

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL



**VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN PECES**

Proyecto de Grado para obtener el Título de Licenciatura

POR: HEIDI RUTH MAMANI TOLA

TUTOR: LIC. GRACIELA ESPINOZA HUANCA

CO-TUTOR: Phd. OSWALDO RAMOS RAMOS

LA PAZ – BOLIVIA

2016

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mi querida familia que me dio su apoyo en todo momento de mi vida y también a las personas que confiaron en mí amigos y colegas de trabajo con su apoyo moral y paciencia que hasta hoy lo siguen haciendo. Gracias por todas sus palabras que cada día me ayudaron a crecer como persona y profesional.

AGRADECIMIENTOS:

- Agradezco a Dios por brindarme salud, paciencia, fortaleza y esperanza.
- Al IIQ “Instituto de Investigaciones Químicas” por haberme proporcionado su ayuda y con sus conocimientos para realizar este trabajo.
- A los directores y jefes IBTEN “Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear” y personal del CIAN “Centro de Investigaciones y Aplicaciones Nucleares” como también al Ing. Jorge Chungara Castro por haberme transmitido sus conocimientos y apoyo incondicional que me ayudaron a crecer como profesional.
- A la Lic. Graciela Espinoza Huanca por toda la paciencia y el tiempo que me brindo para la elaboración final del trabajo, sus sabios consejos que me ayudaron como profesional.
- Al PhD. Oswaldo Ramos Ramos, PhD. Rigoberto R. Choque Aspiazu, la PhD. Sulema Nieves Valdés Castro y Lic. Luis Fernando Cáceres por disponer de su tiempo y estar presente en cada paso para la realización del trabajo.
- A Lic. Sergio Catarí por su apoyo incondicional y la ayuda que me brindo en la elaboración del trabajo.

RESUMEN

Se validó un método para determinar arsénico en muestras de peces por la metodología por absorción atómica con generador de hidruros.

La validación comienza desde la calibración del equipo, al mismo tiempo el reactivo para la determinación es el borohidruro de sodio que permite la reducción de As^{+5} a As^{+3} para mejorar la detección todo ello en medio ácido por lo que se inyecta el ácido clorhídrico al generador de hidruros.

La preparación de estándares se realizó a partir de una solución de $100\mu\text{g As/L}$ disuelto con ácido nítrico, realizando las diluciones de $0,5$ a $5,5 \mu\text{g As/L}$.

Las muestras de peces se seleccionaron en dos zonas de estudio desembocadura del río Suches - Escoma (Lago Mayor) y Huatajata (Lago Menor) tomando en cuenta las características de actividades humanas en la cuenca, las muestras fueron clasificadas y pre-tratadas por una digestión por horno microondas Marca Anton Paar – Multiwave añadiendo ácido nítrico y peróxido de hidrógeno consecutivamente fueron llevadas a ser analizadas en el equipo de HG-AAS

Se determinó los parámetros de validación obteniendo resultados estadísticos propicios de linealidad con un coeficiente de correlación de $0,99998$, un error de $0,001$, se logró obtener resultados del límite de detección de $0,016 \mu\text{g As/L}$ y un límite de cuantificación de $0,022 \mu\text{g As/L}$, donde el promedio de porcentaje de variación de repetibilidad para los cinco niveles nos dio desde $0,20\%$ a $1,35\%$ y el porcentaje de coeficiente de variación de reproducibilidad para los cinco niveles nos dio $0,39\%$ a $1,62\%$, la exactitud se determinó con una muestra añadida con el sesgo y una prueba de t de Student de una cola se concluyó que no existe una diferencia significativa, se determinó el rango de trabajo que van desde $0,02$ a $5,5 \mu\text{gAs/L}$ y la determinación de incertidumbre que fue la estimación de la misma con una incertidumbre expandida según la guía Eurachem. Evaluación de resultados del

contenido de As total en la especie *Orestias Luteus* y *Orestias Agassi* fue comparado con la norma de la FAO/CODEX (0,060-4,72) mg/L y el reglamento de parámetros de seguridad alimentaria para los productos pesqueros con una concentración de 1mg/L.

ÍNDICE

1	CAPÍTULO I.....	1
	GENERALIDADES	1
1.1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.2	ANTECEDENTES.....	2
1.3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.4	OBJETIVOS	6
1.4.1	Objetivo General.....	6
1.4.2	Objetivo Especifico	6
1.5	JUSTIFICACION	6
2	CAPÍTULO II.....	8
	MARCO TEÓRICO.....	8
2.1	Lago Titicaca	8
2.1.1	Zona de Estudio.....	9
2.2	Química del Arsénico (As)	11
2.2.1	Fuentes naturales	11
2.2.2	Fuentes de contaminación antropogénica.....	11
2.2.3	El arsénico y sus compuestos	13
2.2.4	Metabolismo del Arsénico.....	15
2.2.5	Retención de As en el organismo	16
2.2.6	Toxicidad.....	16
2.2.7	Arsénico en peces	17
2.3	Técnicas analíticas de determinación de Arsénico	19

2.3.1	Descripción de técnicas	20
2.3.2	Técnica seleccionada	20
2.3.3	Tratamiento de muestras de peces	21
2.4	Validación de métodos analíticos	21
2.5	Importancia de validar un método analítico.....	22
2.6	Cuando realizar una validación.....	22
2.7	Métodos no normalizados	23
2.8	Métodos normalizados	23
2.9	Parámetros de validación	24
2.9.1	Linealidad	24
2.9.2	Evaluación de los resultados	24
2.9.3	Evaluar los resultados y eliminar los valores anómalos	25
2.9.4	Límite de detección (LOD)	29
2.9.5	Precisión	31
2.9.6	Exactitud.....	35
2.9.7	Robustez	39
2.9.8	INCERTIDUMBRE.	41
3	CAPÍTULO III.....	46
	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	46
3.1	Metodología para la determinación de As en peces	46
3.2	Técnicas de Muestreo	47
3.2.1	Características Biométricas de las Orestias	47
3.2.2	Características de los peces <i>Orestias Agassi</i> y <i>Orestias luteus</i>	47
3.2.3	Pre tratamiento de las muestras en laboratorio.....	49

3.3	Metodología Experimental	50
3.3.1	Tratamiento de la muestra.....	51
3.3.2	Procedimiento de preparación de estándares y muestras para su análisis.....	55
3.4	Determinación de la linealidad	56
3.5	Determinación del límite de detección y cuantificación.....	56
3.6	Determinación de la precisión	57
3.7	Determinación de la exactitud	57
3.8	Determinación de la robustez.....	57
3.9	Determinación de la estimación de la incertidumbre en base a datos de validación.	58
4	CAPÍTULO IV	59
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
4.1	Validación de método de arsénico total en peces	59
4.1.1	Resultados de la prueba de linealidad	59
4.1.2	Resultados de las pruebas de límite de detección y cuantificación	65
4.1.3	Determinación de precisión	68
4.1.4	Determinación de la Exactitud.	77
4.1.5	Criterios de aceptación para la exactitud.....	81
4.1.6	Porcentaje de Recuperación.....	81
4.1.7	Determinación de Robustez.....	85
4.1.8	Determinación de la estimación de Incertidumbre	87
4.2	Resumen de validación	90
4.3	Evaluación de las muestras de Pescado	91
5	CAPÍTULO V.....	97

5.1	CONCLUSIONES	97
5.2	RECOMENDACIONES	100
6	BIBLIOGRAFÍA.....	101
13	ANEXOS VI.....	106

INDICE DE TABLAS

Tabla 2. 1 Clasificación de fuentes Contaminantes	12
Tabla 2. 2 Compuestos de As importantes.....	13
Tabla 2. 3 Prueba de Robustez de Younden y Steiner	41
Tabla 3. 1 Programa de digestión Horno Antor Paar	53
Tabla 4. 1 resumen de resultados experimentales para la determinación de la Linealidad.....	59
Tabla 4. 2 Resumen de evaluación de los resultados experimentales, para la determinación de la linealidad	60
Tabla 4. 3 Valores para establecer el rango de trabajo.	61
Tabla 4. 4 Valor crítico	62
Tabla 4. 5 Verificación de la linealidad a una concentración menor a	64
Tabla 4. 6 Límite de detección y cuantificación para la determinación de As	65
Tabla 4. 7 Valores de concentración de un blanco fortificado para el cálculo del límite de detección y cuantificación	66
Tabla 4. 8 Datos para la determinación de Repetibilidad y Reproducibilidad.....	68
Tabla 4. 9 Cálculo para el primer nivel.....	68
Tabla 4. 10 Resumen de datos experimentales de repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia	71
Tabla 4. 11 Datos de lectura de repetibilidad.....	72
Tabla 4. 12 Promedios parciales de cada nivel de la repetibilidad	74
Tabla 4. 13 Datos de lectura de reproducibilidad	74
Tabla 4. 14 Promedios parciales de cada nivel de la reproducibilidad	75
Tabla 4. 15 Evaluación de los datos en la determinación de la precisión intermedia...	76

Tabla 4. 16 Evaluación del primer nivel (0,5 $\mu\text{g/L}$).....	78
Tabla 4. 17 Resumen de resultados de la prueba de exactitud en diferentes niveles ...	80
Tabla 4. 18 Blanco fortificado con una concentración añadida de 2 $\mu\text{g/L}$	82
Tabla 4. 19 Muestra fortificado con una concentración añadida de 2 $\mu\text{g/L}$	83
Tabla 4. 20 Replica de muestra fortificado con una concentración añadida de 2 $\mu\text{g/L}$.	83
Tabla 4. 21 Evaluación de los datos para la determinación de la exactitud con pruebas de blanco fortificado	84
Tabla 4. 22 Datos de blanco fortificado para la determinación de Robustez.....	86
Tabla 4. 23 Resumen de los cálculos para las variables de estudio	87
Tabla 4. 24 Tratamiento de datos experimentales para la estimación de la incertidumbre	88
Tabla 4. 25 Concentración general de As en muestras de pescado.....	92
Tabla 4. 26 Concentración de arsénico en muestras de pescado comunidad de Huatajata	93
Tabla 4. 27 Concentración de arsénico en muestras de pescado comunidad de Escoma	93

INDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1 Ciclo de Arsénico.	15
Figura 2. 2 Ciclo acuático del arsénico	18
Figura 2. 3 Diagrama de Precisión.....	32
Figura 3. 1 Ubicación Geográfica de las zonas de estudio en el Lago Titicaca.....	8
Figura 3. 2 Características Biométricas de <i>Orestias agassi</i>	48
Figura 3. 3 Características Biométricas de <i>Orestias luteus</i>	49
Figura 4. 1 Curva promedio de calibración.....	
Figura 4. 2 Curva del rango linealidad.....	63
Figura 4. 3 Absorbancia vs Concentración	65
Figura 4. 4 Diagrama de concentración As en muestra de pescado por individuo zona de Huatajata.....	94
Figura 4. 5 Diagrama de concentración As de muestra de pescado por individuo en la zona de Escoma.....	95

INDICE DE ANEXO

Anexo A 1 Recolección de Muestras	106
Anexo A 2 Procedimiento de digestión de muestra	107
Anexo B. 1. Determinación de la linealidad	109
Anexo C 1 Datos para la determinación de precisión en diferentes niveles.	111
Anexo C 2 Calculo de precisión en reproducibilidad y repetibilidad de cada nivel ...	112
Anexo C 3 Tabla de datos de repetibilidad para el criterio de aceptabilidad en base al coeficiente de Horwitz.	115
Anexo C 4 Tabla de datos de reproducibilidad para el criterio de aceptabilidad en base al coeficiente de Horwitz.	116
Anexo C 5 Tabla de datos para la determinación de exactitud en distintos niveles ..	116
Anexo E 1 Tablas	121

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1 INTRODUCCIÓN

La validación de los métodos para la cuantificación de arsénico es de gran importancia, este elemento en su forma inorgánica y orgánica está distribuido ampliamente en la corteza terrestre y en los seres vivos como peces y puede encontrarse combinado con el oxígeno, cloro, y azufre formando compuestos inorgánicos.

Las altas concentraciones de arsénico se encuentran en depósitos minerales y en áreas de actividad térmica elevada. El arsénico presente en el aire se deposita en el suelo o se remueve por medio de la lluvia, donde muchos de sus compuestos se solubilizan, en plantas y animales se combinan con el carbono y el hidrógeno para formar compuestos orgánicos.¹

Los niveles de arsénico en alimentos como carne, frutas y hortalizas pueden ser relativamente bajos; sin embargo, en el músculo de los peces y mariscos los niveles pueden incrementar, ya que su organismo no es capaz de desechar habitualmente lo absorbido, por lo que a medida que transcurre el tiempo los elementos tóxicos se acumulan en sus cuerpos y pueden llegar a contaminar al ser humano, Todo esto conduce a la necesidad de optimizar los métodos que permitan establecer, tanto procesos de determinación de los contaminantes, como parámetros de análisis adecuados para la validación del método; con el propósito de asegurar que los resultados obtenidos por el estudio sean certeros y confiables.

¹ (Argentina, 2005)

En este trabajo se desarrollan protocolos a seguir para realizar la validación del método para la determinación de arsénico total presente en muestras de peces las cuales se analizarán empleando Espectrofotometría de Absorción Atómica por la técnica de Generación de Hidruros.

Para ello se trabaja con parámetros seleccionados de la guía: Eurachem, “Métodos Analíticos en Laboratorio para la Validación de Métodos y temas relacionados”. Todos estos parámetros son necesarios para la validación de un método analítico entre ellos: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión.

1.2 ANTECEDENTES.

Las fuentes de arsénico y otros metales pesados que producen contaminación ambiental han sido examinados en muchos estudios; por ejemplo: Bolivia pese a que no existen estudios del contenido de arsénico en peces, existen estudios realizados en otras matrices como suelo y agua subterránea, Ramos (2012) realizó estudios de la dinámica de elementos traza en diferentes ecosistemas y agua subterránea, con el objetivo de investigar el grado de contaminación por arsénico y la dinámica de elementos en aguas superficiales y subterráneas en las zonas mineras de Antequera y la sub cuenca Poopó, comprendiendo los factores o procesos que causa la movilización de arsénico.²

Smolder (2001) en un estudio realizado en la cuenca del Plata (Río Pilcomayo), donde los resultados indican que existe una disminución del contenido de metales pesados en la carne de sábalo la misma es todavía relativamente alta en cabeza y vísceras, un segundo efecto de la contaminación podría encontrarse en el consumo del agua y de estos peces en la salud de la población indígena a siete años del desastre de Porco. Donde gran parte de ésta población siguió utilizando agua del río para la preparación de sus alimentos o para

² (Ramos, 2014)

beberla. La Asociación Sucrense de Ecología, afirma que cada litro de agua del río Tarapaya contiene entre 6 a 8 mg. de arsénico lo cual equivale a una concentración entre 600 a 800 veces mayor del límite permitido por la OMS que es 10 µgAs/L.

El Salvador (2006) se encontró como fuente de contaminación el Puerto de la Libertad, como zona propensa a sufrir contaminación donde se observó que las muestras de pescado tomadas en el lugar contenían valores de arsénico que oscilan entre 0,44 - 7,88 mg/kg, plomo (0,01 – 0,94 mg/kg) y mercurio (0,04 – 0,17 mg/kg) que cumplen con la legislación de referencia^{3,4,5}.

La “Norma general Codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos”⁶, tiene como referencia varios estudios realizados referente a Arsénico en aguas dulces que aparece en concentraciones menores a 10 µg/kg y en cultivos terrestres en concentraciones de 0-0.2 µg/kg, el programa de la (FAO/OMS) sobre normas alimentarias comité del CODEX, en marzo del 2011) en el resumen de datos disponibles sobre las concentraciones de Arsénico total en productos alimenticios en agua dulce muestra un rango de concentración entre 0,060-4,72 mg/kg⁷.

El reciente reglamento de la comisión Europea no tiene vigente una normativa para este tipo de contaminante. Actualmente, solo Australia y Nueva Zelanda limitan a 1.5 mg/kg de peso fresco de arsénico en productos de pesca.

García (2013), en Madrid (España), estudio la acumulación de metales pesados en muestras medioambientales⁸ donde los resultados obtenidos muestran su elevada

³ (CONACyT)

⁴ (Europea, 1881/2006)

⁵ ((CE), 333/2007)

⁶ (CODEX, 1995)

⁷ (Comision del Codex, 2011,Marzo)

⁸ (Salgado S. G., 2013)

capacidad de bio - absorción en relación a los elevados contenidos de arsénico encontrado en algas.

El Organismo Internacional de Energía Atómica – OIEA ha implementado estudios en el área de nutrición, medio ambiente y salud apoya activamente a sus estados miembros y exige a la vez la necesidad de contar con laboratorios que tengan implementados sistemas de control de la calidad. El proyecto “Garantía de inocuidad de los alimentos marinos en América Latina y el Caribe por medio de un programa regional de biomonitorio de los contaminantes presentes en músculos y peces (RLA 5054)⁹” se ha realizado una evaluación general de metales pesados en peces que resultó en ensayos de inter-comparación entre laboratorio, con la participación de diferentes instituciones.

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Bolivia, los mayores problemas ambientales con respecto al arsénico, están relacionados con la incorporación de desechos a los cuerpos de agua. La creciente actividad industrial y minera, así como las descargas domésticas, generan efluentes que descargan en muchos casos directamente a los cursos de aguas superficiales, estos efluentes poseen entre sus principales características

- Bajo pH
- Alto contenido de elementos pesados Hierro (Fe), Plomo (Pb), Arsénico (As), Zinc (Zn) y Cadmio (Cd.)
- Elevadas cargas salinas (cloruros (Cl⁻) y sulfatos (SO₄⁻²) principalmente) lo cual impacta directa y negativamente sobre los sistemas acuáticos¹⁰.

⁹ (RLA-5054)

¹⁰ (F., 2013)

Al ser vertidos dichos contaminantes al medio acuático entran en contacto con los organismos que habitan, y se presenta el proceso de biodisponibilidad, ocasionando con esto una acumulación de metales en su organismo.¹¹ Según la “Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades” de los Estados Unidos de Norteamérica (ATSDR, 1992) y la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1961) publicaron una revisión de los efectos tóxicos de arsénico. Los daños causados por el arsénico en alimentos pueden generar desde efectos tóxicos en la salud como también enfermedades del sistema vascular, nervioso y respiratorio así como también efectos crónicos como cáncer y enfermedades de pie negro.¹²

La importancia de esos problemas, demuestran la necesidad de contar con metodologías confiables de análisis de arsénico y estas deben estar respaldadas por estudios completos de validación de la metodología propuesta.

¹¹(Hart y Fuller, 1974).

¹² (C, 2001)

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General

Validar el método para la cuantificación de contenido de Arsénico total en peces, de la especie *Orestias agassi* (Carachi gris) y *Orestias luteus* (Carachi amarillo).

1.4.2 Objetivo Especifico

- Establecer las condiciones instrumentales experimentales óptimas para la cuantificación de Arsénico total en peces, de la especie *Orestias agassi* (Carachi gris) y *Orestias luteus* (Carachi amarillo).
- Determinar los parámetros de validación definidos en la ISO - 17025 referidos a establecer la linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud y robustez.

1.5 JUSTIFICACION

Gran parte de las personas ubicadas en zonas cercanas al Lago Titicaca y las ciudades de La Paz y el Alto consumen pescado por su alto contenido de nutrientes, entre los pescados más consumidos se encuentra el Carachi (*Orestias Agassi* y *Luteus*), estos son considerados como fuente de exposición a metales pesados entre ellos el arsénico, que se encuentran de manera natural. Debido a la ubicación de la zona, en donde se encuentra diversos factores que provocan contaminación como: actividad industrial, minera, ganadera y descargas domésticas. Es necesario conocer las concentraciones de arsénico en pescados, ya que estos causan diversos problemas de salud y el funcionamiento del ecosistema, razón por la que se requiere desarrollar métodos de cuantificación para poder realizar un control a esta problemática. Todo método de cuantificación tiene una finalidad,

donde el papel de la validación es verificar que dicho método es adecuado, por lo tanto, una correcta validación debe detectar la presencia de errores en él y permitir corregirlos. La importancia de validar el método es demostrar que las pruebas para la detección de arsénico total en peces sean confiables y así confirmar que el ensayo tiene las capacidades de desempeño consistente, junto con otras actividades englobadas en el aseguramiento de la calidad. Considerando dos especies de peces para la evaluación de los efectos causados por estos, a través de ello ayudar a nivel nacional buscando alternativas de prevención y difusión para la mejora en el campo de la acuicultura, por eso es necesario cumplir los requisitos exigidos por la norma ISO/IEC 17025¹³ que regula el funcionamiento adecuado de los laboratorios que realizan análisis de metales y a la vez regula los procedimientos que se deben seguir para la realización de un trabajo de validación de una metodología analítica.



¹³ (RIUS, 2000, págs. 382-385)

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Lago Titicaca

El Lago Titicaca ubicado en la región del Altiplano Andino entre Perú y Bolivia, es el lago navegable más alto del mundo a 3.810 m sobre el nivel del mar (Figura 2.1) y el segundo más extenso en Sudamérica, con 8.400 km² de superficie en su espejo de agua. La temperatura en el lago esta de 8,5 °C a 18 °C, el clima en la región es templado en verano, frío y seco en invierno.

Figura 2. 1 Ubicación Geográfica del Lago Titicaca



Fuente: Mapa del Lago Titicaca, 2014

El Lago Titicaca está dividida en dos cuencas lacustres: el Lago Mayor y el Lago Menor. El Lago Mayor tienen una profundidad media de 135 m y una extensión de 7.000 km², se caracteriza por sus grandes pendientes al alejarse de la orilla, sin embargo el Lago Menor tiene 1,400 km² y es mucho menos profundo que el Mayor con una media de 9 m y leves pendientes excepto el borde oriental de la fosa de Chúa.

2.1.1 Zona de Estudio

Las zonas de Escoma (Lago Mayor) y Huatajata (Lago Menor) fueron seleccionados por los diferentes tipos de afectación, siendo dos de las zonas con mayor potencial de impacto ambiental.

La comunidad Villa Puní – Escoma fue considerado en base a las fuentes hidrotermales y la proximidad de la desembocadura de las aguas del río Suches que presenta problemas relacionados con la explotación aurífera tanto el lado peruano como el lado boliviano en las nacientes del río, la actividad minera informal en la cuenca se incrementa en la zona a partir del año 2006, además se considera los estudios realizados por la Autoridad Binacional del Lago Titicaca (ALT) que muestran áreas contaminadas por metales pesados y macronutrientes procedentes de la explotación minera; las hidrófitas (totoras, lentejas de agua y berros) evaluadas muestran capacidad de acumular metales pesados y por ende depurar las aguas contaminadas, existiendo un riesgo potencial de toxicidad para los animales que se alimentan de estas plantas acuáticas,¹⁴ Sin embargo, en la comunidad Chilaya - Huatajata la actividad humana y hotelera fue incrementando debido a ello provocando problemas de contaminación (Figura 2.2) en la vida acuática, debiéndose que los hoteles no cuentan con un proceso de pretratamiento de sus aguas desechando al lago y causando este tipo de afectación al medio ambiente.

