 0,6 a 12860 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados de la validación de carbón orgánico disuelto.

Para evaluar los principales aportes a la incertidumbre del método se elaboró un diagrama de Ishikawa apreciable en el ANEXO J diagrama necesario para el cálculo de incertidumbre. Los datos obtenidos de las calibraciones realizadas se pueden apreciar en el ANEXO A los mismos que dieron la pauta para el estudio de la linealidad del método, estimación lineal, coeficiente de regresión, entre otros que se encuentran descritos en el ANEXO C.

Debido a que el equipo analizador de carbón orgánico total no permite un ajuste manual de la curva de calibración, se tomó la curva que se apega más a la linealidad con un R^2 mayor a 0,99 (JCGM, 2009) para el procedimiento de validación tanto de carbón disuelto, (DC) por sus siglas en inglés, como de carbón inorgánico disuelto (DIC) por sus siglas en inglés también.

Los resultados del cálculo tanto de límite de detección como el límite de cuantificación se los obtuvieron por estimación lineal para DC y DIC, sin embargo para el análisis de DOC se lo estimo multiplicando por 10 la desviación estándar de 10 mediciones de un blanco que fue agua destilada de-ionizada véase los datos en el ANEXO D, esto debido a que para DOC no existe una curva de calibración por ser derivada de dos variables independientes (Guardado & Mercader, 2006).

Una vez obtenidas las condiciones de medición requeridas se realizaron las mediciones acorde al diseño experimental para el proceso de validación de IC como DIC, como para TC como DC, ANEXO B, ya que no se encontró diferencia

significativa en el proceso de filtración de material de referencia como se puede apreciar en el ANEXO K y por lo tanto se puede considerar que para efectos de la validación las pruebas a realizarse siguiendo el protocolo de medida para TC como para IC no generarían incertidumbre representativa, sin embargo debe aclararse que es fundamental al momento de evaluar DC e DIC en una muestra real esta debe filtrarse para eliminar cualquier cantidad de sólidos a través de un filtro de PTFE con un diámetro de poro de $0,45\mu\text{m}$.

Siguiendo el proceso experimental se completaron 5 mediciones diarias del estándar de 20ppm tanto de DIC/IC como de TC/DC por ser el punto crítico de la curva, durante 3 días, los datos obtenidos se encuentran en el ANEXO B, estos datos para efectos estadísticos fueron discriminados por medio de un análisis de Grubbs (Gutiérrez & De La Vara, 2008), cuyos resultados para TC/DC como para IC/DIC, con el fin de excluir los datos aberrantes entre grupos, el resumen de este análisis se encuentra en el ANEXO E hallándose únicamente un dato aberrante para TC/DC y encontrándose 5 datos aberrantes para IC/DIC, los cuales fueron excluidos para el análisis por el test de Dixon (Gutiérrez & De La Vara, 2008) donde se evaluaron los datos aberrantes dentro de los grupos, obteniéndose como resultado en el ANEXO F que no existieron datos aberrantes dentro de cada grupo tanto para TC/DC como para IC/DIC.

Una vez discriminados los datos de la validación se realizó un análisis simple de varianza (ANOVA), resumido en el ANEXO G donde se obtuvo la desviación estándar de reproducibilidad y de recuperabilidad, ambas inferiores al 20% tanto en IC como en TC, los coeficientes de repetibilidad y de reproducibilidad también se situaron por debajo del 20% fijado como objetivo de la validación.

Obtenidos los resultados del ANOVA, se procedió a realizar el cálculo de incertidumbres de medida, seguidas paso a paso en el ANEXO H, para el cálculo de

los grados efectivos de libertad se empleó la tabla de probabilidad del ANEXO L para finalmente la implementación del método realizando un muestreo en el cantón Rumiñahui de la provincia de Pichincha, Ecuador, donde se colectó una muestra, la misma que fue trasladada al laboratorio en cadena de frío y el análisis se lo realizó el mismo día, tanto de la muestra como tal, como de la muestra enriquecida con la finalidad de obtener el porcentaje de recuperación del 93% del material de referencia.