¹⁴ (DHV., 2007)

Figura 2. 2 Efectos de contaminación a orillas del Lago Titicaca Huatajata



Fuente: octubre 2014, Huatajata

Las zonas de pesca de Carachi de mayor importancia son las que corresponden a Escoma (comunidad Villa Puní con ubicación geográfica de E 0532848 N 8207382) y Huatajata (comunidad Chilaya con ubicación geográfica de E 0482542 N 8267232) (Figura 2.3), estos lugares se seleccionaron por los diferentes tipos de afectación mencionados.

Figura 2. 3 Ubicación geográfica de las zonas de estudio.



2.2 Química del Arsénico (As)

2.2.1 Fuentes naturales

El Arsénico (As) es un elemento ampliamente distribuido en la atmósfera, en la hidrósfera y biósfera que significa el 0,0005% de la corteza terrestre. Una gran cantidad de As en el medio ambiente proviene de fuentes naturales (meteorización, emisiones volcánicas y en fuentes hidrotermales), existe una importante contribución a partir de actividades antropogénicas, tales como procesos industriales (minería, fundición de metales, pesticidas y conservantes de la madera).¹⁵

Los niveles de As en el medio ambiente es variable, motivo por el cual es un elemento con muy alta movilidad y capacidad de transformación, cambiando su estado de oxidación en tri y pentavalente o en forma orgánica e inorgánica al reaccionar con oxígeno u otras moléculas del aire, suelo, agua o por acción de microorganismos.

2.2.2 Fuentes de contaminación antropogénica

El As tiene muchas aplicaciones en la industria metalúrgica, especialmente en la obtención de aleaciones, por ejemplo: el óxido de As que se utiliza en la elaboración de vidrios, así también como otros compuestos de As son empleados para la elaboración de pinturas e incluso plaguicidas.

Las fuentes de contaminación podríamos clasificarlo según su origen. Ver (Tabla 2.1)

¹⁵ (M.I. Litter, 2009)

Tabla 2. 1 Clasificación de fuentes Contaminantes

Según Origen	Causas naturales o geoquímicas (no está influenciada por el hombre)	Provocada por las actividades del hombre (contaminación antropogénica)
Según proveniencia	Fuente puntual: viene de una fuente específica e identificable. Las fuentes puntuales incluyen descargas de aguas residuales urbanas e industriales.	Fuente difusa: no se puede remontar a un punto específico. Ej: botaderos de residuo sólidos, terrenos agrícolas donde se aplican fertilizantes y plaguicidas, operaciones de explotación minera, actividades de cría intensiva de ganado, etc.

Fuente: Proyecto de Desarrollo Sostenible del Lago Titicaca, 2007

- Fuentes puntuales de contaminación

Proviene de la descarga accidental o sistemática de efluentes líquidos procedentes de actividades domésticas, industriales y mineras, o de la disposición final de basuras.

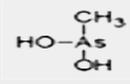
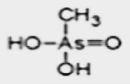
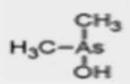
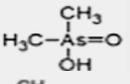
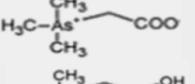
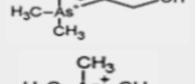
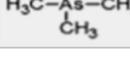
- Fuente de contaminación difusa

Están relacionadas a las actividades generadoras de impacto ambiental, como la agricultura esto se suma la morfología de la cuenca del Lago y de la cuenca lacustre que influyen en la distribución regional de los impactos de polución. Por ejemplo, la escasa profundidad de algunas bahías repercute en una mayor contaminación de sus aguas.

2.2.3 El arsénico y sus compuestos

Los compuestos de As pueden ser orgánicos e inorgánicos. Los compuestos inorgánicos suelen presentarse en oxianiones en disolución (arsenito y arseniato) como óxidos, cloruros y sulfuros en fase sólida, o formando parte de minerales más complejos. Sin embargo, los compuestos orgánicos contienen arsénico unido a un átomo de carbono por medio de uniones covalentes convirtiendo el As y arsenato inorgánico a compuestos metilados.¹⁶ En la (Tabla 2.2.) se muestran los compuestos orgánicos e inorgánicos.

Tabla 2. 2 Compuestos de As importantes.

COMPUESTOS INORGÁNICOS	COMPUESTOS ORGÁNICOS
<ul style="list-style-type: none"> • Realgar (AsS) • Arsenolita (As₂O₃) • Arsenopirita (FeAsS) • Cobaltita (CoAsS) • Oropimente (As₂S₃) • Hematolita (Mn₂Mg)₄Al(AsO₄)(OH)₈ 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido metilarсенioso MMA(III)  • Ácido monometilarсенónico MMA(V)  • Ácido dimetilarсенioso DMA(III)  • Ácido dimetilarсенínico DMA(V)  • Arsenobetaina AsB  • Arsenocolina AsC  • Oxido trimetilarсенina TMAO  • Ion tetrametilarсенio TETRA

Fuente: Sharma y Sohn, 2009

¹⁶ (Smith, 1999)

2.2.3.1 Especies inorgánicas de arsénico

Las especies inorgánicas de As son de mayor abundancia en la naturaleza, se encuentran en general como especie disuelta formando oxianiones predominando As (III) y As (V), como también sulfuros y cloruros.

El As (V) puede encontrarse como H_3AsO_4 y sus correspondientes productos de disociación (H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} y AsO_4^{3-}), mientras que el As(III) se presenta como H_3AsO_3 y sus correspondientes derivados protolíticos dependiendo del pH (H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-} y AsO_3^{3-}), en presencia de sulfuros se presenta como: HAsS_2 , FeAsS y AsS^3 .¹⁷

2.2.3.2 Especies orgánicas de arsénico

Estas especies están ampliamente distribuidas en la atmósfera, en sistemas acuáticos, suelos, sedimentos y tejidos biológicos. Las reacciones de metilación que ocurre en organismos terrestres y marinos convirtiendo el arsenito y el arseniato inorgánico en compuestos metilados como el monometilarsonato [MMA(V)] o ácido monometilarsónico [MMAA , $\text{CH}_3\text{AsO(OH)}_2$], el dimetilarseniato [DMA(V)] o ácido dimetilarsínico [DAMA , $(\text{CH}_3)_2\text{AsO(OH)}$]¹⁸ el óxido de trimetilarsina (TMAO) y el ion tetrametilarsonio (TMA^+). Estos compuestos son precursores de formas orgánicas más complejas y prácticamente no tóxicas, los arsenolípidos, como la arsenobetaína (AB) y la arsenocolina (AC) y los arsenoazúcares (AsAz).

¹⁷ (Ferreira, 2002)

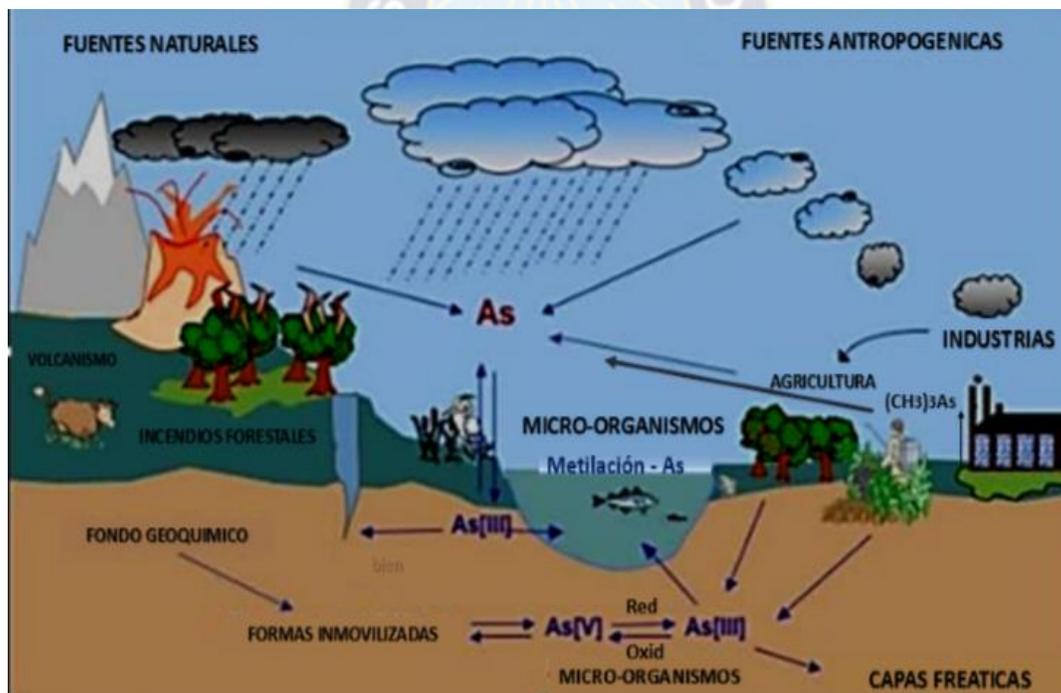
¹⁸ (Hall, 1998)

2.2.4 Metabolismo del Arsénico

El metabolismo del As es caracterizado en muchas especies por dos principales tipos de reacción: primero la reducción de especies pentavalentes a trivalentes y segundo las reacciones oxidativas donde las formas trivalentes son secuencialmente metiladas.¹⁹

Se han encontrado que un gran número de especies de levaduras, hongos, algas, plantas y animales, transforman los compuestos arsenicales inorgánicos a compuestos metilados como nos muestra en la (Figura 2.4) Ciclo del arsénico.

Figura 2. 4 Ciclo de Arsénico.



Fuente: Roberto. Barocci.info, 2012

¹⁹ (WHO., 2001)

Las especies arsenicales orgánicas que generalmente derivan de los procesos de metilación del arsénico son: arsenoazucars, arsenobetainas, arsenocolina y arsenolípidos. Estas especies son encontradas con frecuencia en organismos acuáticos, incluyendo crustáceos y peces.²⁰

2.2.5 Retención de As en el organismo

Las vías de entrada del As al organismo humano se pueden dar por: vía oral, respiratoria y cutánea. Las fuentes de contaminación de As para el hombre. Son: agua, vegetales y alimentos; sin embargo, en el filete de los peces y mariscos los niveles pueden ser elevados, ya que su organismo no es capaz de desechar habitualmente lo absorbido, por lo que a medida que transcurre el tiempo los elemento tóxicos se acumulan en sus cuerpos y pueden llegar a contaminar al ser humano, mediante la cadena trófica. Independientemente de la cantidad ingerida, la retención del As en el cuerpo depende de su biodisponibilidad, es decir de las formas fisicoquímicas en las cuales el As está presente en alimentos, agua y aire.

2.2.6 Toxicidad

La toxicidad del As depende del estado de oxidación en que se encuentra y del radical al que está unido. Los compuestos inorgánicos de As solubles son los más tóxicos que los orgánicos, con respecto al estado de oxidación, las formas trivalentes son las más toxicas que las pentavalentes, estudios realizados revelan que los compuestos de As (III) son aproximadamente 60 veces más tóxicos que los de As (V) y que los compuestos inorgánicos son 100 veces más tóxicos que los orgánicos. De esta forma, el As (III) es la especie más toxica, seguido de As (V), MMA y DMA. No obstante, la toxicidad de MMA (III) y DMA (III) es del mismo orden o superior que la de las especies inorgánicas.²¹

²⁰ (Pradosh R, 2002)

²¹ (Le, Lu, & X.F, 2004)

Muchos órganos y sistemas pueden ser afectados incluyendo la piel, sistema respiratorio, sistema cardiovascular, sistema inmune, aparato respiratorio y nervioso. Los mayores incidentes que han ocurrido en las regiones donde el agua potable está contaminada con arsénico fueron en Chile²², Argentina²³.

2.2.7 Arsénico en peces

Los peces son la parte más alta de la cadena trófica en ambientes acuáticos. La producción primaria de fitoplancton y micro algas pueden acumular As y transformar formas inorgánicas en moléculas orgánicas complejas que pueden ser hidrosolubles o liposolubles. Peces e invertebrados marinos retienen el 99% del As como compuestos orgánicos²⁴.

Los organismos acuáticos tienen la capacidad de transformar el As inorgánico en especies menos tóxicas, la transformación de As (V) en AsB se muestra en la (Figura 2.5) es parte del ciclo de As en el medio acuático. La AsB es la especie mayoritaria de As en pescados, crustáceos y moluscos. La similitud electrónica entre As y otros miembros de su grupo, como fósforo (P) y nitrógeno (N), permite explicar la razón por la cual el As llega a los organismos marinos.

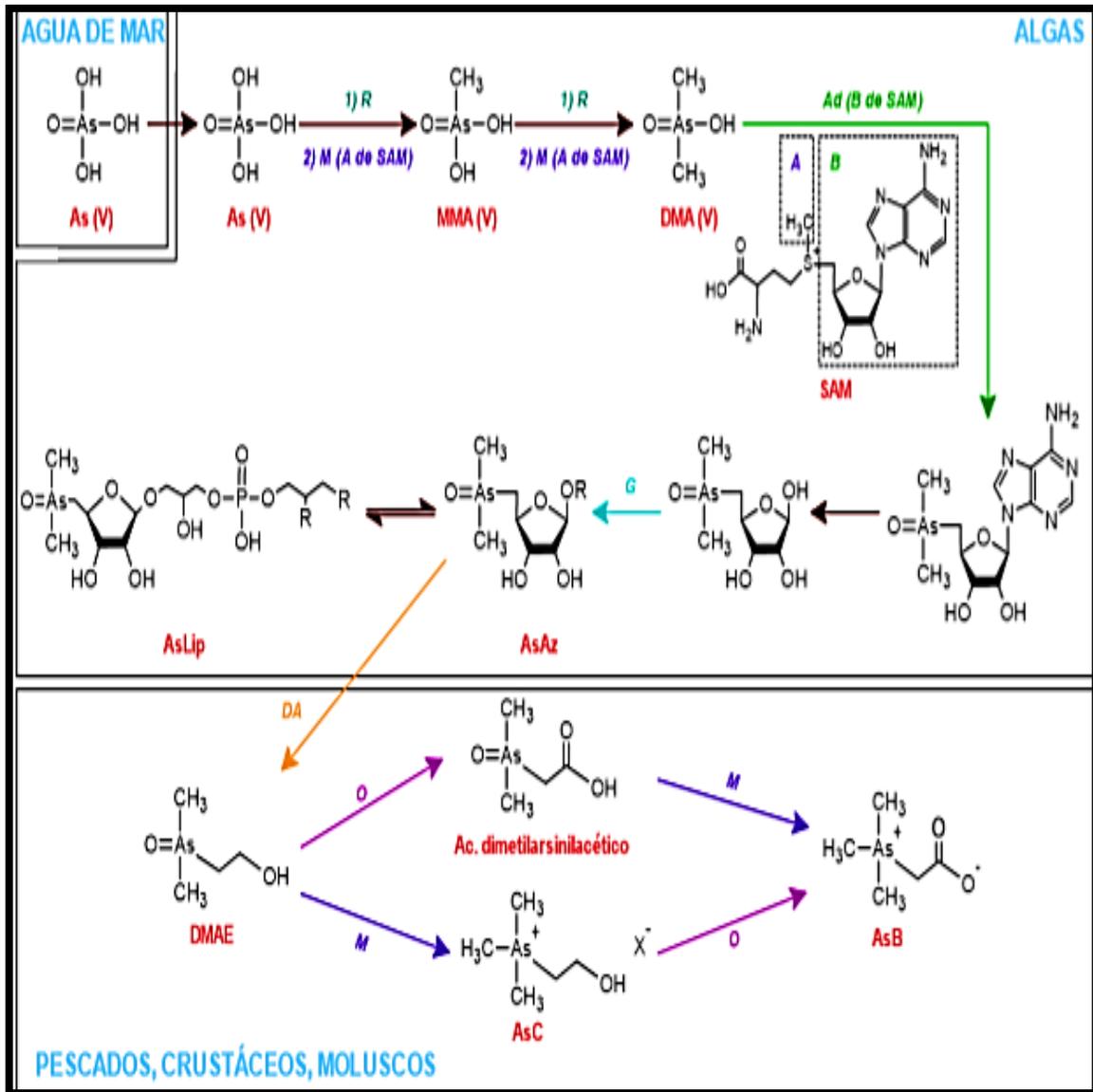
La generación de arsenobetaina desde arsenozucros ingeridos en algas requiere de una división en la unión C3 – C4 del residuo del azúcar y la subsiguiente oxidación del C4. Además la reducción y metilación del As puede producir un compuesto cuaternario (tetralquilado) de arsenobetaina.

²² (Biggs M.L. Kalman D.A. Moore L.E. Hopenhayn - Rich C. and A.H. Smith, 1997, 386 (3))

²³ (Burgera M. and J.L Burgera, 1997, 44)

²⁴ (T., 1992)

Figura 2. 5 Ciclo acuático del arsénico



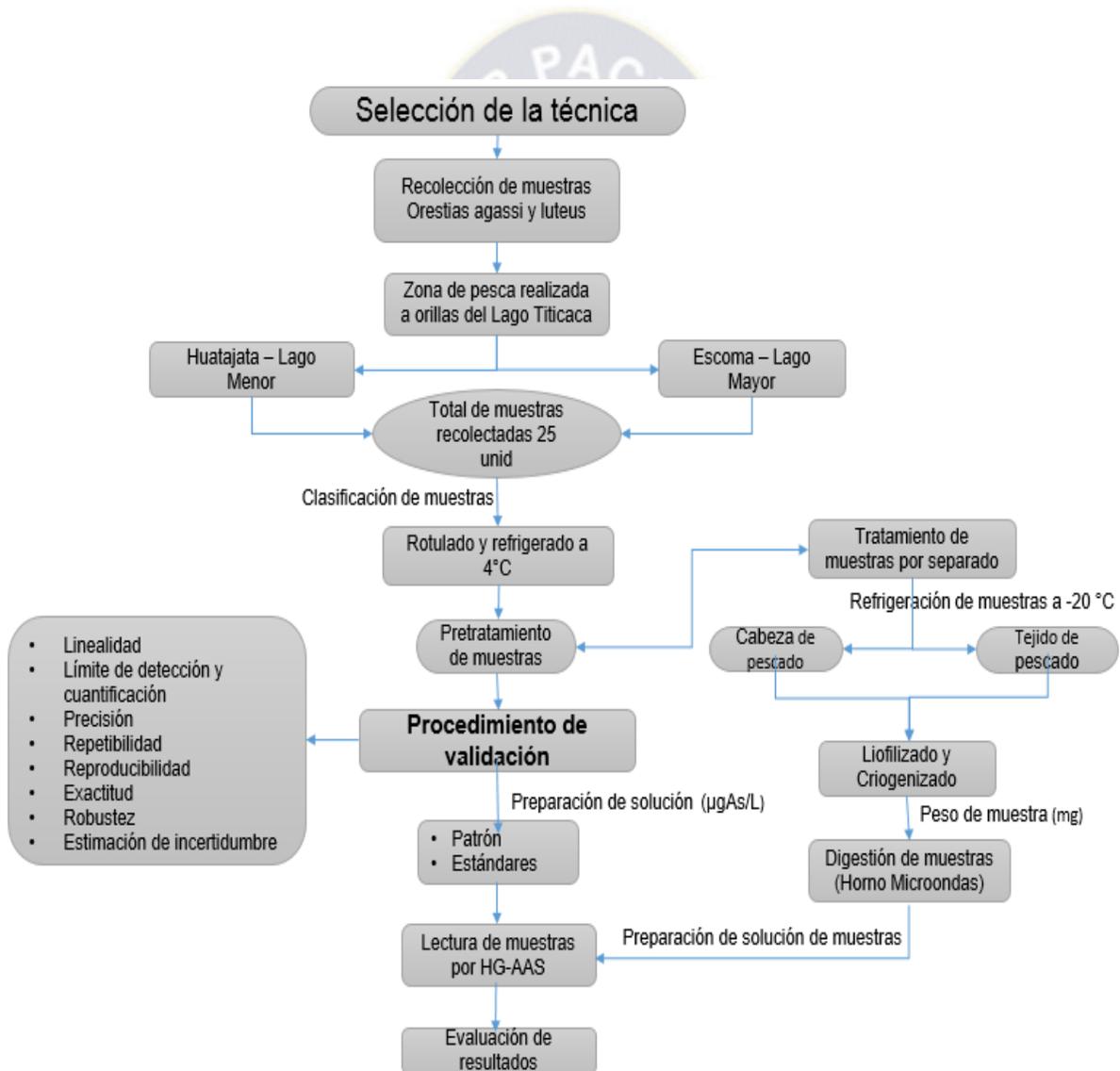
Fuente: Edmands y col, 1993

R reducción; *M* metilación; *AD* adenosilación; *G* glicosidación; *DA* descomposición anaerobia; *O* oxidación

2.3 Técnicas analíticas de determinación de Arsénico

El flujograma consiste en los pasos del proyecto para la determinación de As total en muestras de peces (Figura 2.6) donde en primera instancia se debe seleccionar el método para seguir el procedimiento de evaluación

Figura 2. 6 Flujograma en el proceso de validación de método analítico en la determinación de As en peces.



Fuente: Elaboración propia

2.3.1 Descripción de técnicas

Las investigaciones en el campo de la química analítica se han centrado en el desarrollo de técnicas analíticas, por esta razón, las técnicas de análisis son cada vez más exigentes para su determinación a nivel traza, de forma que se puede conocer el grado de contaminación presente. Por lo tanto, para la determinación de As se hace utilizado diferentes técnicas que van desde métodos clásicos hasta métodos modernos o instrumentales.

Existen técnicas empleadas que se destacan en la determinación de As en diferentes matrices, así como análisis de fluorescencia de rayos X por reflexión total, espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, espectrofotometría de masa con plasma acoplado inductivamente, espectrofotometría de emisión atómica con plasma acoplada inductivamente y espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros siendo esta última la de mayor aplicación en estos tipos de determinación.

2.3.2 Técnica seleccionada

El método de generación de hidruros se ha convertido en el método más popular, esto se debe principalmente a su límite de detección relativamente bajo y buena precisión, considerando que es un instrumento de fácil manejo y de costo accesible.

Este método tiene la capacidad de formar compuestos volátiles (hidruros) lo que permite un transporte más eficiente en forma de gas que luego se atomiza en un tubo de cuarzo. Todo ello nos lleva a la posibilidad de pre concentrar y separar el analito para eliminar interferencias de la matriz, resultando mayormente en una notable supresión de interferencias durante la atomización.

El acoplamiento por generador de hidruros se ha mantenido como una herramienta fundamental tomando en cuenta el poco consumo de muestra, alta precisión y reducción de interferencias.