Además de estas pruebas documentadas el centro de investigaciones y control ambiental de la Escuela Politécnica Nacional, participó en programa de interlaboratorios con la empresa RTC® donde se obtuvo el más alto z-score entre 8 participantes en el análisis de TOC con un porcentaje de recuperación del 98,58%.

Para finalizar la implementación del método de análisis de carbón orgánico disuelto se generó la hoja de validación donde se encuentran los resultados obtenidos de la misma y el cumplimiento de objetivos fijados por el centro.

3.2 Resultados de la validación de conductividad electrolítica.

Previo al proceso de validación se realizó un análisis de los factores que pueden alterar las mediciones, de tal manera se obtuvo un diagrama de Ishikawa para la validación, las pruebas realizadas y los datos obtenidos se encuentran resumidos en el ANEXO M, para esta validación no fue necesario realizar una discriminación de los datos, en lo posterior, se desarrolló el análisis ANOVA o análisis simple de varianza, el cual se describe en el ANEXO N.

Los cálculos de incertidumbre y exactitud se describen en la siguiente tabla:

Tabla 9

Resumen validación de conductividad.

<i>Nivel: conductividad ($\mu\text{S/cm}$)</i>	<i>Repetibilidad</i>		<i>Reproducibilidad</i>		<i>% de</i>	<i>U (k=2) %</i>
	<i>Sr</i>	<i>%CV_r</i>	<i>S_R</i>	<i>%CV_R</i>	<i>Recup.</i>	
0.6	0.04	6.42	0.05	7.49	101.78	106.56
15.2	0.02	0.1	0.02	0.12	100.09	3.15
147	0.18	0.12	0.17	0.12	99.99	3.46
1410	17.13	0.18	2.54	0.18	99.96	3.42
12860	2.55	0.13	17.09	0.13	99.9	2.59

El valor de incertidumbre expandida más elevado es el del menor valor, debido a que en los cálculos se descubrió una incertidumbre del MRC sobre el 60%, debido a que este es considerado un material de referencia primario y no posee mayor trazabilidad.

CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES

Como principales conclusiones se obtuvo:

- Los métodos analíticos empleados para el presente trabajo no cumplieron con las necesidades y objetivos planteados en cada una de las validaciones.
- El parámetro conductividad electrolítica cumplió los objetivos de validación esto es: CV_r y CV_R inferiores al 20%, porcentaje de recuperabilidad entre 80 y 120% en todos los niveles desde 0,6 hasta 12860 $\mu\text{S}/\text{cm}$, en cuanto a la incertidumbre los niveles entre 15,2 y 12860 $\mu\text{S}/\text{cm}$ obtuvieron valores inferiores al 35%, sin embargo el nivel de 0,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ tuvo una incertidumbre de 106,56% impidiendo una estimación razonable de la incertidumbre en este nivel.
- En el método de análisis de conductividad electrolítica el material de referencia empleado para la validación de 0,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ tuvo una incertidumbre superior al 50% de su valor, por lo tanto este valor interfirió en gran medida en los cálculos generando una incertidumbre del método poco razonable.
- En el método de análisis de carbón orgánico disuelto cumplió con todos los objetivos de validación con: incertidumbre cercana al 27%, cuya mayor contribución se debió a las correcciones no realizadas con un 18% de contribución, exactitud menor al 20%, CV_R y CV_r menores al 15 y 20% respectivamente, y un R^2 superior a 0,99.

- Se implementó satisfactoriamente el análisis de carbono orgánico disuelto al obtenerse una recuperabilidad del material de referencia por sobre el 90%.