2.3.3 Tratamiento de muestras de peces

Los métodos para la determinación analítica de As en muestras de peces, se clasifican de dos maneras métodos tradicionales y modernos. Los primeros incluyen procesos de extracción sólido/líquido, disolución por vía húmeda y seca, mientras que el segundo corresponde al empleo de métodos de extracción acelerada con disolventes y extracción o mineralización asistida por microondas.²⁵ Así mismo se puede considerar método destructivo y no destructivo, lo primero implica a la descomposición de la matriz y transformación de los compuestos arsénicos en una determinada forma química, generalmente As (V), mientras que el segundo pretende el aislamiento de los analitos de la matriz conservando su forma química original, por lo que son los empleados en los estudios de especiación.

2.4 Validación de métodos analíticos

La validación parte del concepto de la norma NTC/ISO/IEC 17025:2005 es, “La confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.

Un método debe validarse cuando es necesario verificar que sus parámetros de desempeño cumplen en su totalidad la calidad deseada brindando seguridad y respaldo a una investigación analítica; por ejemplo cuando se desarrolla un nuevo procedimiento para solucionar un problema específico, cuando se requiere incorporar mejoras, extenderlo o cuando el control de la calidad indica que dicho procedimiento establecido está cambiando con el tiempo.

²⁵ (Cámara, 2002)

Es importante, cumplir las normativas (NB – ISO – IEC 17025) como:

- Optimizar los procesos.
- Asegurar la calidad/mejorar la productividad.
- Reducir costos

2.5 Importancia de validar un método analítico

El laboratorio debe validar métodos no normalizados, métodos diseñados / desarrollados por el laboratorio, métodos normalizados usados fuera de su alcance propuesta y modificaciones de método normalizados para confirmar que los métodos se ajustan al uso propuesto. La validación establece un método y confirma su desempeño de apreciaciones cualitativas por parte del laboratorio en general, realizando mediciones analíticas que diariamente varios laboratorios van desarrollando, por ejemplo: como apoyo en la salud, para verificar los parámetros de calidad de agua para consumo humano, para verificar la composición nutricional en inocuidad alimentaria y evaluación de elementos tóxicos en aguas y alimentos. La validación de métodos analíticos junto con otras actividades englobadas en el área del aseguramiento de la calidad, otorgando confianza en los resultados obtenidos.

2.6 Cuando realizar una validación

Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que los parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico²⁶.

Por ejemplo:

- Un nuevo método
- Un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema

²⁶ (EURACHEM, 2005)

- Cuando el control de calidad indica que el método ya establecido está cambiando con el tiempo
- Un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación
- Para demostrar la equivalencia para dos métodos es decir: un método nuevo y uno de referencia.

2.7 Métodos no normalizados

Corresponde a métodos desarrollados por laboratorio o métodos nuevos o bien a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.

2.8 Métodos normalizados

Cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no esté normalizado, se puede realizar la validación retrospectiva, es decir, en base a los datos experimentales que el laboratorio dispone, para la cual se realiza la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados, estos datos pueden ser curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control y ensayos de aptitud. A través de esto, se deberán determinar los parámetros de validación, y evaluar si los resultados obtenidos para los fines son aceptables.

En caso de ser un método nuevo se debe realizar una validación prospectiva, generando a través de análisis de datos experimentales.

La verificación, tiene generalmente como objeto, el comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y lo utiliza correctamente, en caso de tratarse de un

método normalizado modificado para la verificación se requiere realizar solo aquellas pruebas que indique que la variación realizada no afecta el ensayo.

2.9 Parámetros de validación

La caracterización de desempeño del método es un proceso costoso pero puede restringirse por consideraciones de tiempo y costo, por tanto el laboratorio decide cuales de los parámetros de desempeño del método necesitan ser evaluados con el fin de validar su método. Los parámetros estudiados para un mejor desempeño del método son mencionados a continuación.

2.9.1 Linealidad

Tiene la capacidad de dar un resultado instrumental que sea proporcional a la cantidad del análisis de una muestra de laboratorio, esto con el fin de determinar el rango lineal, se puede determinar por una recta de calibración tomando en cuenta valores formados por un blanco y los patrones de trabajo de valores teóricos conocidos. El número de puntos a ser analizados deberá ser establecido, en este sentido se recomienda abarcar valores cercanos a cero y valores superiores al valor de interés.

2.9.2 Evaluación de los resultados

La evaluación de los resultados se realiza de la siguiente manera:

Verificar que los resultados pertenecen a la misma población estadística.

1. Calcular los promedios con un decimal más que los datos originales.

$$\bar{Y}_{ij} = \frac{1}{n_{ij}} \sum_{K=1}^{n_{ij}} Y_{ijk}$$

Ec. (1)

2. Calcular la desviación estándar en cada celda.

$$\bar{S}_{ij} = \sqrt{\frac{1}{n_{ij} - 1} \sum_{k=1}^{n_{ij}} (y_{ijk} - \bar{y}_{ij})^2} \quad \text{Ec. (2)}$$

2.9.3 Evaluar los resultados y eliminar los valores anómalos

3. Test de Cochran's (detecta los errores aleatorios es decir el sesgo de los valores).

Cálculo estadístico C:

$$C = \frac{S_{\bar{y}}^2 \max}{\sum_{i=1}^p S_{\bar{y}}^2} \quad \text{Ec. (3)}$$

Nota: La desviación estandar (DS) que se presenta en las tablas es igual a la desviación estandar (S) que está en las fórmulas.

Consiste en calcular el estadístico C y compararlo con el valor tabulado en caso de incumplimiento $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabulado}}$ se puede pensar en eliminar esos datos.

4. Test de Grubbs (Evalúa la precisión de los valores)

Calculo estadístico Gij:

$$G_{ij} = \frac{\bar{y}_{ij} - \bar{\bar{y}}_j}{\sqrt{\frac{1}{p_j - 1} \sum_{i=1}^{p_j} (\bar{y}_{ij} - \bar{\bar{y}}_j)^2}} \quad \text{(Ec. 4)}$$

Consiste en calcular el estadístico G y compararlo con el valor tabulado en caso de incumplimiento $G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabulado}}$ se puede pensar en eliminar esos datos.

Relación entre el valor de referencia y la respuesta obtenida por el método.

Con los datos ya evaluados se debe de realizar una correlación lineal entre el valor medido con los valores de referencia.

5. Establecer un modelo lineal.

$$\bar{Y}_j = a + b\hat{Y}_j$$

Ec. (5)

6. Calcular la pendiente y el intercepto

$$b = \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \bar{y}_j - \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \sum_{j=1}^q \bar{y}_j}{q}}{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j^2 - \frac{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j\right)^2}{q}}$$

Ec. (6)

$$a = \frac{\sum_{j=1}^q \bar{y}_j - b * \sum_{j=1}^q \hat{y}_j}{q}$$

Ec. (7)

7. Calcular el coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \bar{y}_j - \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \sum_{j=1}^q \bar{y}_j}{q}}{\sqrt{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j^2 - \frac{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j\right)^2}{q}\right) \left(\sum_{j=1}^q \bar{y}_j^2 - \frac{\left(\sum_{j=1}^q \bar{y}_j\right)^2}{q}\right)}}$$

Ec. (8)

8. Cálculo de la covarianza

$$COV(\hat{y}_j, \bar{y}_j) = \frac{1}{q} \sum_{j=1}^q (\hat{y}_j - \bar{\hat{y}}) * (\bar{y}_j - \bar{\bar{y}}) \quad \text{Ec. (9)}$$

La COV se puede comprobar.

Si $COV=0$; el sistema esta correlacionado.

$COV < 0$; el sistema tiene una probabilidad indirecta.

$COV > 0$; el sistema tiene una probabilidad directa.

9. Calcular la Varianza residual

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^q (\bar{y}_j - (a + b * \hat{y}_j))^2}{q-2}} \quad \text{Ec. (10)}$$

10. Calculo de la correlación lineal significativa (t_r)

$$t_r = \frac{r * \sqrt{(q-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad \text{Ec. (11)}$$

La correlación lineal se determina con e fin de evaluar la linealidad del método de estudio.

Para comprobar el t_r con el valor tabulado t_{tab} con un grado de significación del 95% y (p-2) grados de libertad.

- Si $t_r \geq t_{tab}$ existe correlación entre los valores de referencia y la respuesta del método, y el intervalo estudiado no lineal.
- Si $t_r < t_{tab}$ no existe correlación entre los valores de referencia y la respuesta del método, y el intervalo estudiado no lineal.

En general el criterio que se utiliza para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación con un valor que sea mayor o igual a 0.999.²⁷ Se puede realizar la evaluación de la curva de calibración con la prueba de t-Student como un mejor indicador del modelo lineal.

2.9.3.1 Intervalo de trabajo

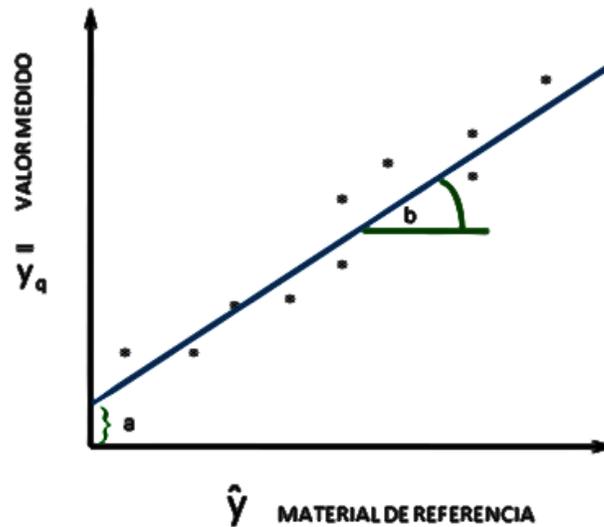
Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de trabajo de concentraciones del analito, sobre los cuales el método puede aplicarse. Esto se refiere al intervalo de concentraciones o a los valores de propiedad relacionada, de las disoluciones medidas realmente más que de las muestras originales, en el extremo inferior del intervalo de concentración, los factores limitantes son los valores del límite de detección y/o cuantificación. En el extremo superior del intervalo de concentración, las limitaciones serán impuestas por varios efectos que dependen del sistema de respuesta del instrumento.

2.9.3.2 Intervalo lineal

Dentro de este intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal y dentro del intervalo lineal la señal de respuesta tendrá una relación lineal con la concentración del analito (Figura 2.7).

²⁷ (Rodríguez, 2010)

Figura 2. 7 Intervalo Lineal



2.9.4 Límite de detección (LOD)

Concentración o cantidad mínima detectable del analito presente en el material objeto de análisis que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal de blanco o señal de fondo (Figura 2.8).

Al realizar mediciones a niveles bajos de analito o de la propiedad relacionada, como en el análisis de trazas, es importante conocer cuál es la concentración más baja del analito, la cual se denomina Límite de Detección. La AOAC (Methods of Analysis of the Association of Official Chemist) lo establece como “el menor contenido que puede medirse con una certeza estadística razonable”; la ISO utiliza como un término general al “valor mínimo detectable de la variable de estado definida” lo que significa “la concentración neta mínima detectable.

$$LOD = 3 \cdot DS$$

(Ec.12)

Se recomienda para su cálculo una serie de medidas representativas, al menos seis mediciones de blanco matriz, testigo reactivo o concentración estimada cercana al blanco.²⁸

2.9.4.1 Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación suele expresarse como señal del valor verdadero de la medición con una desviación estándar relativa, se puede definir según la NATA (National Association of Testing Authorities, Australia) como “la menor concentración de un analito que puede determinarse con una precisión y una exactitud aceptables bajo las condiciones establecidas de la prueba”²⁹, se recomienda para el cálculo al menos seis mediciones representativas, de blanco adicionado y concentraciones estimadas cercanas al blanco, el cálculo se la realiza por la ecuación 13.³⁰

$$LOQ = 10 * SD$$

(Ec.13)

Se recomienda tanto para el límite de detección y cuantificación verificar con los criterios de aceptación es $LC < LOD < LOQ$, para ello se considera determinar el valor crítico (LC) por la ecuación 14 para una probabilidad de error dada (α), a la decisión de que la concentración o cantidad del analito presente en el material analizado es superior a la contenida en el material testigo.

$$LC = t(1-\alpha; \nu) * DS$$

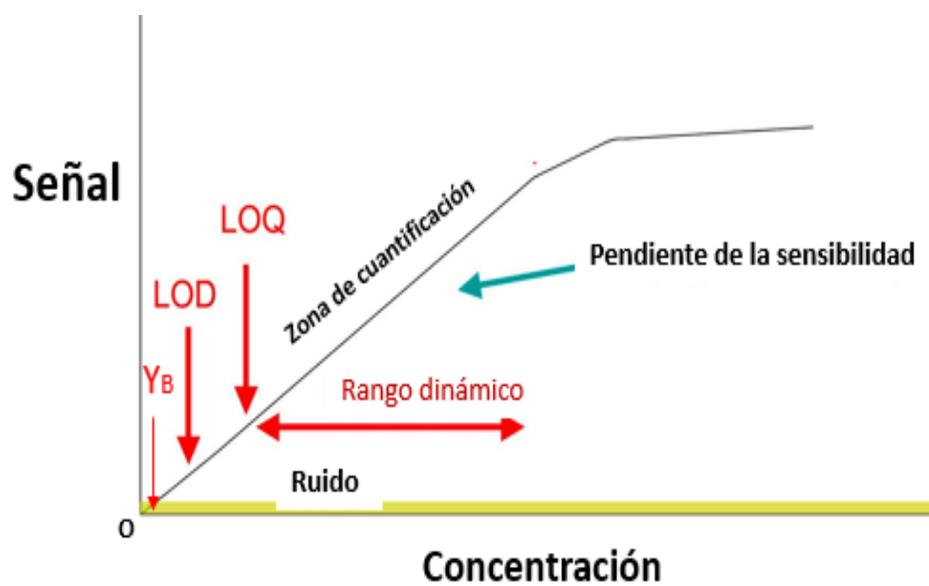
(Ec.14)

²⁸ (Rodríguez, 2010)

²⁹ (Eurachem)

³⁰ (Alvarez, 2014)

Figura 2. 8 Zona de detección y cuantificación

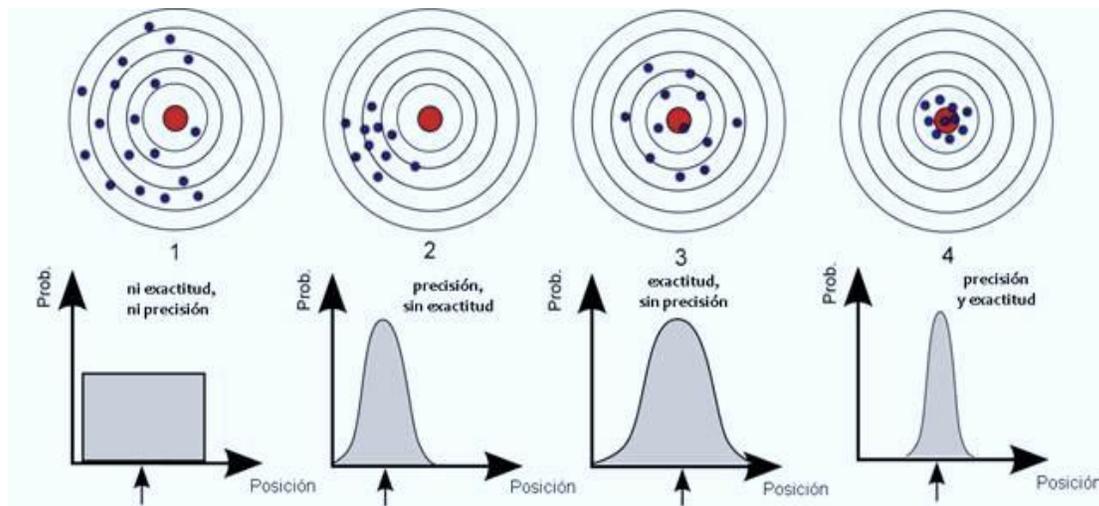


Fuente: <http://trabajoanálisisquímico.blogspot.com>

2.9.5 Precisión

La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. Las dos medidas más comunes, que generalmente definen la precisión en términos de la desviación estándar son repetibilidad y la reproducibilidad (Figura 2.8).

Figura 2. 9 Diagrama de Precisión



Fuente: <http://www.scoop.it>

Las medidas de precisión más comunes son la repetibilidad y reproducibilidad, estas presentan las dos medidas extremas de precisión que puede obtenerse.

2.9.5.1 Evaluación de los resultados

Cálculo de la repetibilidad y precisión intermedia, verificar que los resultados representan a la misma población estadística.

1. Calcular los promedios de cada nivel

$$m_j = \bar{y}_j = \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij} \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^p n_{ij}}$$

Ec. (15)

2. Calcular la repetibilidad y precisión intermedia

$$S_{rj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)}$$

Ec. (16)

3. Calcular la reproducibilidad

$$S_{Rj}^2 = S_{rj}^2 + S_{Lj}^2 \quad \text{Ec. (17)}$$

Relación entre la concentración y la precisión intermedia y la reproducibilidad

$$\begin{aligned} T_1 &= \sum_{i=1}^p n_{ij} * \bar{y}_{ij} \\ T_2 &= \sum_{i=1}^p n_{ij} * (\bar{y}_{ij})^2 \\ T_3 &= \sum_{i=1}^p n_{ij} \\ T_4 &= \sum_{i=1}^p n_{ij}^2 \\ T_5 &= \sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) S_{ij}^2 \\ S_r^2 &= \frac{T_5}{T_3 - p} \\ S_L^2 &= \left[\frac{T_2 * T_3 - T_1^2}{T_3} - S_r^2 \right] \left[\frac{T_3(p-1)}{T_3^2 - T_4} \right] \end{aligned} \quad \text{Ec. (18)}$$

2.9.5.2 Repetibilidad

Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método, mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de los intervalos cortos de tiempo³¹.

Se determina realizando al menos seis mediciones bajo las mismas condiciones (mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y corto intervalo de tiempo de un analito. Calculando la repetibilidad (Sr) y el porcentaje de coeficiente de variación (CVr%) por las ecuaciones 19 y 20.

³¹ (Rodríguez, 2010)

$$S_r = \sqrt{S_r^2}$$

(Ec.19)

$$CVR\% = \frac{DS}{Prom} \times 100$$

(Ec.20)

2.9.5.3 Reproducibilidad

Es la precisión bajo condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método, condiciones diferentes ya sea de laboratorio diferentes operadores y usando distintos equipos.

Para la determinación se realiza tres mediciones de un material control una vez por semana o el comportamiento de la curva de calibración en tres días distintos, también se puede determinar registrando al menos 10 mediciones en días distintos o un mismo día cambiando por lo menos una condición analítica (operador, aparato, reactivo y largo intervalo de tiempo de un analito). Calculando reproducibilidad (SR) y el porcentaje de coeficiente de variación (CVRi %) por la ecuación 21 y 22.

$$S_R = \sqrt{S_R^2}$$

(Ec.21)

$$CVRi\% = \frac{DS}{Prom} \times 100$$

(Ec.22)

Como criterio de aceptación se recomienda trabajar con la siguiente ecuación 23 en base al coeficiente de variación de Horwitz³², el coeficiente de variación disminuye con la disminución de la concentración en que se encuentre el analito en la muestra.

$$CV_h\% = 2^{(1-0,5)\log C} \quad (Ec.23)$$

2.9.6 Exactitud

La exactitud expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero aplicado a un conjunto de resultados de ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios y un componente común de error sistemático o sesgo. La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados. Normalmente la exactitud se estudia con dos componentes: la veracidad y la precisión, la veracidad es una expresión de cuan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados respecto al valor real.²⁶

No debemos confundir la exactitud con la precisión, pues la precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que está el valor verdadero. Para que un método sea exacto se requiere de un cierto grado de precisión con el uso de material de referencia.

2.9.6.1 Evaluación de los resultados

Cálculo de exactitud se evalúa utilizando las ecuaciones que permitirá analizar la parte estadística de los valores, verificar que los resultados representan a la misma población estadística.

³² (W., 1982)

1. Calcular los promedios de cada nivel

$$m_j = \bar{y}_j = \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij} \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \quad \text{Ec. (24)}$$

2. Calcular el Sesgo

$$\delta_j = \bar{y}_j - \hat{y}_j \quad \text{Ec. (25)}$$

3. Calcular la dispersión de los resultados

$$S_j = \sqrt{\frac{1}{p_j - 1} \sum_{i=1}^p (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j)^2} \quad \text{Ec. (26)}$$

4. Calcular el error cuadrático medio relativo

$$ECMR = \frac{\sqrt{\delta_j^2 + S_j^2}}{\hat{y}_j} * 100 \quad \text{Ec. (27)}$$

5. Calcular la desviación del sesgo

$$DESR_\delta = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{p_j} \delta_{ij}^2}{p_j}} \quad \text{Ec. (28)}$$

6. Ecuación de test Grubbs

$$G_{ij} = \frac{\bar{Y}_{ij} - \bar{\bar{Y}}_j}{\sqrt{\frac{1}{P_j - 1} \sum_{i=1}^{P_j} (\bar{Y}_{ij} - \bar{\bar{Y}}_j)^2}}$$

Ec. (30)

7. Ecuación de la test de Cochran's

$$C = \frac{s_{ij}^2 \max}{\sum_{i=1}^P s_{ij}^2}$$

Ec. (31)

Verificación de la exactitud

Para realizar la verificación de la exactitud se aplica de la siguiente manera:

1. Cálculo de t experimental

$$t_{\text{exp}} = \frac{\delta_j * \sqrt{P_j}}{\sqrt{S_j^2}}$$

Ec. (32)

2. Contrastar con el t tabulado

- Si $t_{\text{exp}} \geq t_{\text{tab}}$ se puede afirmar ambos valores no difieren significativamente para el nivel de confianza seleccionando y por lo tanto concluimos que el método satisface la condición de exactitud.
- Si $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$ se puede afirmar que ambos valores difieren significativamente para el nivel de confianza seleccionado y por lo tanto concluimos que el método no satisface la condición de exactitud.

2.9.6.2 Veracidad

La veracidad determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia. La evaluación de la veracidad se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a

los valores conocidos. Se dispone de dos técnicas básicas: la verificación con respecto a los valores de referencia de un material caracterizado o de otro método caracterizado.

2.9.6.3 Sesgo

Es la diferencia entre la expectativa relativa de una medición y el valor verdadero, es decir que el sesgo es el error sistemático total en contraposición al error aleatorio.

Para la determinación se utiliza un material fortificado, material control, material de ensayo de aptitud. Para este fin, se debe medir un analito de concentración conocido y se determina la diferencia en valor absoluto entre el valor conocido y la media del valor obtenido. Para la evaluación del sesgo debemos de considerar la determinación de la prueba t, en la cual el $t_{obs} < t_{crit}$.³³

2.9.6.4 Recuperación

Es la fracción del analito agregado a la muestra (muestra fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar.

La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original.