CAPÍTULO 5: RECOMENDACIONES

- El CICAM deberá adquirir un material de referencia certificado semejante a 0,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ con un valor de incertidumbre más bajo con el fin de cumplir los objetivos de validación para alcanzar una incertidumbre menor al 35%.
- Para el método de análisis de carbono orgánico disuelto desarrollar un protocolo de preservación de la muestra a fin de evitar pérdidas por bacterias descomponedoras.
- Evaluar un mix de materiales de referencia tanto de DIC (disolved inorganic carbón siglas en inglés) como de DC, con el fin de evaluar la recuperabilidad del carbono orgánico en una matriz con presencia de alto contenido de carbono inorgánico disuelto.
- Para dar énfasis a la trazabilidad en las mediciones, se debe adquirir material de referencia certificado y trazable para la preparación de soluciones madre de carbono inorgánico.
- Para cumplir los objetivos de validación de cada uno de los métodos en laboratorio se requiere material de referencia en vigencia y con valores de incertidumbre menores al 15% para asegurar que estos no influyan en el cálculo de incertidumbre final invalidando el método para los fines previstos.

Bibliografía

- APHA, AWWA, & WEF. (2012). *STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTE WATER* (22 ed.). (L. Brigewater, E. W. Rice, R. B. Baird, A. D. Eaton, & L. S. Clesceri, Edits.) Washington, Distrito de Columbia, Estados Unidos de Norteamérica: APHA.
- Aquarius Technologies Pty. Ltd. (Marzo de 2002). *ELECTROLYTIC CONDUCTIVITY MEASUREMENT Theory & Applications*. Obtenido de Aquarius Technical Bulletin - No. 08: http://www.aquariustech.com.au/pdfs/tech-bulletins/Electrol_Conduct_Thery.pdf
- Baird, C. (2001). *Química ambiental*. Reverte.
- Buitrón, N., & Fernández, P. (2010). *Derecho al Agua y Saneamiento: avances, límites y retos*. Recuperado el 18 de Junio de 2012, de http://www.sindicatosporelagua.org/documentos/Ecuador/DERECHO_HUMANO_A_L_AGUA/R_Buitron_N_Fernandez_Informe_Derecho_humano_al_agua_2010_ecuador.pdf
- Castro, M. L., & Benavides, L. (Junio de 1987). *ASPECTOS QUÍMICOS EN LA CLORACIÓN DE AGUAS RESIDUALES*. Obtenido de CEPIS: <http://www.bvsde.ops-oms.org/eswww/proyecto/repidisc/publica/hdt/hdt39/hdt39.html>
- Chi Wu, Y., & Berezansky, P. (Septiembre de 1995). *Low Electrolytic Conductivity Standards*. Obtenido de Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology: <http://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/jres/100/5/j15wu.pdf>
- Dominguez, L., & et.al. (17 de febrero de 2010). Obtenido de http://aesan.mssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/comite_cientifico/BIOFILMS.pdf
- Eugene, F. (1986). *Agua y Salud Humana*. Mexico: Limusa. OMS.
- Fast, D. (7 de Agosto de 2001). *Environmental Protection Division*. Obtenido de Ambient Water Quality Guidelines for Organic Carbon: http://www.env.gov.bc.ca/wat/wq/BCguidelines/orgcarbon/ocarbon_over.html
- Fierro, C. (1 de Octubre de 2012). Centro de Investigaciones y Control Ambiental. (R. Calahorrano, Entrevistador)
- Fierro, C. (5 de Enero de 2013). Analisis de calidad de agua potable en el cantón Rumiñahui. (R. Calahorrano, Entrevistador)
- Gadmar, & et.al. (2002). THE MERITS OF THE HIGH-TEMPERATURE COMBUSTION METHOD FOR DETERMINING THE AMOUNT OF NATURAL ORGANIC CARBON IN SURFACE FRESH WATER.