Como criterio de aceptación se analizar al menos seis mediciones en lo posible en tres niveles de manera que los niveles nos permitan entregar la mejor información posible respecto a la capacidad de recuperación del método, calculada por la ecuación 33.

$$R = \left(\frac{C_e - C_o}{C_a} \right)$$

(Ec.33)

³³ (Moya, 2011)

2.9.7 Robustez

La robustez es la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados validos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones del método. Para su determinación se puede considerar lo siguiente:

- Conocer las condiciones del medio.
- Definir las condiciones que afectan al método de ensayo.
- Seleccionar el objetivo de evaluación de la conformidad a ser utilizado, muestras de referencia y las muestras a determinar.
- Realizar mediciones bajo las condiciones modificadas.

Establecer niveles de influencia para cada una de las variables modificadas, sabiendo que la prueba de robustez tiene por objeto optimizar el método, describiendo que bajo sus condiciones establecidas se puede obtener resultados suficientemente exactos, de manera que la prueba funcione confiablemente si se utiliza en otros laboratorios.³⁴

2.9.7.1 Diseño experimental de Test de Younden y Steiner³⁵

Para esta determinación se aplica el Test de Youden y Steiner para la evaluación de la robustez de un método químico analítico. Este procedimiento permite evaluar el efecto de siete variables con sólo ocho análisis de una muestra.

Para proceder a realizar el estudio de robustez se deben identificar aquellos factores del método que posiblemente afectarían los resultados finales obtenidos a través de este.

Estas factores están presentes habitualmente en el método (ejemplo: temperatura, composición de fase móvil o soluciones reactivas, pH de solución, reactivos, flujo gas carrier, etc.). Para estudiar la robustez se procede a exponer a cada factor a un estudio de

³⁴ (Moya, 2011)

³⁵ (Publica., 2010)

variable, es decir, cada variable se estudia mediante un valor alto (A, B,...,G) y otro bajo (a,b,...,g). Una vez establecidos estos valores se diseñan ocho pruebas de ensayo como, por ejemplo, muestra la (Tabla 2.3).

Los factores a estudiar no deben ser necesariamente siete; puede considerarse un número menor de variables. Esto no afectará el balance del diseño del experimento, pero es importante considerar que siempre se den llevar a cabo los ocho pruebas de ensayo indicado.

Los resultados de la experiencia analítica obtenidos con las variaciones realizadas en estas 8 pruebas se representan con las letras s hasta la z.

A partir de los resultados puede calcularse el efecto de cada una de las variables haciendo la media de los cuatro análisis que contienen la variable en su valor más alto (mayúscula) y aquellas que corresponden al valor más bajo (minúscula). Así, para evaluar el efecto de la primera variable obsérvese que:

$$\frac{(s + t + u + v)}{4} = \frac{4A}{4} = A$$

$$\frac{(w + x + y + z)}{4} = \frac{4a}{4} = a$$

Es decir, la media de los resultados (s + t + u + v) equivalen a “A” porque las seis restantes variables presentes en estos cuatro resultados se anulan entre sí como consecuencia de que existen siempre dos mayúsculas y dos minúsculas de cada variable. Análogamente, la media de los resultados (w + x + y + z) equivalen a “a”.

Para cualquier otra variable se puede proceder de manera similar, tal como muestra la tabla siguiente:

Tabla 2. 3 Prueba de Robustez de Younden y Steiner

Valor de la condición variable	ANALISIS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	B	B	B	b	B	b	b	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	D	D	d	d	d	d	D	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e	E
F,f	F	f	f	F	F	f	f	F
G,g	G	g	g	G	g	G	G	g
RESULTADOS	s	t	u	v	w	x	y	z

Se deben establecer las siete comparaciones posibles, es decir las diferencias entre la variable de mayor valor versus la de menor valor:

$$(A - a), (B - b), (C - c), (D - d), (E - e), (F - f) \text{ y } (G - g)$$

De este modo se puede conocer el efecto de cada variable. En este sentido, cuanto mayor sea la diferencia de los resultados entre el valor mayor y el valor menor ($\Delta = X-x$), mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico.

Como criterio de aceptación para la robustez del método se considera que la diferencia entre el valor alto y el valor bajo sea superior a $\sqrt{2}$ de la desviación estándar de la precisión del método (S), es decir:

$$(X-x) < \sqrt{2} S.$$

2.9.8 INCERTIDUMBRE.

La incertidumbre de una medición es el parámetro, asociado al resultado de la misma, que caracteriza la dispersión de los valores que se podrían atribuir razonablemente a la

magnitud que se mide. En este sentido, es importante que para un método validado o verificado por el laboratorio, se realice la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presente:

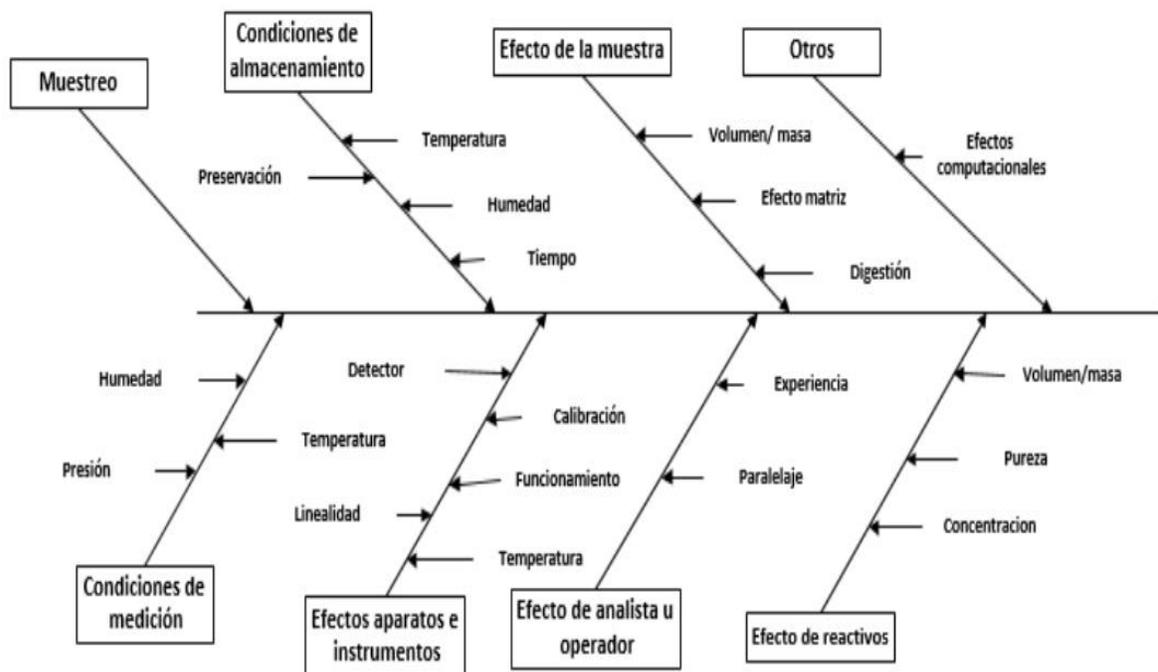
- Muestra
- Efectos de la muestra: tipo matriz
- Sesgo instrumental: debido a las características de los equipos utilizados para realizar las medidas como la deriva resolución, magnitudes de influencia, Ejemplo: temperatura
- Pureza de reactivos: materiales de referencia y preparación de estándares
- Analista: debido a la serie de mediciones, variaciones en las observaciones repetidas bajo condiciones aparentemente iguales. Ejemplo: paralaje
- Condiciones de medición: temperatura, humedad etc.
- Otras: el método, uso de tablas, pesada, alícuota, efectos computacionales, etc.

Generalmente para el análisis de las fuentes de incertidumbre se utiliza el diagrama de espina de pescado u otro tipo de diseño esquemático que permita con facilidad identificar las fuentes de incertidumbre presente durante el proceso analítico.

Está asociada al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurado.

Para estimar la incertidumbre es necesario tomar cada fuente y realizar los cálculos por separado a fin de obtener la contribución de cada una. Por Ejemplo, una desviación estándar (o un múltiplo dado por ellas), o la mitad de un intervalo de confianza, algunos de estos parámetros deben evaluarse a partir de la distribución estadística de los resultados de una serie de mediciones y pueden caracterizarse por medio de desviación estándar experimentales.³⁵

Figura 2. 10 Diagrama de espina de pescado para identificar fuentes de incertidumbre



La incertidumbre de la medición comprende, en general muchos componentes. Algunos de estos pueden ser evaluados por tipo.

Para ello el laboratorio deberá evaluar las incertidumbres de tipo A y B que están presentes en el método.

- Evaluación de incertidumbre de tipo A: evaluación de un componente por análisis estadístico de los valores de la medición, obtenidos en condiciones de repetibilidad.
- Evaluación de incertidumbre tipo B: Evaluación de un componente, incertidumbre de la medición realizada por otros medios distintos a los del tipo A. Ejemplo: la

evaluación basada en la información obtenida a partir de un certificado de calibración, obtenidos a partir de los límites deducirse a través de personal de experiencia.

La determinación de la incertidumbre incluye 4 pasos:

- Primero corresponde a las determinaciones de las fuentes de incertidumbre.
- Segundo en expresar los componentes en una incertidumbre estándar
- Tercero combinar las diferentes incertidumbres
- Cuarto es la determinación de la incertidumbre expandida es decir, multiplicar la incertidumbre combinada por un factor de cobertura $K=2$, a fin de entregar un 95% de confianza, y así establecer el intervalo entorno al resultado de la medición en el cual se puede esperar que se incluya la mayor fracción de la distribución de los valores que se puede atribuir razonablemente al mensurado.

Para la estimación de la incertidumbre, se asume como un todo al método de ensayo y a esto se conoce como incertidumbre global (según la DTA –CRI-011).

$$U_{rel} = \sqrt{(U_{rel(sistemático)})^2 + (U_{rel(aleatorio)})^2} \quad \text{Ec. (34)}$$

2.9.8.1 Evaluación de resultados de estimación de la incertidumbre en base al componente sistemático.

$$U_{rel} = \sqrt{\left(\frac{DESR_s}{\bar{y}_{MR}} * 100\right)^2 + \left(\frac{S_{wMR}}{\bar{y}_{MR}} * 100\right)^2} \quad \text{Ec. (35)}$$

1. Estimación de la incertidumbre

$$U_c = \frac{u_{rel} y_{ijk}}{100} \quad \text{Ec. (36)}$$

2. Expandirla para poder expresarla

$$U = k u_c = 2 k_c \quad \text{Ec. (37)}$$



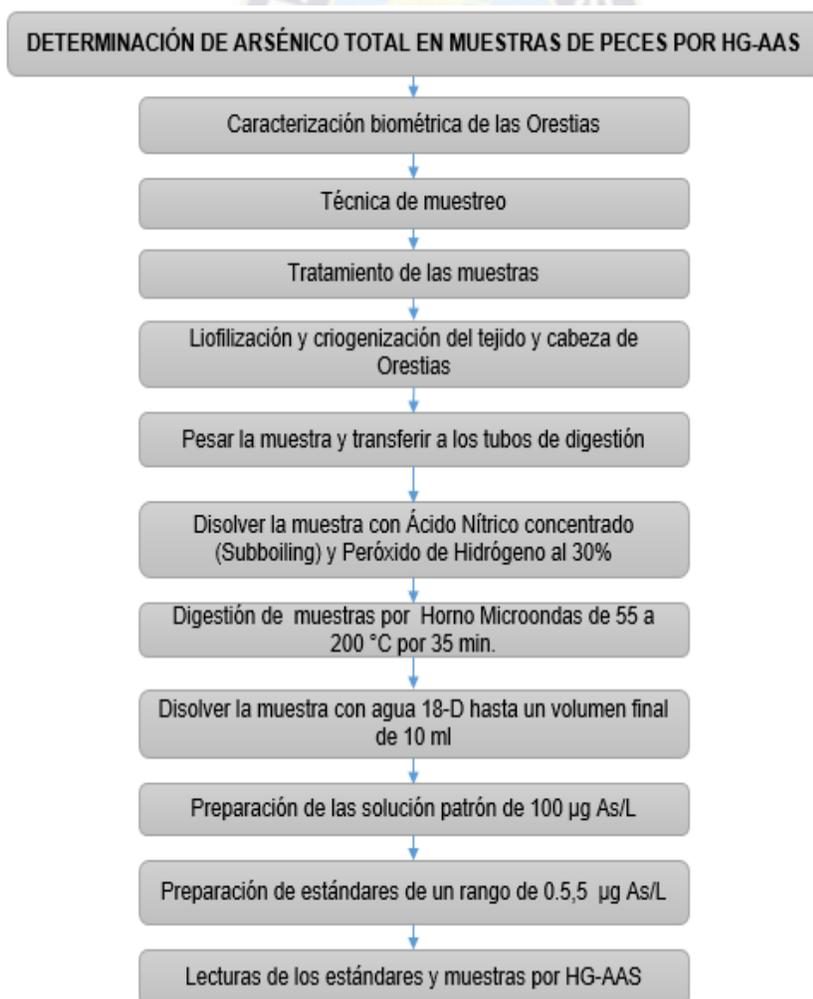
CAPÍTULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 Metodología para la determinación de As en peces

La metodología experimental optimiza la ejecución del trabajo considerando aspectos importantes mencionados en la (Figura 3.1), los cuales nos ayuda a darle seguimiento en el procedimiento de cuantificación de las muestras.

Figura 3. 1 Flujograma de trabajo para la determinación de Arsénico total en Peces



3.2 Técnicas de Muestreo

Las muestras de *Orestias* (Anexo A) fueron recolectadas en las zonas de Huatajata (Comunidad Chilaya) y Escoma (Comunidad Villa Puní) ambas ubicadas a orillas del Lago Titicaca.

Los peces se producen por los meses de invierno, la pesca se realizó el mes de septiembre temporada húmeda, las muestras fueron recolectadas a tempranas horas del día como 6:30 am, para ello el sistema de pesca se realiza empleando redes de nylon de mallas finas que son colocadas para la pesca nocturna, estos fueron recolectados utilizando botes de madera, las muestras fueron depositadas en baldes para su posterior clasificación, luego rotuladas y envueltas en papel aluminio, refrigerando en un recipiente de plástico llevando a una temperatura aproximadamente a 4 °C para la conservación durante el traslado a laboratorio.

3.2.1 Características Biométricas de las *Orestias*

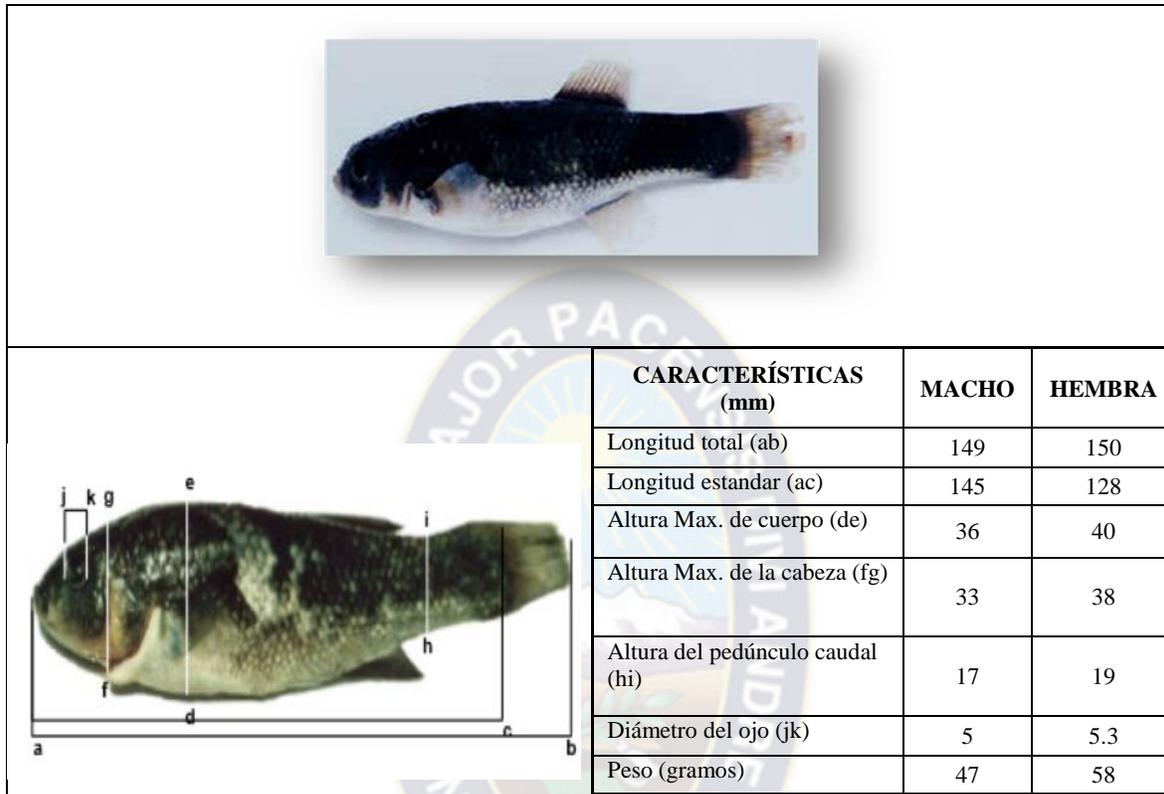
En el altiplano boliviano, los peces que se consumen con mayor proporción son aquellos que provienen de la cuenca del Lago Titicaca.

3.2.2 Características de los peces *Orestias Agassi* y *Orestias luteus*

3.2.2.1 El Carachi Negro (*Orestias Agassi*)

- Su distribución geográfica abarca a todo la cuenca del lago Titicaca.
- Se distinguen por su excesivo polimorfismo.
- Tienen una coloración variada, especialmente en los estadios juveniles. Los ejemplares adultos, son más negros en el dorso y más claras en los flancos y blancos en el vientre.
- El peso y tamaño promedio es de 47 g y 149 mm respectivamente.
- Es capturado conjuntamente con el Carachi amarillo, en zonas de abundante vegetación acuática.

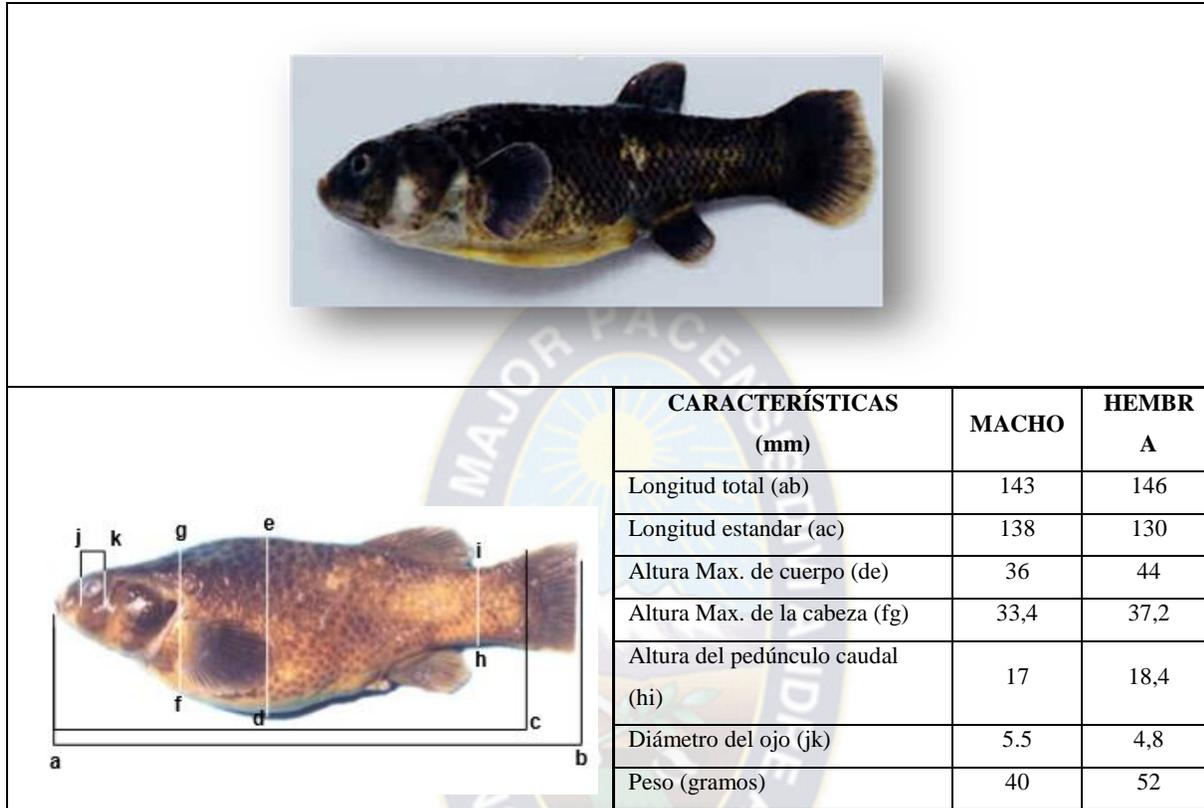
Figura 3. 2 Características Biométricas de *Orestias agassi*



3.2.2.2 Carachi amarillo (*Orestias Luteus*)

- Es un pez típico del litoral lacustre, realiza desplazamientos verticales entre el día (superficie) y la noche (fondo), se alimentan de moluscos.
- El peso y tamaño promedio es de 40 g y 138 mm respectivamente
- Se reproduce entre los meses de invierno seco.
- Sus poblaciones han sufrido un importante declive a causa de la proliferación de pejerreyes y de una pesca quizás inadecuada.

Figura 3. 3 Características Biométricas de Orestias luteus



3.2.3 Pre tratamiento de las muestras en laboratorio

3.2.3.1 Clasificación de las muestras

Las muestras de pescado fueron separadas según el tamaño: medianos y grandes en grupos de 4 - 7 cm (G-1) y 7 - 14 cm (G-2), se recolectaron alrededor de un total de 25 unidades de peces por zonas posteriormente las vísceras y las escamas fueron separadas empleando un cuchillo de titanio, lavando el tejido varias veces con agua destilada y desionizada, una vez realizado se separó la cabeza y el cuerpo para ser trabajadas de forma individual. Ambas partes tanto la cabeza y el cuerpo (tejido) fueron picadas con un bisturí en

partículas de tamaño máximo de 0,5 cm de diámetro y colocados en tubos falcón estos fueron cubiertos con tapas herméticas de goma y puestos en pre-congelación a -20 °C para su liofilización.

3.2.3.2 Liofilización de tejido y cabeza de *Orestias*

Cada muestra de tejido como cabeza fue cortada con bisturí y pre congelados a -20 ° C para liofilizar. La liofilización fue trabajada por lotes de cuatro a una temperatura de -50 °C y un vacío de 90×10^{-3} mbar durante ocho horas trabajadas en instalaciones del (Laboratorio de Calidad Ambiental – LCA). Una vez liofilizadas, las muestras fueron trituradas en una licuadora y posteriormente llevadas a criogenización donde 10 g de muestra es colocada a en recipiente de teflón añadiendo un poco de nitrógeno líquido donde la temperatura alcanza aproximadamente -100°C, a partir del cual se fragiliza de tal forma que puede molerse con mucha facilidad, se cierra herméticamente hasta lograr un polvo fino, las muestras fueron guardadas herméticamente bajo refrigeración a 4°C.

3.3 Metodología Experimental

Instrumental

Para el tratamiento de la muestra se utilizó un Digestor de Microonda Marca Anton Paar - Multiwave.

Para determinar la presencia de As en peces y cuantificar las muestras recolectadas, se utilizó un Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer AAnalyst 100 con Generador de Hidruros Perkin Elmer FIAS con sus respectivas lámparas.

Materiales y reactivos

Todos los materiales de vidrio y plástico fueron lavados con agua corriente y detergente neutro. Luego se lavó con ácido clorhídrico al 10 % y se los enjuago con agua corriente, finalmente se realizó un enjuague con agua destilada y agua ultra pura. Los reactivos utilizados para el análisis fueron de grado analítico y se comprobó en su ficha técnica.

El agua empleada para la preparación de las soluciones de reactivos y estándares fue de grado ultra pura 18-D (18,2 MΩ/cm).

3.3.1 Tratamiento de la muestra

3.3.1.1 Digestión de muestras por (Horno Microondas)

Las muestras fueron tratadas realizando una adaptación según al método oficial de la AOAC³⁶, como se describe a continuación.

Reactivos

- Ácido Nítrico 65% p.a. (Anedra). Subboiling para análisis de trazas
- Peróxido de Hidrogeno 30% v/v (W&Z Winkler L.T.D.A)
- Agua 18-D (18,2 MΩ/cm)

Material y Equipo

- Matraz aforado de 10, 50, 100 mL (clase A)
- Probeta de 50 mL
- Vasos de digestión: recipiente de teflón o cuarzo
- Balanza Analítica marca Sartorius i-100
- Microondas (Anton Paar-Multiwave; rotor de 6 vasos de cuarzo)

³⁶ (AOAC)

Procedimiento

1. Pesar aproximadamente $0,30 \pm 0,02$ g de la muestra en un vaso de digestión
2. Adicionar 4 ml de ácido nítrico concentrado esperar alrededor de una hora para que pueda destruirse la materia orgánica
3. Adicionar 2 mL de peróxido de hidrogeno al 30 % v/v dejando en reposo por 15 min
4. Cerrar el vaso de digestión (ajustar cuidadosamente la llave de cierre) y colocar el recipiente en el carrusel.
5. Realizar la digestión siguiendo los pasos que se describen en la Tabla 3.1 desde una temperatura de 35°C a 200°C en 35 min, manteniendo la temperatura final por 10 min.
6. Enfriar el sistema y dejar reposar a temperatura ambiente y transferir la muestra digerida a un matraz aforado de 10 mL y aforar con agua 18-D ($18,2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$) (Anexo A2).
7. Finalmente las muestras digeridas y debidamente aforadas, junto con los correspondientes blancos se guardan en recipientes de plástico, conservándose a 4°C en ausencia de luz a 4°C hasta su correspondiente análisis.

3.3.1.2 Descripción del programa de digestión Antor Para

El programa de energía representa un generador de consigna que se ejecuta un perfil de potencia / hora que consiste en tres fases. Cada fase comprende el calentamiento por microondas, una potencia inicial el tiempo de duración de la energía, un fuerza extrema y un ventilador de paso de energía para el módulo de escape.

- Potencia (W): potencia inicial y al final del calentamiento por microondas
- Tiempo (T1): tiempo de duración igual a la potencia final
- Ventilador: paso de potencia del módulo de escape.

Tabla 3. 1 Programa de digestión Horno Antor Paar

Paso	Potencia (W1)	T1	Potencia (W2)	Ventilación
1	100	05:00	500	1
2	800	15:00	800	1
3	0	15:00	0	3

Fuente: Elaboración Propia

3.3.1.3 Preparación de soluciones

El material de vidrio empleando fue lavado con bastante agua corriente y agua destilada, posteriormente se dejó durante toda la noche en ácido clorhídrico al 10% (para evitar posible contaminación) antes de ser usados se lavó varias veces con agua 18-D (18,2 M Ω /cm), así mismo todas las soluciones fueron preparadas con agua 18 – D como se muestra a continuación.

Reactivos

- Solución estándar de Arsénico 1000 ppm (Perkin Elmer)
- Ácido Clorhídrico 37% p.a. (J.T.Baker)
- Ácido Ascórbico 99% (SIGMA ALDRICH)
- Ioduro de Potasio 99% (SIGMA ALDRICH)
- Borohidruro de Sodio 96% (SIGMA)
- Hidróxido de Sodio 98% p.a.(MERCK)
- Agua 18-D (Resistividad < 18,2 M Ω /cm)

Material y Equipo

- Matraz aforado de 50 y 1000 mL (clase A)
- Micro pipetas Eppendorff de 200, 1000 μ L
- Vaso de precipitado de 50 mL.(clase A)
- Probeta de vidrio graduado de 50 y 100 mL

3.3.1.4 Soluciones patrones de 100ppb

Las soluciones utilizadas para la calibración se preparan a partir de un estándar que tiene una concentración de 1000 ppm, por otro lado la solución debe ser acidificada con HNO_3 (bi-destilado) siendo esto muy importante porque permite la estabilidad del estándar.

Procedimiento

1. Se toma 0,1 mL de la solución estándar de 1000 mg/l (ppm) y se lleva a un volumen de 100 mL con agua 18 – D (18,2 $\text{M}\Omega/\text{cm}$), obteniéndose así una solución de 1000 $\mu\text{g As/L}$ (ppb).
2. Para obtener una concentración de 100 $\mu\text{g As/L}$ se toma 10 mL de la solución de 1000 ppb y se lleva a un volumen de 100 mL con agua 18 – D.

3.3.1.5 Solución de NaBH_4 / NaOH

La solución de NaBH_4 0,2%/ NaOH 0,05% fue preparada diariamente.

1. Se pesan 2,08 g de Borohidruro de Sodio (NaBH_4).
2. Se pesan 0,51g de Hidróxido de Sodio (NaOH).
3. Se disuelven cada uno separadamente con agua 18-D.
4. Se transfiere a un matraz aforado de 1000 mL arrastrando todo remanente de cada vaso.
5. Se afora con agua 18-D (18,2 $\text{M}\Omega/\text{cm}$).

Solución de HCl

La solución de trabajo de HCl 10% fue preparada:

1. Medir 100 ml de Ácido Clorhídrico concentrado en una probeta de 100 mL
2. Transferir a un matraz aforado de 1000 mL arrastrando todo el remanente de la probeta.
3. Aforar con agua 18-D (18,2 MΩ/cm).

3.3.1.6 Solución de yoduro de potasio /ácido ascórbico (KI/ C₆H₈O₆)

Procedimiento

Las soluciones de KI 5% y Ácido Ascórbico 5% fueron preparadas habitualmente:

1. Pesar 5 g de Yoduro de Potasio, KI
2. Pesar en forma separada 5 g de Ácido Ascórbico, C₆H₈O₆
3. Transferir a un matraz aforado de 100 mL lavando varias veces y arrastrando todo remanente del vaso
4. Aforar con agua 18-D (18,2 MΩ/cm).

3.3.2 Procedimiento de preparación de estándares y muestras para su análisis

Curva de calibración

Para llevar a cabo el análisis fue necesaria la preparación de estándares de concentraciones de 0 a 5,5 µg As/L a partir de la solución patrón de 100 µg As/L.

1. Se tomaron los volúmenes respectivos para obtener soluciones en el intervalo de concentraciones de 0 a 5,5 µg As/L las mismas fueron llevadas a un matraz aforado de 50 mL.
2. Se adicionó a cada estándar 5 mL de ácido clorhídrico concentrado y 5 mL de una mezcla de (Ioduro de Potasio y Ácido Ascórbico).
3. Se afora con agua 18-D (18,2 MΩ/cm) homogenizando y se deja en reposo 45 min a temperatura ambiente para la lectura.

Preparación de Muestras

Se preparan los estándares para la determinación del contenido total de arsénico en muestras de peces, realizando posteriormente la evaluación de la linealidad

Las muestras digeridas y los correspondientes blancos de digestión se analizaron mediante HG-AAS, por el cual se trataron las muestras por el siguiente

Procedimiento:

1. Se tomaron las muestras digeridas realizadas por horno microondas.
2. El residuo obtenido se re disolvió en 3 mL de agua 18-D y se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y 1 mL de una mezcla de (Yoduro de Potasio y Ácido Ascórbico).
3. Se afora con agua 18-D (18,2 MΩ/cm).homogenizando la mezcla resultante a un volumen final de 10 mL y se deja en reposo 45 min a temperatura ambiente para su análisis.

3.4 Determinación de la linealidad

Para determinar la linealidad del método se realizan los siguientes pasos:

1. Se preparan curvas de calibración de un rango de concentración (0 - 5,5 µgAs/L), con el objetivo de obtener un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,999.
2. Utilizando los criterios de parámetros de validación - linealidad, se realizan cinco lecturas de cada concentración preparadas de forma independiente (Anexo B.1)
3. Se calcula el coeficiente de correlación, intercepto y pendiente.

3.5 Determinación del límite de detección y cuantificación

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación se puede establecer mediante.

1. Mediciones en blancos fortificados 8 mediciones por duplicado
2. Considerar los datos del estudio de linealidad

3.6 Determinación de la precisión

Para la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad se realiza lo siguiente:

1. Se considera los valores de la linealidad en 6 niveles de concentración por cuadruplicado.
2. Considerar para la repetibilidad misma muestra, método, laboratorio, reactivos, condiciones ambientales, tiempo, personal.
3. Considerar para la reproducibilidad misma muestra, método, diferente equipo, reactivos, condiciones ambientales, tiempo personal.

3.7 Determinación de la exactitud

Para la determinación de la exactitud se recomienda lo siguiente:

1. Considerar los datos del intervalo lineal
2. Considerar los datos de muestra fortificada
3. Realizar al menos 8 mediciones por duplicado

3.8 Determinación de la robustez

Para el estudio de la Robustez se procede a exponer a cada factor a un estudio de variable, es decir se expone a una variación respecto a la establecida en el método es decir que cada variable mediante un valor alto (A, B, C, D y E) y otro bajo (a, b, c, d y e) una vez diseñada se realizan ocho pruebas de ensayo. Para esta determinación se aplica el Test de Youden y Steiner para la evaluación de un análisis químico analítico el procedimiento te permite evaluar variables con solo ocho análisis de una muestra.

Para la selección de las variables de estudio; se toma en cuenta algunas observaciones durante el análisis. Por ejemplo:

1. Temperatura: Durante el análisis varia la temperatura.
2. Equipos: realizar las lecturas con dos equipos con las mismas características pero condiciones diferentes,

3. Tiempo de agitación: considerar el tiempo de agitación
4. Tiempo de reacción: realizar las lecturas en el transcurso de los 45 min.
5. Reactivos: utilizar reactivos de diferentes marcas.
6. Analista: trabajar en el análisis con diferentes analistas
7. Mineralización de muestra: considerar el tiempo de mineralización al adicionar los reactivos como el ácido nítrico y peróxido de hidrogeno

3.9 Determinación de la estimación de la incertidumbre en base a datos de validación.

Para determinar la estimación de la incertidumbre se trabaja en base a los datos generados realizados con los anteriores parámetros, especificando el factor de cobertura y el porcentaje de confianza

La sistemática para la estimación es:

1. Calcular la precisión intermedia S_w
2. Calcular la desviación del sesgo DESRs
3. Combinar ambos componentes en términos relativos:

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Validación de método de arsénico total en peces

Para la validación se realizaron pruebas en muestras de peces considerando además muestras fortificadas.

4.1.1 Resultados de la prueba de linealidad

En la siguiente tabla, se presentan los resultados de las pruebas experimentales para la determinación de la linealidad, para ello realizamos 20 lecturas en seis niveles de concentraciones diferentes (Anexo B.1), en resumen mostramos la (Tabla 4.1).

Tabla 4. 1 resumen de resultados experimentales para la determinación de la Linealidad

NIVEL	Concentración ($\mu\text{g As/L}$) (Y^{\wedge})	Área (Y=J)
1	0,5	0,512
2	1,5	1,513
3	2,5	2,513
4	3,5	3,512
5	4,5	4,512
6	5,5	5,511

Fuente: Elaboración propia

En la siguiente tabla se presenta la evaluación de los resultados en base al test de Cochran's.

4.1.1.1 Evaluación de resultados experimentales para la determinación de la linealidad según el test de Cochran's.

En la tabla, se presenta el trabajo estadístico para la evaluación del método de descarte de G de Grubbs y la C de Cochran's.

Tabla 4. 2 Resumen de evaluación de los resultados experimentales, para la determinación de la linealidad

Niveles	Conc.	Datos experimentales promedio	Promedio	Evaluación de datos					
				G Grubbs	G tablas 95%	Evaluación G tab > G cal	C Cochran's	C tablas 95%	Evaluación C tab > C cal
1	0,5 µg As/L	0,510	0,512	1,055	2,708	ACEPTA	0,319	0,389	ACEPTA
		0,511		0,396					
		0,511		0,396					
		0,512		0,264					
		0,514		1,583					
2	1,5 µg As/L	1,511	1,513	0,859	2,708	ACEPTA	0,302	0,389	ACEPTA
		1,510		1,217					
		1,516		0,931					
		1,516		0,391					
		1,514		0,215					
3	2,5 µg As/L	2,510	2,513	1,604	2,708	ACEPTA	0,334	0,389	ACEPTA
		2,514		0,535					
		2,513		0,000					
		2,515		1,069					
		2,513		0,000					
4	3,5 µg As/L	3,511	3,512	0,614	2,708	ACEPTA	0,319	0,389	ACEPTA
		3,513		0,920					
		3,512		0,153					
		3,513		0,920					
		3,510		1,382					
5	4,5 µg As/L	4,510	4,512	1,095	2,708	ACEPTA	0,238	0,389	ACEPTA
		4,511		0,487					
		4,513		0,730					
		4,511		0,487					
		4,514		1,339					
6	5,5 µg As/L	5,499	5,511	1,502	2,708	ACEPTA	0,368	0,389	ACEPTA
		5,515		0,427					
		5,510		0,331					
		5,515		1,185					
		5,515		0,220					

Considerando la evaluación estadística y cerciorando de que cumple la condición de $C_{tab} > C_{cal}$ y $G_{tab} > G_{cal}$ verificando decimos que se aceptó todos los valores experimentales debido a que cumplen con la condición. A partir de ellos damos paso a la determinación de la linealidad y rango de trabajo.

4.1.1.2 Evaluación de datos para la determinación de la linealidad

Para la evaluación de la linealidad los datos experimentales se evaluaron en base a la covarianza y la t de student.

En la evaluación para la determinación de la linealidad se consideró trabajar con las concentraciones con la (Tabla 4.3) representados en concentración de $\mu\text{g As/L}$.

Tabla 4. 3 Valores para establecer el rango de trabajo.

NIVEL	Concentración ($\mu\text{g As/L}$) (Y^{\wedge})	Área ($Y=J$)
1	0,5	0,512
2	1,5	1,513
3	2,5	2,513
4	3,5	3,512
5	4,5	4,512
6	5,5	5,511
Pendiente (b)		1,000
Intercepto (a)		0,001
Coeficiente de correlación (r)		1.000
t calculado		4483,225
t tabulado		2,132
Covarianza (COV)		2,916

Fuente: Elaboración propia

Con los resultados se realiza el análisis estadístico, hallando la covarianza y el modelo lineal como: intercepto, pendiente, coeficiente de correlación, además $t_{calculado}$.

Con los valores hallados consideramos el criterio de aceptación con la t – Student para la evaluación de la linealidad.

t_{cal} = valor estimado de la t student obtenido para el coeficiente de correlación

r = valor absoluto del coeficiente de correlación

$p - 2$ = número de grados de libertad

r^2 = valor del coeficiente de determinación

Para la determinación de t_{cal} se trabaja con un grado significativo del 95 % y $(p - 2)$ grados de libertad comparando con el valor tabulado para el nivel de confianza requerido ($\alpha = 0,05$), para ello se usa los niveles de calibración “p”, el valor crítico es verificado en (AnexoE1, t - Student): para 4 grados de libertad, $\alpha = 0,05$, $t_{tab} = 2,132$, mostrada (Tabla 4.4)

Tabla 4. 4 Valor crítico

1 cola	90%	95%	97.5%	99%	99,5%
α	0.10	0.05	0.025	0.01	0.0015
v					
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	1.638	2.553	3.182	4.541	5.841
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499

t_{cal}	4483,225
t_{tab}	2,132
COV	2,916

Considerando el criterio de aceptación con t- Student decimos: $t_{cal} 4483,225 \geq t_{tab} 2,132$ esto quiere decir que existe correlación entre los valores de referencia y la respuesta del método, obteniendo como conclusión que el intervalo estudiado es lineal.

Con los datos del modelo, se considera evaluar los criterios de aceptación

COV = 0 Sistema esta correlacionado

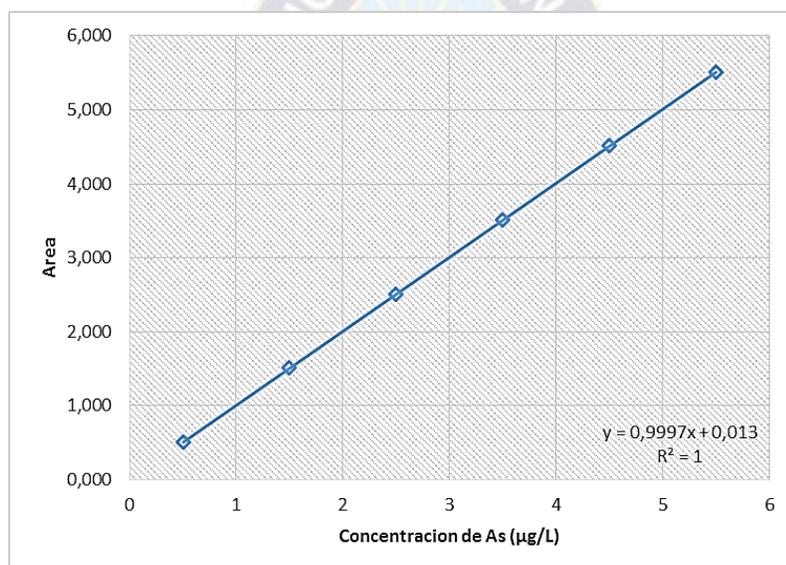
COV < 0 El sistema tiene proporcionalidad indirecta

COV > 0 El sistema tiene proporcionalidad directa

La covarianza calculada fue 2,916 es mayor a 0, se determina que el sistema es directamente proporcional, por lo que el modo es lineal entre los rangos de 0,5 a 5,5 μg As /L en muestras de pescado.

El siguiente gráfico se construye con los valores obtenidos en de (Tabla 4,3)

Figura 4. 1 Linealidad de los valores experimentales



Fuente: Elaboración propia

Con la evaluación estadística de la t de student se demuestra que se cumple la correlación entre las lecturas obtenidas en la parte experimental, en cuanto a la covarianza el sistema demuestra que es proporcional. El rango de trabajo es de 0,02 a 5,50 $\mu\text{gAs/L}$ total en muestras naturales.

4.1.1.3 Verificación de la linealidad a concentraciones menores a 2,5 µgAs/L.

Para demostrar la linealidad a concentraciones menores a 2,5 µg/L se requiere cumplir algunos criterios realizados anteriormente en la que estadísticamente se puede justificar esa linealidad para ello se construye una (Tabla 4.5) absorbancia vs concentración graficando tenemos (Figura 4.2)

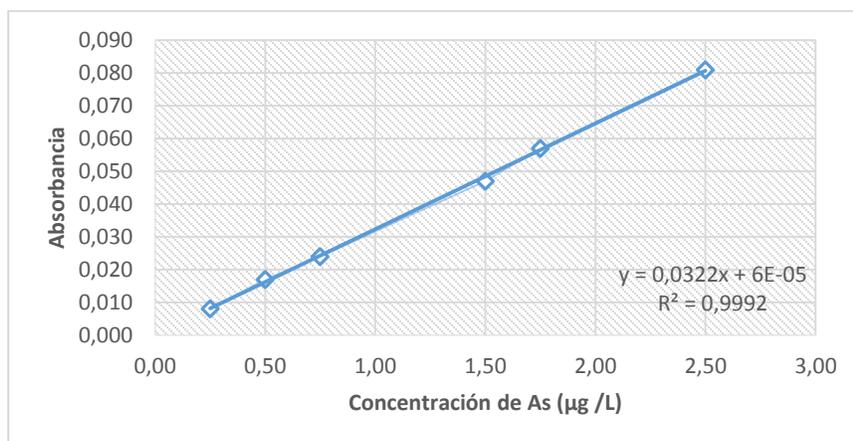
Tabla 4. 5 Verificación de la linealidad a una concentración menor a 2,5 µg As/L

Concentración µgAs/L	Absorbancia
0,25	0,008
0,50	0,017
0,75	0,024
1,50	0,047
1,75	0,057
2,50	0,081
b	31,0047
a	0,00006
r	0,9996
t cal	69,698
t tab	2,132
COV	0,020

Fuente: Elaboración propia

Analizamos la linealidad considerando el criterio de aceptación t- Student y decimos que $t_{cal} \geq t_{tab}$ esto significa que existe correlación entre los valores de referencia obteniendo como conclusión que el intervalo estudiado es lineal.

Figura 4. 2 Absorbancia vs Concentración



Fuente: Elaboración propia

4.1.2 Resultados de las pruebas de límite de detección y cuantificación

La evaluación del límite de detección y cuantificación se trabajó a partir de los valores de la (Tabla 4.6) donde nos indica que la concentración mínima detectable para la determinación de arsénico en matrices de peces es 0,016 µg As/L y el valor mínimo cuantificable para la matriz es 0,022 µg As/L.

Tabla 4. 6 Límite de detección y cuantificación para la determinación de As

Concentración (µgAs/L) (Y [^])	Área (Y=J)
0,5	0,512
1,5	1,513
2,5	2,513
3,5	3,512
4,5	4,512
5,5	5,511
b	1,000
a	0,013
r	1,000
Sx/y (SD)	0,001
LOD	0,016
LOQ	0,022

Cálculo del límite de detección y cuantificación
 $LOD = a + 3 * S_{x/y}$
 $LOQ = a + 10 * S_{x/y}$

Fuente: Elaboración propia

$$\text{LOD} = 0,013 + 3 * 0,001 = 0,016 \mu\text{g As/L}$$

$$\text{LOQ} = 0,013 + 10 * 0,001 = 0,022 \mu\text{g As/L}$$

Según los criterios de parámetros de validación – límite de detección y cuantificación se recomienda tener en consideración la realización 8 lecturas de un blanco fortificado con un contenido de analito de 2µg As/L (Tabla 4.7) para evaluar el criterio de aceptación. Un criterio de aceptación adecuada es $LC < LOD < LOQ$ que nos indica el valor verdadero de la media.