- Gómez, C., González, R., & Viruela, R. (2009). *Conductividad Electrolítica*. Obtenido de Universidad de Valencia: http://ocw.uv.es/ciencias/1-1/teo_conductividad_nuevo.pdf
- Guardado, J. A., & Mercader, F. E. (16 de Octubre de 2006). Guía EURACHEM. *Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito segunda edición*. Queretaro, Mexico.
- Gutiérrez, H., & De La Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de Experimentos*. Mexico: McGRAW-Hill.
- Infoagro Systems, S.L. (16 de 08 de 2013). *Conductividad eléctrica*. Obtenido de InfoAgro: http://www.infoagro.com/instrumentos_medida/doc_conductividad_electrica.asp?k=53
- ISO. (2005). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- ISO. (15 de Septiembre de 2013). *History*. Obtenido de ISO: http://www.iso.org/iso/home/about/the_iso_story.htm#9
- JCGM. (Marzo de 2009). *Centro Nacional de Metrología*. Recuperado el 17 de Septiembre de 2012, de Vocabulario Internacional de Metrología: <http://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/descarga/default.aspx?arch=/VIM3aTRA2009.pdf>
- Lázaro, E. (19 de Octubre de 2008). *Desinfección De Aguas Para Consumo Humano*. Recuperado el 29 de Abril de 2013, de Instituto de Ingeniería Sanitaria U.B.A.: http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&ved=0CDUQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.fi.uba.ar%2Farchivos%2Finstitutos_desinfeccion_aguas_consumo_humano&ei=Gjt_UdbvDpDi9gS9voGQDQ&usg=AFQjCNE94A13iJ_WlxU8sVX-jr_vu69bJw&sig2=lvX5YuJd
- Lentech. (2013). *Conductividad del Agua*. Obtenido de Lentech Water Treatment Solutions: <http://www.lenntech.es/aplicaciones/ultrapura/conductividad/conductividad-agua.htm>
- Levy. (2004). Obtenido de http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/piped2.pdf?ua=1
- Manahan, S. E. (2007). *Introducción a la química ambiental*. Reverte.
- MINISTERIO DEL AMBIENTE. (2003). *Texto Unificado de Legislación Ambiental (TULAS)*. Quito.
- OAE. (15 de Septiembre de 2013). *Organismo de Acreditación Ecuatoriano*. Obtenido de Misión, Visión, Valores: http://www.oae.gob.ec/index.php?option=com_content&view=article&id=1&Itemid=103

- OMS. (2012). ASS. Recuperado el 19 de Junio de 2012, de http://www.who.int/water_sanitation_health/mdg1/es/index.html
- Páez, G. I. (8 de Octubre de 2010). *Corporación Autonoma Regional del Valle del Cauca*. Obtenido de http://www.cvc.gov.co/portal/images/CVC/Recurso_Hidrico/agua_subterranea/monitoreo/ind_amb_valle_cauca.pdf
- Piera, G. (2003). ESTUDIO DEL BIOFILM: Formación y Consecuencias. *Escuela de prevención y seguridad integral*, 2-16. Recuperado el 1 de Agosto de 2013, de <http://www.avideter.com/ftp/articles/A1070308.pdf>
- Reynolds, K. (13 de Junio de 2007). *La Vida En El Sistema de Distribución*. Obtenido de Agua Latinoamerica: <http://www.agualatinoamerica.com/docs/pdf/V7N2Reynolds.pdf>
- Rodríguez, F. J. (2003). Procesos de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización. Ediciones Díaz de Santos.
- Rumiñahui, G. M. (7 de Julio de 2013). *Rumiñahui*. Obtenido de Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal: <http://www.ruminahui.gob.ec/?q=noticias/politecnica-nacional-y-municipio-controlan-calidad-del-agua>
- Secretaria de Salud - Estados Unidos Mexicanos. (1 de Octubre de 2006). ANEAS. Obtenido de <http://www.aneas.com.mx/contenido/nom.pdf>
- SENAGUA. (11 de Diciembre de 2011). *Portal Secretaria Nacional del Agua*. Recuperado el 18 de Junio de 2012, de <http://www.senagua.gob.ec/files/informes/CalidadAguaEsmeraldas.pdf>
- SENPLADES. (2009). *Plan Nacional Del Buen Vivir 2009 - 2013*. Obtenido de Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo: http://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/07/Plan_Nacional_para_el_Buen_Vivir.pdf
- Terence, J. (2001). *Ingeniería Ambiental. Abastecimiento de Agua y Alcantarillado*. (Sexta Edición ed.). McGraw Hill.