Tabla 4. 7 Valores de concentración de un blanco fortificado para el cálculo del límite de detección y cuantificación

Muestra	Resultado (µgAs/L)
1	1,990
2	1,958
3	2,024
4	2,124
5	2,059
6	2,016
7	1,972
8	2,270
Promedio	2,052
Sx/y (SD)	0,103

Fuente: Elaboración Propia

LOD = Límite de detección

DS = Desviación estándar

Si: $t(0,05, \infty) \rightarrow 1,645$ valor determinado de la t student (Anexo E1, t - Student)

$$\text{LC} = t(1-\alpha; v) * \text{DS}$$

$t = t - \text{student}$

$1 - \alpha = \text{probabilidad } b$

$v = \text{Grados de libertad}$

$DS = \text{Desviación estandar de las lecturas del blanco fortificado}$

4.1.2.1 Determinación del valor crítico

$$\mathbf{LC = 1,645 * DS}$$

$$LC = 1,645 * 0,103 = 0,169 \mu\text{g As/L}$$

Evaluando el límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) tomamos en cuenta la siguiente ecuación:

$$\mathbf{LOD = 2 t_{(1-\alpha; v)} * SD}$$

$$\mathbf{LOQ = 10 * SD}$$

Decimos que: si $t(0,05, \infty) \rightarrow 1,645$

$$\mathbf{LOD = 3,29 * DS}$$

Entonces el valor determinado será:

$$LOD = 3,29 * 0,103 = 0,339 \mu\text{g As /L}$$

$$LOQ = 10 * DS = 10 * 0,103 = 1,028 \mu\text{g As /L}$$

$$\mathbf{LC < LOD << LOQ}$$

$$0,169 < 0,339 < 1,028$$

En este sentido, se puede decir que cumple con la condición de criterios de aceptación.

4.1.3 Determinación de precisión

La precisión se podrá establecer en términos de repetibilidad y reproducibilidad, para ello se trabaja con diferentes concentraciones de 6 niveles (Anexo C1), cada concentración por cuadruplicado para esta prueba es significativa debido a que los datos obtenidos ver (Tabla 4.8) nos ayudará a evaluar la precisión.

Tabla 4. 8 Datos para la determinación de Repetibilidad y Reproducibilidad

ENSAYITA	VR							
	0,5 µg As/L				1,5 µg As/L			
	N							
	1				2			
1	0,503	0,512	0,512	0,514	1,539	1,518	1,518	1,510
2	0,481	0,509	0,508	0,496	1,510	1,476	1,476	1,486
1	0,502	0,498	0,495	0,513	1,550	1,492	1,519	1,520
2	0,495	0,503	0,493	0,489	1,581	1,513	1,547	1,570
1	0,513	0,512	0,485	0,511	1,544	1,498	1,551	1,480

Fuente: Elaboración propia

La preparación y lecturas las efectuó cada analista utilizando la misma solución patrón de As, la evaluación de los resultados se realiza para cada nivel según el criterio mencionado en parámetros de validación – precisión, las mismas se muestran a continuación ver (Tabla 4.9).

Tabla 4. 9 Cálculo para el primer nivel

	T3					
PROMEDIO	NÚMERO	DS	T1	T2	T4	T5
0,510	4	0,005	2,040	1,040	16	0,000
0,499	4	0,013	1,996	0,996	16	0,001
0,502	4	0,008	2,008	1,008	16	0,000
0,495	4	0,006	1,980	0,980	16	0,000
0,505	4	0,014	2,020	1,020	16	0,001
	20		10,044	5,045	80	0,001

Fuente: Elaboración propia

A continuación se observan los cálculos realizados para el primer nivel, los resultados de los otros niveles se muestran en (Anexo.C2)

Primer nivel

	T3					
PROMEDIO	NÚMERO	DS	T1	T2	T4	T5
0,510	4	0,005	2,040	1,040	16	0,000
0,499	4	0,013	1,996	0,996	16	0,001
0,502	4	0,008	2,008	1,008	16	0,000
0,495	4	0,006	1,980	0,980	16	0,000
0,505	4	0,014	2,020	1,020	16	0,001
	20		10,044	5,045	80	0,001

Fuente: Elaboración propia

Se determina la desviación estándar de las cuatro replicas $DS = 0,005$ y para hallar T1, T2, T3, T4 y T5 como se aprecia en el cuadro, se calcula de la siguiente manera, tomando en cuenta que $n =$ número de réplicas:

T1 → $T1 = \sum n * \dot{x}$ **T1** = $4 * 0,510 = 2,040$

T2 → $T2 = \sum n * \dot{x}^2$ **T2** = $4 * 0,510^2 = 1,040$

T4 → $T4 = \sum n^2$ **T4** = $4^2 = 16$

T5 → $T5 = (n - 1) * Ds^2$ **T5** = $(4-1) * 0,005^2 = 0,000075$

Los resultados se reportan con tres dígitos, en cuanto a T5 apreciando el resultado 0,000075 y poder reportar en la tabla lo redondeamos teniendo 0,000.

En la determinación de S_r^2 , S_L^2 , S_R^2 , m^{\wedge} , S_r y S_w se calcula de la siguiente manera:

$$S_r^2 \rightarrow S_r^2 = \frac{T_5}{T_3 - p}$$

$$S_r^2 = \frac{0,000}{(4-5)} = 0,000$$

$$S_L^2 \rightarrow S_L^2 = \left(\frac{T_2 \times T_3 - T_1^2}{T_3} - S_r^2 \right) \left(\frac{T_3(P-1)}{T_3^2 - T_4} \right)$$

$$S_L^2 = \left(\frac{5,045 \times 20 - 10,044^2}{20} - 0,000^2 \right) \left(\frac{20(5-1)}{20^2 - 80} \right) = 0,000$$

$$S_R^2 \rightarrow S_R^2 = S_r^2 + S_L^2$$

$$S_R^2 = 0,000 + 0,000 = 0,000$$

$$m^{\wedge} \rightarrow m^{\wedge} = \frac{T_1}{T_3}$$

$$m^{\wedge} = \frac{10,044}{20} = 0,502$$

$$S_r \rightarrow S_r = \sqrt{S_R^2}$$

$$S_r = \sqrt{0,000106} = 0,010$$

$$S_w \rightarrow S_r = \sqrt{S_r^2}$$

$$S_r = \sqrt{0,00010} = 0,010$$

El resumen de resultados realizados para cada una de las ecuaciones mostradas anteriormente se muestra en la (Tabla 4.10)

Tabla 4. 10 Resumen de datos experimentales de repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia

Nivel	P	Sr2	SL2	SR2	m [^]	Sr	Sw
Nivel 1	5	0,001	-7,27E-05	0,001	0,502	0,010	0,010
Nivel 2	5	0,001	3,37E-04	0,001	1,520	0,032	0,025
Nivel 3	5	0,001	1,07E-04	0,001	2,511	0,038	0,037
Nivel 4	5	0,001	2,84E-04	0,002	3,511	0,040	0,037
Nivel 5	5	0,003	-2,41E-04	0,002	4,498	0,049	0,051
Nivel6	5	0,002	5,06E-04	0,002	5,515	0,046	0,040

Fuente: Elaboración propia

Sr = Repetibilidad

SL = variación intralaboratorio

SR = Reproducibilidad

Sw = Precisión Intermedia

m[^] = Promedio de cada nivel

4.1.3.1 Criterio de aceptación para la precisión

El criterio de aceptación para la precisión se realiza en base al coeficiente de variación de Horwitz.

En este sentido se establece para la repetibilidad el CV_r% obtenido debe ser < (CV_h%/2) y en el caso de la reproducibilidad interlaboratorio el CV_R% < CV_h%, para la reproducibilidad interna (intralaboratorio) CV_{Ri}% < (2CV_{hRi}%/3).

Para realizar la evaluación de los criterios de aceptabilidad para la reproducibilidad y repetibilidad en base al coeficiente de Horwitz trabajamos de la siguiente manera:

Ensayistas 1, (Tabla 4.11) datos de lectura de repetibilidad

(Tabla 4.12) promedio parcial de cada nivel para la evaluación según el criterio de aceptabilidad.

Ensayistas 2, (Tabla 4.13) datos de lecturas de reproducibilidad

(Tabla 4.14) promedio parcial de cada nivel para la evaluación según el criterio de aceptabilidad.

DS = Desviación de estandar

CVr% = Porcentaje de coeficiente de variación (repetibilidad)

CVh% = Porcentaje de coeficiente de variación de Horwitz

CVRi% = Porcentaje de coeficiente de variación (Reproducibilidad)

CVhRi% = Porcentaje de coeficiente de variación de Horwitz

Tabla 4. 11 Datos de lectura de repetibilidad

Muestra	Nivel 1			Nivel 2		
	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.1	Rep.2	Rep.3
1	0,503	0,502	0,513	1,539	1,550	1,544
2	0,512	0,498	0,512	1,518	1,492	1,498
3	0,512	0,495	0,485	1,518	1,519	1,551
4	0,514	0,513	0,511	1,510	1,520	1,480

Fuente: Elaboración propia

Ejemplo de cálculos de repetibilidad Nivel 1

Hallamos el promedio del primer nivel de la tabla 4.11 de forma vertical como resultados tenemos:

$$\text{Prom. N1} = \frac{\sum(\text{Rep. 1} + \text{Rep. 2} + \text{Rep. 3})}{n}$$
$$\text{Prom. N1} = \frac{0,503 + 0,502 + 0,513}{3} = 0,506 \mu\text{gAs/L}$$

En la determinación de los resultados de la tabla 4.12 para el nivel 1 tenemos:

Prom = 0,5058

Ds = 0,0064

$$\text{CVr}\% = \frac{0,0064}{0,5058} \times 100 = 1,26$$

Ecuación de coeficiente de variación de Horwitz:

$$\text{CV}_h\% = 2^{(1-0,5)\log C}$$

Donde:

C = Valor nominal del analito expresado en potencia de 10

Este valor se obtiene aplicando la teoría de Horwitz-Thompson, en este caso trabajamos con un valor próximo a los cinco niveles, revisando la tabla de Horwitz (Anexo E1) trabajamos con 1ppm el valor nominal indica 10^{-9} dicho esto se calcula de la siguiente manera tanto para los cálculos de la reproducibilidad y repetibilidad.

$$\text{CVh}\% = \frac{2^{(1-0,5)\log C}}{2}$$

$$\text{CVh}\% = \frac{2^{(1-0,5)\log 0,5 \times 10^{-9}}}{2} = 25,12\%$$

Tabla 4. 12 Promedios parciales de cada nivel de la repetibilidad

Muestra	Prom.N1	Prom.N2	Prom.N3	Prom.N4	Prom.N5	Prom.N6
1	0,506	1,544	2,521	3,531	4,491	5,561
2	0,507	1,503	2,524	3,515	4,537	5,496
3	0,497	1,529	2,534	3,516	4,539	5,543
4	0,513	1,503	2,513	3,520	4,447	5,517
Prom.	0,506	1,520	2,523	3,520	4,504	5,529
DS	0,006	0,020	0,009	0,007	0,044	0,029
CVr%	1,26	1,35	0,35	0,20	0,98	0,52
CVh%	25,12	21,29	19,71	18,73	18,04	17,51

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo a Horwitz CVr% podemos decir que se cumple el criterio de aceptabilidad.

$$CVr\% < (CVh\%/2)$$

Tabla 4. 13 Datos de lectura de reproducibilidad

Muestra	Nivel 1		Nivel 2	
	Rep.1	Rep.2	Rep.1	Repl.2
1	0,481	0,495	1,510	1,581
2	0,509	0,503	1,476	1,513
3	0,508	0,493	1,476	1,547
4	0,496	0,489	1,486	1,570

Fuente: Elaboración propia

Ejemplo de cálculos de reproducibilidad Nivel 1

Hallamos el promedio del primer nivel de la (Tabla 4.13) de forma vertical como resultados tenemos:

$$Prom. N1 = \frac{\sum(Rep. 1 + Rep. 2)}{n}$$

$$Prom. N1 = \frac{0,481+0,495}{2} = 0,488 \mu gAs/L$$

En la determinación de los resultados de la (Tabla 4.14) para el nivel 1 tenemos:

Prom = 0,4968

Ds = 0,0080

$$CV_{Ri}\% = \frac{0,0080}{0,4968} \times 100 = 1,62$$

Ecuación de coeficiente de variación de Horwitz:

$$CV_h\% = 2^{(1-0,5)\log C}$$

Donde:

C = Valor nominal del analito expresado en potencia de 10

Este valor se podrá obtener aplicando la teoría de **Horwitz-Thompson**.

$$CV_{hRi}\% = \frac{2 \times 2^{(1-0,5)\log C}}{3}$$

$$CV_{hRi}\% = \frac{2 \times 2^{(1-0,5)\log 0,5 \times 10^{-9}}}{3} = 33,48$$

Tabla 4. 14 Promedios parciales de cada nivel de la reproducibilidad

Muestra	Prom.N1	Prom.N2	Prom.N3	Prom.N4	Prom.N5	Prom.N6
1	0,488	1,545	2,506	3,493	4,525	5,488
2	0,506	1,495	2,498	3,509	4,459	5,475
3	0,501	1,511	2,518	3,522	4,473	5,492
4	0,493	1,528	2,455	3,465	4,500	5,525
Prom.	0,497	1,520	2,494	3,497	4,489	5,495
DS	0,008	0,022	0,027	0,025	0,029	0,021
CVR%	1,62	1,44	1,09	0,70	0,65	0,39
CVhRi%	33,48	28,38	26,28	24,99	24,06	23,34

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo a Horwitz CV% podemos decir que se cumple el criterio de aceptabilidad.

$CV_{Ri}\% < (2CV_{hRi}\%/3)$.

4.1.3.2 Análisis de resultados para la determinación de la precisión intermedia

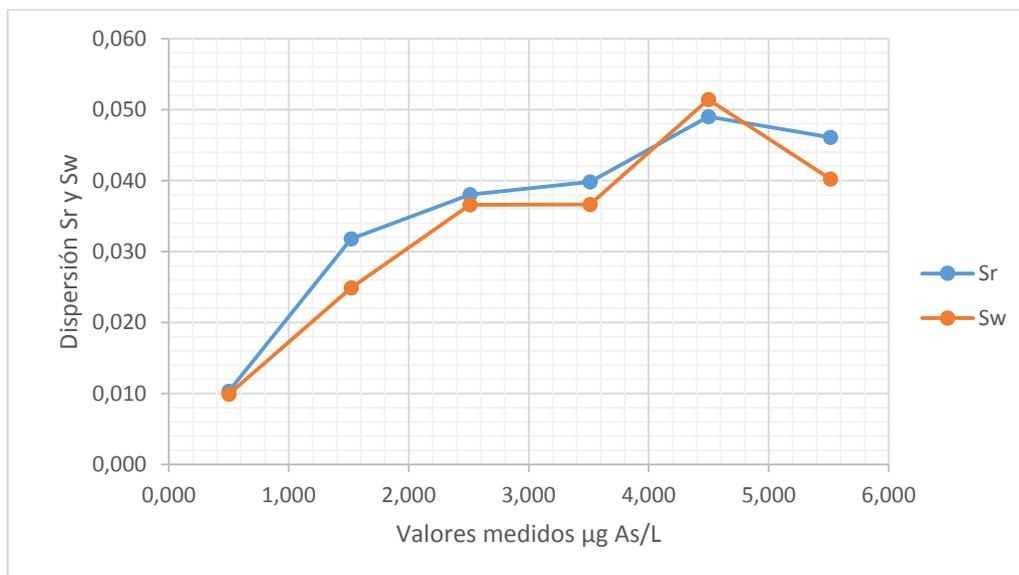
Los resultados experimentales obtenidos se utilizan para realizar el cuadro de evaluación de la precisión intermedia ver (Tabla 4.15)

Tabla 4. 15 Evaluación de los datos en la determinación de la precisión intermedia.

Niveles	Datos experimentales promedio	Evaluación de datos						Sw
		G Grubbs	G tablas 95%	Evaluación G tab > G cal	C Cochran's	C tablas 95%	Evaluación C tab > C cal	
1	0,510	1,361	1,715	ACEPTA	0,389	0,532	ACEPTA	0,010
	0,499	0,628						
	0,502	0,036						
	0,495	1,217						
	0,505	0,519						
2	1,521	0,058	1,715	ACEPTA	0,392	0,532	ACEPTA	0,025
	1,487	1,414						
	1,520	0,015						
	1,553	1,411						
	1,518	0,071						
3	2,525	0,643	1,715	ACEPTA	0,302	0,532	ACEPTA	0,037
	2,483	1,361						
	2,538	1,259						
	2,505	0,294						
	2,506	0,247						
4	3,499	0,511	1,715	ACEPTA	0,377	0,532	ACEPTA	0,037
	3,513	0,089						
	3,546	1,446						
	3,481	1,259						
	3,517	0,236						
5	4,493	0,234	1,715	ACEPTA	0,359	0,532	ACEPTA	0,051
	4,509	0,553						
	4,524	1,267						
	4,469	1,416						
	4,494	0,170						
6	5,513	0,080	1,715	ACEPTA	0,398	0,532	ACEPTA	0,040
	5,501	0,477						
	5,507	0,270						
	5,489	0,881						
	5,567	1,708						

Evaluando los datos con el test de Grubbs y la C Cochran's se observa que todos los valores son aceptados y que cumplen las condiciones de aceptación, por lo que ningún valor fue descartado. Considerando el nivel más alto, siendo 0,051 de arsénico total.

Figura 4. 3 Comportamiento de la repetibilidad y la precisión intermedia



Fuente: Elaboración propia

En la (Figura 4.3) se puede observar que la precisión intermedia es mayor a la repetibilidad, significa que la dispersión máxima en condiciones de precisión intermedia es mayor que la repetibilidad ya que se produjo variaciones.

4.1.4 Determinación de la Exactitud.

Para evaluar la exactitud usamos un blanco fortificado en distintos niveles (adicionando una concentración conocida de As al blanco fortificado), las lecturas son realizadas por diferentes analistas al igual que la precisión es por eso que se usa los datos del (Anexo C 5), las propias pertenecen a la misma población estadística, realizamos los cálculos para

cada nivel que serán mostrados en la (Tabla 4.16) para la evaluación de la exactitud y estas se calcularon de la siguiente manera.

Para la evaluación de los criterios de aceptabilidad trabajaremos con el sesgo y la recuperación en este caso trabajamos con un blanco fortificado y muestra añadida con una concentración de 2 µgAs/L.

Tabla 4. 16 Evaluación del primer nivel (0,5 µgAs/L)

No	0,5				Promedio	DSij	DS ² ij	G	dij	d ² ij
1	0,503	0,512	0,512	0,514	0,510	0,005	0,0000	1,361	0,010	0,00011
2	0,481	0,509	0,508	0,496	0,499	0,013	0,0002	0,628	-0,002	0,00000
3	0,502	0,498	0,495	0,513	0,502	0,008	0,0001	0,036	0,002	0,00000
4	0,495	0,503	0,493	0,489	0,495	0,006	0,0000	1,217	-0,005	0,00002
5	0,513	0,512	0,485	0,511	0,505	0,014	0,0002	0,519	0,005	0,00003

para la determinación de sesgo: $d_{ij} = 0,510 - 0,5$
0,5 es la concentración añadida al blanco

El promedio (Prom = 0,510) se halla de manera horizontal, desviación estandar (DS=0,005) y desviación estandar al cuadrado (DS² =0,000), en cuanto a los valores de Grubbs estas fueron calculadas según la (Anexo E1) y el sesgo calculada con el promedio. La concentración de 0,5 µgAs/L es la concentración añadida al blanco manteniéndose constante para este nivel.

De esta manera se genera los datos de la (Tabla 4.16).

Para hallar los resultados del (Anexo C 5) se calcula de la siguiente manera.

$$prom = \frac{(0,510 + 0,499 + 0,502 + 0,495 + 0,505)\mu gAs/L}{5} = 0,502 \mu gAs/L$$

Para hallar test de Cochran's (C) que indica los errores sistemáticos consideramos la (Anexo D1), teniendo como resultados de $C_{exp} = 0,389$ y la desviación estandar promedio $DSj=0,006$ mostradas en (Anexo D1, nivel 1).

Posteriormente hallamos sumatoria del sesgo ($\sum d_{ij}^2$)

$$\sum d_{ij}^2 = (0,00011 + 0,00000 + 0,00000 + 0,00002 + 0,00003) = 0,0002$$

La desviación estandar relativa (**DESRd**) del sesgo y el error cuadrático medio relativo son: $P=5$ y $dj=0,002$

$$dj = \text{Prom}(Y=J) - \text{Conc. Conocida} = 0,002$$

$$DESR_d = \sqrt{\frac{\sum d_{ij}^2}{p}}$$

$$DESR_d = \sqrt{\frac{0,0002}{5}} = 0,006$$

$$dj = 0,502 - 0,5 = 0,002$$

$$ECMR = \sqrt{\frac{dj^2 + DSj^2}{\text{Conc BK} + A}} \times 100$$

$$ECMR = \sqrt{\frac{0,002^2 + 0,006^2}{0,5}} \times 100 = 1,26$$

Cálculo de t_{exp}

$$t_{exp} = \frac{dj \times \sqrt{p}}{DSj} \rightarrow t_{exp} = \frac{0,0022 \times \sqrt{5}}{0,0059} = 0,837$$

Tabla 4. 17 Resumen de resultados de la prueba de exactitud en diferentes niveles

Nivel	Muestra (µgAs/L)	Sesgo (dj)	ECMR	100-ECMR
1	0,5	0,002	1,261	98,74
2	1,5	0,020	2,039	97,96
3	2,5	0,011	0,960	99,04
4	3,5	0,011	0,750	99,25
5	4,5	-0,002	0,454	99,25
6	5,5	0,015	0,618	99,38

Fuente: Elaboración propia

Y^{\wedge} = Muestra (blanco fortificado)

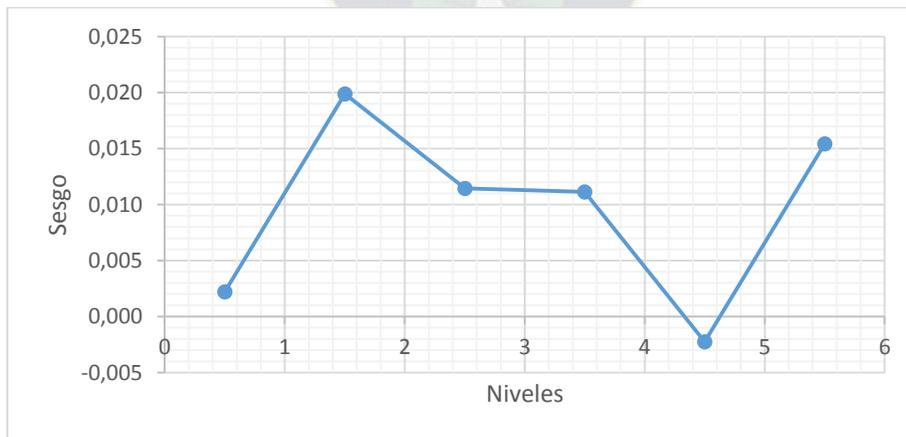
d_j = Sesgo

ECMR = Error cuadrático medio relativo

100 – ECMR = Porcentaje de exactitud

En la tabla anterior se realiza la evaluación de estadístico, por tanto concluimos que el método satisface las condiciones de exactitud.

Figura 4. 4 Comportamiento del sesgo en la evaluación de la exactitud



Fuente: Elaboración Propia

La gráfica nos muestra el comportamiento del sesgo idealmente tendría que ser cero pero en los resultados de la parte experimental nos dice demuestra un comportamiento -0,002 a 0,020 como se ilustra en la gráfica.

4.1.5 Criterios de aceptación para la exactitud

La exactitud expresada como porcentaje de error menor a 10 %, por lo tanto para verificar la exactitud se aplica la siguiente sistemática en este caso calculando t_{exp} mostrado en el (Anexo D1, tabla de % recuperación). Se tiene dos condiciones las cuales son:

- Si $t_{exp} \leq t_{tab}$ se puede afirmar ambos valores no difieren significativamente para el nivel de confianza seleccionado y por lo tanto concluimos que el método satisface la condición de exactitud.
- Si $t_{exp} > t_{tab}$ se puede afirmar que ambos valores difieren significativamente para el nivel de confianza seleccionado y por lo tanto concluimos que el método no satisface la condición de exactitud.

En cuanto a la exactitud podemos decir que si satisface la condición $t_{exp} \leq t_{tab}$.

4.1.6 Porcentaje de Recuperación

Para la determinación de la recuperación realizamos 5 lecturas de blancos fortificados y muestra fortificada.

Se calcula de la siguiente manera:

$$R = \left(\frac{C_e - C_o}{C_a} \right)$$

$$R = \left(\frac{1,990 - 0,230}{2} = 0,88 \right)$$

$$\%R = [R] \times 100$$

$$\%R = 0,88 \times 100 = 88$$

$$t_{cal} = \frac{[100 - \%R(prom)]}{S \times \sqrt{n}} \rightarrow t_{cal} = \frac{[100 - 91]}{5 \times \sqrt{6}} = 0,709$$

R= Recuperación

Ce = concentración de analíto de la muestra enriquecida.

C₀ = concentración de analíto medida en la muestra sin adicionar.

Ca =concentración de analíto adicionado a la muestra enriquecida.

Tabla 4. 18 Blanco fortificado con una concentración añadida de 2µgAs/L

Código	C ₀	Ca	Ce	R	%R
BK-1	0,230	2	0,230	0,00	0
BKA-1	0,230	2	1,990	0,88	88
BKA-2	0,230	2	1,958	0,86	86
BKA-3	0,230	2	2,024	0,90	90
BKA-4	0,230	2	2,124	0,95	95
BKA-5	0,230	2	2,059	0,91	91
BKA-6	0,230	2	2,016	0,89	89
BKA-7	0,230	2	1,972	0,87	87
BKA-8	0,230	2	2,270	1,02	102
Promedio					91
SD					5

Fuente: Elaboración propia

Nos dice que no existe diferencia significativa $t_{cal} < t_{crit}$

$$t_{cal} = 0,709$$

$$t_{crit} = 1,895$$

Tabla 4. 19 Muestra fortificado con una concentración añadida de 2µgAs/L

Código	Co	Ca	Ce	R	%R
ES-KA-G--MU-5	0,458	2	0,458	0,00	0
ES-KA-G-MU-5+A	0,458	2	2,415	0,98	98
ES-KA-G-MU-5 +A	0,458	2	2,318	0,93	93
ES-KA-G-MU-5+A	0,458	2	2,252	0,90	90
ES-KA-G-MU-5+A	0,458	2	2,384	0,96	96
Promedio					94
SD					4

Fuente: Elaboración propia

R= Recuperación

Ce = es la concentración de analíto de la muestra enriquecida.

Co = es la concentración de analíto medida en la muestra sin adicionar.

Ca = es la concentración de analíto adicionado a la muestra enriquecida

Nos dice que no existe diferencia significativa $t_{cal} < t_{crit}$

$$t_{cal} 0,798 < t_{crit} 2,353$$

Tabla 4. 20 Replica de muestra fortificado con una concentración añadida de 2µgAs/L

Código	Co	Ca	Ce	R	%R
ES-KA-G--MU-5R	0,364	2	0,364	0,000	0
ES-KA-G-MU-5R+A	0,364	2	2,540	1,088	109
ES-KA-G-MU-5R+A	0,364	2	2,604	1,120	112
ES-KA-G-MU-5R+A	0,364	2	2,482	1,059	106
ES-KA-G-MU-5R+A	0,364	2	2,513	1,075	107
Promedio					109
SD					3

Fuente: Elaboración propia

Nos dice que no existe diferencia significativa $t_{cal} < t_{crit}$

$$t_{cal} -1,645 < t_{crit} 2,353$$

De acuerdo a tabla % de recuperación (Anexo D1) de AOAC al nivel de 1ppb el valor aceptable es de 40 a 120 %R por lo cual el valor obtenido en la experiencia sería aceptable para el nivel medido en la matriz analizada.

Tabla 4. 21 Evaluación de los datos para la determinación de la exactitud con pruebas de blanco fortificado

Niveles	Conc.	Datos experimentales promedio	Sesgo	t Experimental	t Tablas	Evaluación de t exp < t tabla
1	0,5 µg As/L	0,510	0,512	0,837	2,132	EXACTO
		0,511				
		0,511				
		0,512				
		0,514				
2	1,5 µg As/L	1,511	1,513	1,914	2,132	EXACTO
		1,510				
		1,516				
		1,516				
		1,514				
3	2,5 µg As/L	2,510	2,513	1,214	2,132	EXACTO
		2,514				
		2,513				
		2,515				
		2,513				
4	3,5 µg As/L	3,511	3,512	1,049	2,132	EXACTO
		3,513				
		3,512				
		3,513				
		3,510				
5	4,5 µg As/L	4,510	4,512	0,247	2,132	EXACTO
		4,511				
		4,513				
		4,511				
		4,514				
6	5,5 µg As/L	5,499	5,511	1,139	2,132	EXACTO
		5,515				
		5,510				
		5,515				
		5,515				

La evaluación estadística con la t de student con grados de libertad (n-1) y con una confianza del 95 % cumpliendo la condición $t_{exp} < t_{tab}$ afirmando que los valores no difieren significativamente para el nivel de confianza seleccionado y por lo tanto, concluimos que el método satisface la condición de exactitud.

4.1.7 Determinación de Robustez

Para el estudio de la Robustez se procede a exponer a cada factor a un estudio de variable, es decir se expone a una variación respecto a la establecida en el método es decir que cada variable mediante un valor alto (A, B, C, D y E) y otro bajo (a, b, c, d y e) una vez diseñada se realizan ocho pruebas de ensayo. Para esta determinación se aplica el Test de Youden y Steiner para la evaluación de un análisis químico analítico el procedimiento te permite evaluar variables con solo ocho análisis de una muestra.

Para la selección de las variables de estudio; se toma en cuenta algunas observaciones durante el análisis. Por ejemplo:

1. Temperatura: Durante el análisis había días con temperatura de 20 °C y otros 15°C y se pensó que la temperatura podía ser importante en el resultado del análisis es por eso que esta variable se consideró.
2. Equipos: Para el trabajo se utilizó dos equipos con las mismas características pero condiciones diferentes, esta variable se consideró pensando que puede existir mucha diferencia en el análisis y resultados.
3. Tiempo de Agitación: Esta Variable fue de mucha importancia al momento de preparar las soluciones antes de las lecturas se notó que cuando se agrega los reactivos en conjunto y luego se le agita se forma una solución amarilla pero sin embargo cuando se adiciona cada reactivo y se agita la solución es incoloro como debe ser para realizar la lectura.

4. Tiempo de reacción: Se decía que no es necesario esperar los 45 min según el procedimiento para la determinación de arsénico, pero al momento de hacerlo en el equipo existe una oscilación de valores.
5. Reactivos: Se podría creer que al utilizar reactivos de diferentes marcas pudiera existir diferencias en el resultado es la razón por la cual se puso como variable.
6. Analista: Se considera porque al trabajar en el análisis con diferentes analistas diríamos que como cada uno tiene un modo de trabajar y hacer las cosas pudiera existir diferencias en los resultados.
7. Ataque de muestra: Se consideró esta variable por que se pensó que al momento de realizar el ataque con el ácido y peróxido no destruiría en su totalidad la materia orgánica e interfiriera al momento del análisis

Tabla 4. 22 Datos de blanco fortificado para la determinación de Robustez

Condición Variable	Clave	Val. Alto	Val. Bajo	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura(°C)	A, a	20	15	20	20	20	20	15	15	15	15
Equipos	B, b	1	2	1	1	1	2	1	2	2	2
Tiempo de agitación (seg)	C, c	15	10	15	10	15	10	15	10	15	10
Tiempo de reacción (min)	D, d	45	10	45	45	10	10	10	10	45	45
Reactivos	E, e	R-1	R-2	R-1	R-2	R-1	R-2	R-2	R-1	R-2	R-1
Analista	F, f	1	2	1	2	2	1	1	2	2	1
Ataque de muestra (min)	G, g	60	25	60	25	25	60	25	60	60	25
Resultado Observado R				s	t	U	v	w	x	y	z
				2,005	1,973	2,039	2,018	2,012	2,310	1,987	1,898

Fuente: Elaboración propia

Cálculo de las Variables **A** y **a**:

Donde el promedio de **A** se calcula: $\frac{2,005+1,973+2,039+2,018}{4} = 2.009$

Donde el promedio de **a** se calcula: $\frac{2,012+2,310+1,987+1,898}{4} = 2.052$

Tabla 4. 23 Resumen de los cálculos para las variables de estudio

Condición Variable		Resultados		Diferencia	Comparación
Val. Alto X	Val. Bajo x	Prom. X	Prom. x	$\Delta(X-x)$	$\Delta < \sqrt{2} DS$
A	a	2,009	2,052	0,043	No sensible a Variable
B	b	2,007	2,053	0,046	No sensible a Variable
C	c	2,011	2,050	0,039	No sensible a Variable
D	d	1,966	2,095	0,129	No sensible a Variable
E	e	2,063	1,998	0,066	No sensible a Variable
F	f	1,983	2,077	0,094	No sensible a Variable
G	g	2,080	1,981	0,099	No sensible a Variable

Fuente: Elaboración propia

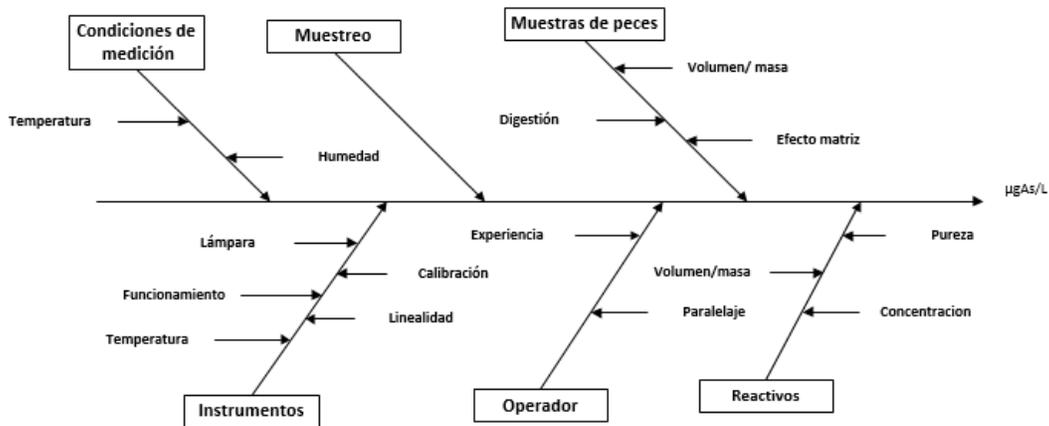
Si notamos la condición D, d de la (Tabla 4.23) valor que se estaría aproximando a 0,171 y la variable sería sensible, claro que comparando con los resultados no es así. Por lo tanto los valores de $DS = 0,121$ y $\sqrt{2} DS = 0,171$ se compara con la diferencia $\Delta(X-x)$ usando la condición $(X-x) < \sqrt{2} DS$ si se cumple esta condición podemos decir que la variable no es sensible en el estudio de robustez, y se deberá mantener el valor nominal establecido en el método, para dicha condición.

4.1.8 Determinación de la estimación de Incertidumbre

4.1.8.1 Análisis de resultados para la estimación de incertidumbre en base a la validación

La siguiente grafica muestra las fuentes de incertidumbre del método por el diagrama de Ishikawa para la determinación de la estimación de incertidumbre.

Figura 4. 5 Diagrama de Ishikawa para determinar las fuentes de incertidumbre



La estimación de la incertidumbre se calcula usando blancos fortificados y para ello tomamos en cuenta los datos de la exactitud para la determinación de la misma. En la (Tabla 4,24) se muestra el valor de estimación incertidumbre combinado, real y expandido.

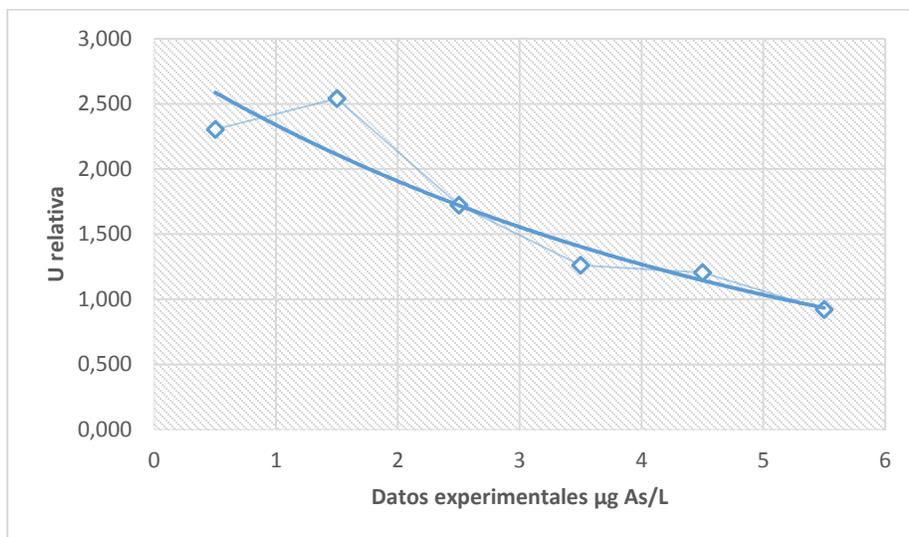
Tabla 4. 24 Tratamiento de datos experimentales para la estimación de la incertidumbre

Nivel	Y [^]	Sw	DESR _d	A	B	u rel	u c	U exp
1	0,5	0,009	0,006	1,145	1,770	2,108	0,01	0,02
2	1,5	0,011	0,029	1,918	0,726	2,051	0,03	0,06
3	2,5	0,010	0,022	0,882	0,418	0,976	0,02	0,05
4	3,5	0,01	0,024	0,686	0,338	0,764	0,03	0,05
5	4,5	0,011	0,018	0,407	0,242	0,473	0,02	0,04
6	5,5	0,017	0,031	0,567	0,313	0,648	0,04	0,07

Fuente: Elaboración propia

En la tabla anterior, se observan los valores obtenidos a partir de datos de validación del método con un intervalo de confianza de 95 % y un factor de cobertura $K = 2$, para abarcar todo rango lineal de ajuste los valores a una ecuación para que cubra todo el rango.

Figura 4. 6 Gráfica de la incertidumbre relativa y los experimentales



Fuente: Elaboración propia

4.2 Resumen de validación

Resumen de la validación				
Método	Espectrofotometría de absorción atómica acoplado a generador de hidruros			
Analíto	Arsénico			
Unidades	µg/L			
Matriz	Peces			
Límites				
Límites		Valor	Unidades	
De detección		0,016	µg/L	
De cuantificación		0,022	µg/L	
Precisión , Exactitud e Incertidumbre				
Niveles (µg/L)	Repetibilidad	Reproducibilidad	Exactitud	Incertidumbre
	% CVr	%CVR	Sesgo	U exp
0,5	1,26	1,62	0,002	± 0,02
1,5	1,35	1,44	0,020	± 0,06
2,5	0,35	1,09	0,011	± 0,05
3,5	0,20	0,70	0,011	± 0,05
4,5	0,98	,065	0,002	± 0,04
5,5	0,52	0,39	0,015	± 0,07
Criterios de aceptación				
Pendiente		1,000		
Ordenada al origen		0,001		
Coeficiente de correlación		1,000		
Sx/y		0,001		
Linealidad		0,999	Cumple	
Repetibilidad		$CVr_i\% < CVh\%/2$	Cumple	
Reproducibilidad		$CVRI\% < CVhRI\%/3$	Cumple	
Exactitud		$t_{exp} < t_{tab}$	Cumple	
% de recuperación		40 – 120%	Cumple	

Fuente: Elaboración propia

4.3 Evaluación de las muestras de Pescado

Durante cada lote de digestión de muestras para determinar As total se corrió un blanco que fue procesado de igual manera que cada muestra, el blanco consistió en la preparación de una muestra sin tejido de *Orestias*. La lectura de las soluciones obtenidas de los blancos es de 0,0010 µg As/kg el cual se utilizó para realizar la corrección de los datos obtenidos en los análisis de As. En la tabla 4.25 se muestra la concentración de arsénico total en base seca tanto de cabeza como de musculo esto con el fin de realizar una evaluación de la deposición de As por fracción.

Los habitantes de los lugares dicen: la cabeza de pescado de la especie *Orestias* contiene proteínas por lo tanto absorbemos la cabeza y algunas veces preparamos caldos concentrados de cabeza de pescado todo ello para combatir la anemia.

Para una evaluación de las concentraciones de As en muestras de pescado por partes uno de los motivos es el indicado anteriormente, además considerando la que la mayoría de los metales pesados se acumulan en los huesos y viseras de los pescados, por tanto tenemos el cuadro mostrado a continuación con las concentraciones de cabeza y tejido.

Tabla 4. 25 Concentración general de As en muestras de pescado

Código	Masa	Cabeza		Masa	Tejido	
		µgAs/kg	mgAs/kg		µgAs/kg	mgAs/kg
HU-KG-P-1	0,2982	153,253	0,153	0,3001	105,298	0,105
ES-KA-G-2	0,3006	169,661	0,170	0,2991	178,201	0,178
HU-KA-M-3	0,3014	139,018	0,139	0,3014	150,018	0,150
HU-KA-M-4	0,3005	128,453	0,128	0,3001	187,937	0,188
ES-KA-G-M-5	0,3001	203,266	0,203	0,3002	196,536	0,197
HU-KG-M-6	0,3000	228,333	0,228	0,2994	128,591	0,129
ES-KG-G-P-7	0,3009	179,794	0,180	0,2997	128,795	0,129
HU-KA-I-8	0,3010	82,724	0,083	0,2993	128,968	0,129
HU-KA-P-9	0,3007	165,946	0,166	0,2997	113,447	0,113
HU-KG-P-10	0,2970	85,522	0,086	0,3021	98,974	0,099
ES-KA-G-11	0,3160	143,899	0,144	0,2998	114,410	0,114
HU-KA-M-12	0,3021	146,971	0,147	0,3019	162,968	0,163
HU-KA-M-13	0,3015	93,864	0,094	0,3011	116,240	0,116
ES-KA-G-M-14	0,3008	113,364	0,113	0,3022	248,180	0,248
HU-KG-M-15	0,3018	150,762	0,151	0,2999	120,707	0,121
ES-KG-G-P-15	0,3025	227,769	0,228	0,3039	122,738	0,123
HU-KA-I-16	0,3014	79,960	0,080	0,3023	119,418	0,119
HU-KA-P-17	0,3012	110,890	0,111	0,3007	111,074	0,111

Fuente: Elaboración propia

Con respecto a las concentraciones de As en muestras de pescado de las zonas de estudio (Tabla 4,26 y 4,27) logramos apreciar las concentraciones de las dos zonas de estudio entre los rangos de: Huatajata con un rango de concentración de As total en cabeza de (79 - 228 µg As/kg) y de tejido (98 - 187 µg As/kg), en comparación de Escoma en cabeza de pescado existe una concentración de (113 – 227 µg As/kg) y músculo (114- 248 µg As/kg). Debido al bajo número de muestras para cada punto, señalamos que la gran movilidad de los peces afecta la comparación entre resultados.

Tabla 4. 26 Concentración de arsénico en muestras de pescado comunidad de Huatajata

Código	Masa	Cabeza		Masa	Tejido	
		µgAs/kg	mgAs/kg		µgAs/kg	mgAs/kg
HU-KG-P-1	0,2982	153,253	0,153	0,3001	105,298	0,105
HU-KA-M-3	0,3014	139,018	0,139	0,3014	150,018	0,150
HU-KA-M-4	0,3005	128,453	0,128	0,3001	187,937	0,188
HU-KG-M-6	0,3000	228,333	0,228	0,2994	128,591	0,129
HU-KA-I-8	0,3010	82,724	0,083	0,2993	128,968	0,129
HU-KA-P-9	0,3007	165,946	0,166	0,2997	113,447	0,113
HU-KG-P-10	0,2970	85,522	0,086	0,3021	98,974	0,099
HU-KA-M-12	0,3021	146,971	0,147	0,3019	162,968	0,163
HU-KA-M-13	0,3015	93,864	0,094	0,3011	116,240	0,116
HU-KG-M-15	0,3018	150,762	0,151	0,2999	120,707	0,121
HU-KA-I-16	0,3014	79,960	0,080	0,3023	119,418	0,119
HU-KA-P-17	0,3012	110,890	0,111	0,3007	111,074	0,111

Fuente: Elaboración propia

Tabla 4. 27 Concentración de arsénico en muestras de pescado comunidad de Escoma

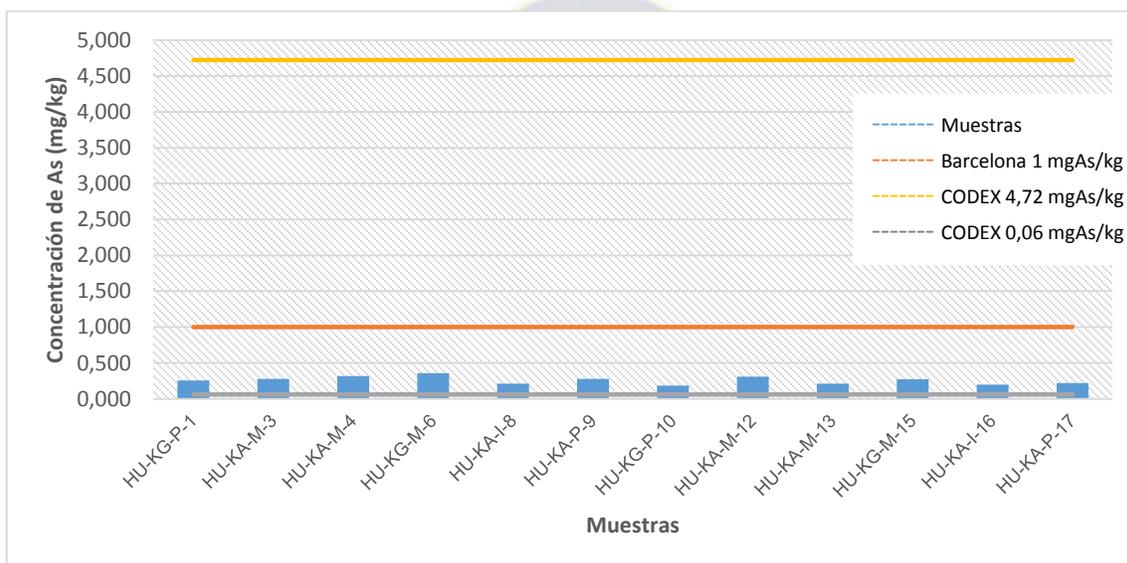
Código	Masa	Cabeza		Masa	Tejido	
		µgAs/kg	mgAs/kg		µgAs/kg	mgAs/kg
ES-KA-G-2	0,3006	169,661	0,170	0,2991	178,201	0,178
ES-KA-G-M-5	0,3001	203,266	0,203	0,3002	196,536	0,197
ES-KG-G-P-7	0,3009	179,794	0,180	0,2997	128,795	0,129
ES-KA-G-11	0,3160	143,899	0,144	0,2998	114,410	0,114
ES-KA-G-M-14	0,3008	113,364	0,113	0,3022	248,180	0,248
ES-KG-G-P-15	0,3025	227,769	0,228	0,3039	122,738	0,123

Fuente: Elaboración propia

Los resultados exponen que existe diferencia de concentraciones de arsénico entre cabeza y tejido en las dos zonas de estudio. Si realizamos una evaluación por individuo de pescado según la (Figura 4.4 y Figura 4,5) nos muestra que la cantidad de arsénico depositado en el pescado no es alarmante porque según las concentraciones dentro del

Codex es muy bajo, ahora bien comparando con estudios realizados en Barcelona de pescados en agua dulce esto llega a una concentración máxima de 1ppm de los “Parámetros de seguridad alimentaria para los productos pesqueros destinados a la Unión Aduanera.”³⁷, nuestros resultados estarían por debajo del mismo.

Figura 4. 7 Diagrama de concentración As en muestra de pescado por individuo zona de Huatajata



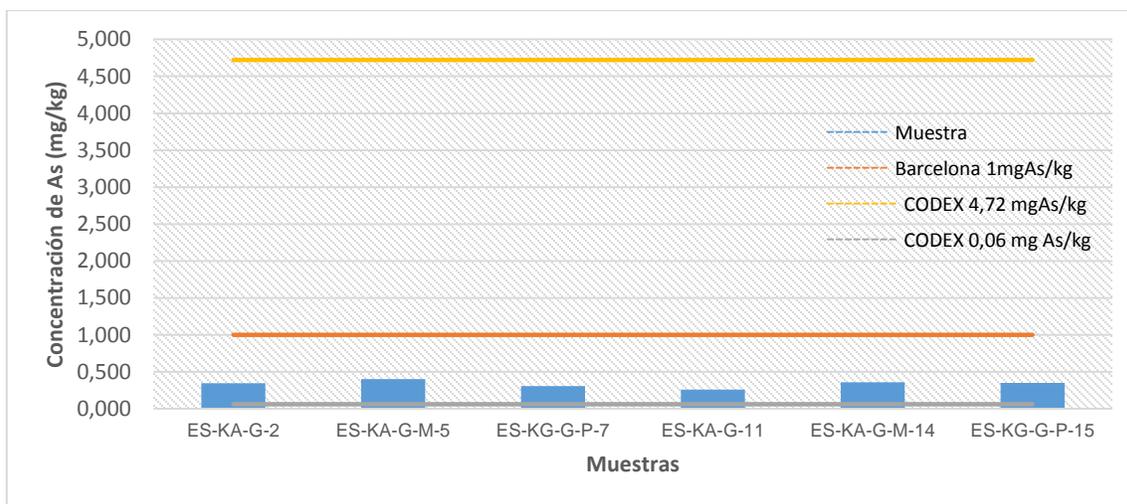
Fuente: *Elaboración propia*

La concentración más alta del lote de muestra es de 0,416 mg As/kg, podríamos decir que es por efecto de los hoteles que hay en Huatajata y por la gran cantidad de población que vierte todas sus aguas residuales al lago, uno de los indicadores es la totora, a medida que se acumula los metales pesados la totora cambia a un color amarillo hasta obtener un color gris por lo que ya no es saludable. Hablando sobre la concentración más baja 0,187 mgAs/kg se puede decir que los peces fueron migrando a causa de la contaminación asimismo estos circulan entre dos a tres metros de la orilla hasta los 10 metros de

³⁷ (MINISTERIO DE SANIDAD, 2014)

profundidad donde no están en contacto con los sedimentos ya que los peces se alimentan de bentos-

Figura 4. 8 Diagrama de concentración As de muestra de pescado por individuo en la zona de Escoma



Fuente: Elaboración propia

La grafica nos muestra una representación de que las concentraciones de pescado en (mgAs/kg) no pasan al valor referencial estudiados en la unión aduanera de una concentración 1mgAs/kg y de la norma CODEX (0,06 – 4.72 mg As/kg) por lo tanto los resultados estarían dentro de las normas internacionales.

De la misma forma el comportamiento de los peces en esta zona es similar que la anterior, hablando de los resultados decimos: el lote de muestras de peces tienen una concentración de 0,476 mg As/kg debido a los efectos de la actividad minera informal y fuentes hidrotermales que existe en la cuenca del Rio Suches que desemboca a Escoma, además decir que la concentración de As encontrado en los peces podría provenir de estos efectos al mismo tiempo ser acumulado en los músculos como cabeza conociendo los resultados experimentales.

De acuerdo a la norma de CODEX el límite máximo permisible está en un rango de (0,06-4,72) mgAs/kg donde nos dieron valores experimentales por debajo del rango más alto, al mismo tiempo fue comparado con la norma de Barcelona de 1mg As/kg considerando que no se tienen una norma de inocuidad alimentaria en esta región es por tanto que acudimos a normas internacionales, los cuales comparando los resultados podemos considerar no tóxicas.

De acuerdo a este análisis una persona podría ingerir una porción de *Orestias* sin peligro alguno.



CAPÍTULO V

5.1 CONCLUSIONES

Se validó un método para implementar el análisis de arsénico en muestras de pescado, colectadas a orillas del Lago Titicaca. La técnica utilizada es absorción atómica por generador de hidruros con la reducción de As^{+5} a As^{+3} con $NaBH_4$ en un medio ácido de HCl. Se debe tener en cuenta la calibración del equipo, lámpara, flujo de gases, preparación de estándares y lectura de muestras. De todo esto se tiene las siguientes conclusiones:

1. Se determinó los parámetros de validación, obteniendo resultados estadísticos favorables como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 5 1 Resumen de resultados sobresaliente en la validación

Parámetros	Resultados
Linealidad	0,99998
Límite de detección	0,016 $\mu\text{g As/L}$
Límite de cuantificación	0,022 $\mu\text{g As/L}$
Precisión	Reproducibilidad 0,39% - 1,62% Repetibilidad 0,20% - 1,35%
Exactitud	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$
Rango de Trabajo	0,022 – 5,5 $\mu\text{g As/L}$

La linealidad tiene un coeficiente de correlación de 0,99998 con un error en la calibración de 0,001 muy cercano a la unidad; el límite de detección indica que la concentración mínima detectable es 0,016 $\mu\text{g As/L}$ y el valor mínimo cuantificable

para la matriz es $0,022 \mu\text{g As/L}$; el porcentaje de variación de repetibilidad promedio para los cinco niveles va desde $0,20\%$ a $1,35\%$ y el porcentaje de coeficiente de variación de reproducibilidad promedio para los cinco niveles va desde $0,39\%$ a $1,62\%$ en la determinación de arsénico total. La exactitud se determinó con una muestra añadida con el sesgo y una prueba de t de Student de una cola, se concluyó que no existe una diferencia significativa, se determinó el rango de trabajo que van desde $0,02$ a $5,5 \mu\text{gAs/L}$.

Se estimó la incertidumbre expandida según la guía Eurachem encontrándose los siguientes valores para los cinco niveles ($\pm 0,02$; $\pm 0,06$; $\pm 0,05$; $\pm 0,05$; $\pm 0,04$; $\pm 0,07$) estos resultados está reportado como incertidumbre expandida en la en el (punto 4,2).

2. Se observó que las muestras de pescado, tienen diferentes concentraciones de arsénico total, como se muestra en la tabla 4,26 y 4,27. El comportamiento de las concentraciones en muestras recolectadas en Huatajata y Escoma es variada, debido a la gran movilidad de los peces que afecta la comparación de resultados, considerando que la gran mayoría de las muestras de pescado recolectados de Escoma en comparación a Huatajata son altas en concentración de (mgAs/L), debido a las efectos de la actividad informal y fuentes hidrotermales, por to tanto en Huatajata uno de los efectos perjudiciales detectados son los hoteles a orillas del lago y la gran cantidad de población que vierte sus aguas residuales domésticas. Por tanto, las concentración de arsénico encontrados en los pescados de las dos zonas de estudio tanto de cabeza como de tejido tiene un rango de: Huatajata ($0,080 - 0,228 \mu\text{gAs/L}$) en cabeza y ($0,099 - 0,188 \mu\text{gAs/L}$) en tejido en comparación a Escoma $0,113 - 0,228 \mu\text{gAs/L}$ en cabeza y ($0,114 - 0,248 \mu\text{gAs/L}$) en tejido.

En consecuencia, no parece existir afectaciones a la salud de los humanos ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, con respecto a las consideraciones legislativas ver (tabla),

Código	Cabeza	Tejido	Individuo	CODEX	Ministerio de Sanidad (Unión Aduanera) ³⁸
	mgAs/kg	mgAs/kg	mgAs/kg	0,06 – 4,72 mgAs/kg	1 mgAs/kg
HU-KG-P-1	0,153	0,105	0,258	Dentro del rango	< U.A
HU-KA-M-3	0,139	0,150	0,289	Dentro del rango	< U.A
HU-KA-M-4	0,128	0,188	0,316	Dentro del rango	< U.A
HU-KG-M-6	0,228	0,129	0,357	Dentro del rango	< U.A
HU-KA-I-8	0,083	0,129	0,212	Dentro del rango	< U.A
HU-KA-P-9	0,166	0,113	0,279	Dentro del rango	< U.A
HU-KG-P-10	0,086	0,099	0,185	Dentro del rango	< U.A
HU-KA-M-12	0,147	0,163	0,310	Dentro del rango	< U.A
HU-KA-M-13	0,094	0,116	0,210	Dentro del rango	< U.A
HU-KG-M-15	0,151	0,121	0,272	Dentro del rango	< U.A
HU-KA-I-16	0,080	0,119	0,119	Dentro del rango	< U.A
HU-KA-P-17	0,120	0,111	0,231	Dentro del rango	< U.A
ES-KA-G-2	0,170	0,178	0,348	Dentro del rango	< U.A
ES-KA-G-M-5	0,203	0,197	0,400	Dentro del rango	< U.A
ES-KG-G-P-7	0,180	0,129	0,309	Dentro del rango	< U.A
ES-KA-G-11	0,144	0,114	0,258	Dentro del rango	< U.A
ES-KA-G-M-14	0,113	0,248	0,361	Dentro del rango	< U.A
ES-KG-G-P-15	0,228	0,123	0,351	Dentro del rango	< U.A

Los productos analizados cumplen con las legislaciones vigentes de Barcelona y CODEX, los valores obtenidos en el análisis de las muestras se encuentran dentro de las normas, si bien no se tienen normas nacionales se considera tomar en cuenta estas normas internacionales.

3. El pescado expuesto por diferentes tipos de afectación al consumir, es bio - acumulable dentro de nuestro organismo a lo largo del tiempo, estas se encuentran relacionadas con problemas en la salud asociadas a enfermedades vasculares por tanto, la mayoría de los metales pesados no se puede eliminar del organismo y/o que se puede eliminar, se hace en cantidades pequeñas. Lo mejor en estos casos es reducir la exposición a los metales pesados e identificando las fuentes de contaminación más cercana.

³⁸ (MINISTERIO DE SANIDAD, 2014)

5.2 RECOMENDACIONES

- ✓ Para una mejor digestión se debe controlar las variables de tiempo de destrucción de la materia orgánica antes de realizar la digestión.
- ✓ Considerar el procedimiento en la determinación del método en los rangos estudiados, considerando que se demostró que este rango es directamente proporcional.
- ✓ Para una mejor cuantificación del analito se requiere que la señal productiva se deba exclusivamente a su presencia y que no exista ninguna interferencia.
- ✓ Los reactivos químicos usados para este método deben ser grado analítico, sin embargo en cuanto al ácido nítrico y clorhídrico deben ser subboiling para el tratamiento de la muestra.
- ✓ Una característica importante de los analistas en su habilidad para obtener resultados confiables con los instrumentos analíticos es calibrar el material volumétrico (bureta, pipeta, matraces aforados, etc.) a fin de no tener problemas.
- ✓ Se debe de considerar que todo método validado se encuentre controlado por el laboratorio, el mismo que deberá establecer cada que tiempo se revalida los procedimientos técnicos analíticos.
- ✓ Se debe realizar estudios complementarios como análisis toxicológico en diferentes especies de peces que existen en nuestros ríos y lagos donde existe los diferentes tipos de afectación.
- ✓ Se debe implementar normativas para la inocuidad alimentaria para productos pesqueros de consumo y exportación.
- ✓ Este proyecto debe ser difundido autoridades Ministerio de Medio Ambiente Y Agua (MMAyA), gobernación y alcaldía para que tomen cartas en el asunto.

BIBLIOGRAFÍA

- (CE), R. (333/2007).
- Alimentacion, O. d. (2009). *Directrices para la inspeccion del pescado basado en los riesgos*. Roma.
- ALT (Autoridad Binacional del Lago Titicaca), P. (. (2001). *Proyecto evaluacion del potencial de espeies introducidas en el ambito boliviano del sistema TDPS*. La Paz, BO.
- Alvarez, P. (2014). *Validacion de metodos y estimacion de la incertidumbre de medicion en el analisis quimico* . Argentina.
- AOAC. (s.f.). *Methods of Analysis of the Association of Official Chemist*. Argentina, S. S. (10 de marzo de 2005). www.estrucplan.com.ar.
- Biggs M.L. Kalman D.A. Moore L.E. Hopenhayn - Rich C. and A.H. Smith, M. R. (1997, 386 (3)). 185-195 .
- BOL/98/G31, P. (Agosto, 2002). *Desarrollar la capacidad de programas de pesca artesanal en Bolivia*. La Paz - Bolivia.
- Borum, D. a. (1994). Human oral exposure to inorganic arsenic. *Arsenic Exposure and Health Effects*. In: W.R. Chappell, C.O. Albernathy and C.R. Cothorn (eds, 30-31.
- Burgera M. and J.L Burgera, T. (1997, 44). 1581 1604 .
- C, A. (2001). Arsenic: Exposure and Health Effects. *Office of Water, Office of Science and Tecnology, Health and Ecological Criteria Division United States Environmental Protection Agency. USA*.
- Cámara, C. (2002). *Toma y tratamiento de muestras*. (P. Fernandez Hernando, A. Martin-Esteban, Perez-Conde., & M. Vidal, Edits.) Madrid: Sintesis,S.A.
- Castañon, V; Flores, T; Limachi, J. (2002). *Manual pesquero para el redoblamiento del lago Titicaca con peces nativos*. La Paz-Bolivia.

- Chatterjee, A. D. (1995). The biggest arsenic calamity in the world. part I. *Arsenic in groundwater in six districts of West Bengal, India*, 643-650.
- Chiou H.Y., H. W. (1997,28 (9)). 1717-1723.
- COARITI, E. F. (2009). *EVALUACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE DIGESTION DE SUELOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA* . La Paz.
- CODEX. (1995). Norma General del CODEX para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos.
- Comision del Codex, A. (2011,Marzo). *Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comite del CODEX sobre contaminantes de los alimentos*. Haya.
- CONACyT. (s.f.). *Norma Salvadoreña NSO 67.32.01:08*,.
- Cullen, W. a. (1989). Arsenic Speciation in the Enviroment. *Chem. Rev*, 713-764.
- Cullen, W. a. (1989). Arsenic Speciation in the Enviroment. *Chem. Rev*, 723-727 .
- Dejoux, C. I. (1991). El Lago Titicaca sintesis de conocimiento limnologico actual. La Paz- Bolivia: ORSTOM, ISBOL.
- DHV. (2007). Priorizacion de inversion del Lago Titicaca. Estudio preparado para el Banco Mundial.
- DTA. (2007). *Acreditación de laboratorios de ensayo y calibración de acuerdo a la norma NB-ISO-IEC 17025:2005*. La Paz- Bolivia: Direccion Tecnica de Acreditacion- Instituto Boliviano de Metrologia.
- En. (2002). Tecnicas de Laboratorio. *Tecnicas de Laboratorio*, 110-111.
- EURACHEM. (2005). *Métodos analíticos adecuados a su proposito Guia de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados*. Mexico.
- Eurachem. (s.f.). The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.
- Europea, R. d. (1881/2006).
- F., C. C. (2013). Fractionation of heavy metals and assessment of contamination of the sediments of Lake Titicaca. *Eviron Monit Assess*, 185:9979-9994.

- FAO/OMS. (Marzo de 2011). PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE.
Programa Conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comite del CODEX sobre los contaminantes de los alimentos.
- Farías, M. L. (2009). *IBEROARSEN*. Argentina: CYTED.
- Fergusson J., I. C. (1993). Their Extract Use & Environ Impact. *Chemical Resurces*, 347.
- Ferreira, A. B. (2002). Analisis Quimico. 151.
- Fjeldsa, J. y. (1996). *Conserving the Biological Diversity of polylepis woodlands of the highland of Peru and Bolivia.*
- Gilman's, G. a. (1996). *The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9a.*
- Hall, G. Y. (1998). Analytical perspective on trace element species of interest in exploration. En *Geochemical Exploration*, 61 (págs. 1-19).
- Haswel, S. (1985). *Arsenic speciation in soil-pore waters from mineralized and unmineralized areas of South-West Englan.* *Talanta*, 32 (1).
- Howard, A. a.-Z. (1981). Determination of inorganic arsenic(III) andarsenic(V), methylarsenic and dimethylarsenic species by selective hydride evolution atomic absorption spectroscopy. *Analyst*, 106, 213-220.
- Irwin R., V. M. (1997). Environmental contaminants Enciclopedia. Arsenic Entry. Nacional Park Services. Water resourses divitions, water operations branch.
- K, M. B., Ogra, Y., & Suzuki, K. (2001). *Identification of dimethylarsenius and monomethylarsoniusacids in human urine of the arsenicaaffected areas in West Bengal.* India: Chemg Gest Toxicol.
- Le, X., Lu, X., & X.F. (2004). Arsenic Speciation. *Analytical Chemical*, 76. 26A-33A.
- Lidema. (2003). *Alerta por la contaminacion del rio Pilcomayo.* tarija: Adenaver.
- M.I. Litter, M. A. (2009). *Metodologias analiticas para la determinacion y especiacion de arsenico en aguas y suelos.* Argentina: CYTED.
- Mendoza, B. M. (2004). *Acuicultura.* Lima - Peru : Palomino.

- MINISTERIO DE SANIDAD, S. S.-S. (2014). *PARÁMETROS DE SEGURIDAD ALIMENTARIA PARA LOS PRODUCTOS PESQUEROS DESTINADOS A LA UNIÓN ADUANERA*. Madrid.
- Moncayo D., T. R. (2001). *Levels of Mercury, Cadmium and lead in fisheries products of exportation*, Instituto Nacional de Pesca. Lima-Peru.
- Moya, D. (2011). *Validacion de metodos de ensayo*.
- OIEA. (1997-2000). *Aseguramiento de la calidad en los laboratorios analiticos*. Viena.
- Penrose, W. C. (1974). *Enviroment. Control*. 465.
- Pradosh R, A. S. (2002). *Metabolism and toxicity of arsenic. A human carcinigen. Curret Science*, 38-45.
- Prensa, L. (Octubre de 2009). *Bahía de muerte*, Suplemento "En Profundidad". *La Prensa*, pág. 158.
- Publica., I. d. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medicion*. Santiago.
- R., M. (2003). *Metodo de cuantficacion de arsenico total y arsenico inorganico en muestras de productos de pesca*. España: Instituto de Agroquimica y Tecnologia de Alimentos - Laboratorio de Contaminacion Metalica.
- Ramos, O. E. (2014). *Geochemistry of Trace Elements in the Bolivian Altiplano*. Suecia .
- RIUS, F. X. (2000). *Técnicas de Laboratorio. La Validación de Métodos Analíticos*, 382-385.
- RLA-5054. (s.f.). *Garantia de inocuidad de los alimentos marinos en America Latina y el Caribe por medio de un programa regional de Biomonitorio de los contaminantes presentes en moluscos y peces*.
- Rodricks, J. a. (1981). *Toxicidad Natural de los alimentos* . Zaragoza, España: In. Howards R. Roberts (ed) *Sanidad Alimentaria*.
- Rodríguez, B. D. (2010). *Aspectos generales sobre la validacion de metodo*. Santiago - Chile.
- Salgado, S. G. (2013). *Arsenic Speciation and Metal Accumulation Studies in Evironmental Sample*. Madrid.

- Salgado, S. G. (2013). *ESTUDIOS DE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO Y ACUMULACIÓN DE METALES EN MUESTRAS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL*. Madrid.
- Schoof, R. Y. (1999). A market basket survey of inorganic arsenic in food. *Food and Chemical Toxicology*, 839-846.
- Smith, B. (1999). *Infrared Spectral Interpretation*. Florida, EE.UU: A Systematic Approach, CRC Press LLC.
- STANDARDIZATION, I. O. (2005). Requisitos Generales Para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración. Geneva: (NTC/ISO/IEC 17025:2005).
- Standardization, I. O. (s.f.). *Requisitos Generales para la competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración NTC-ISO/IEC 17025:2005*.
- T., T. S. (1992). Environmental biochemistry of arsenic. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 124: 79 - 110.
- Ulman, C. G. (1998). Arsenic in human and cow's milk: a reflection of environmental pollution. *Water, Air and Soil Pollution*, 411-416. .
- USA: APHA, A. W. (2005). STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER & WASTEWATER. En ISBN 0-87553-047-8 (págs. 3-36). USA: 21st Editio.
- Vasken Aposhian, H. Z. (1999). How is inorganic arsenic detoxified? *Arsenic Exposure and Health Effects*, 289-29.
- W., H. (1982). Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Anl Chem*. 64A - 76A.
- WHO. (2001). Arsenic and arsenic compounds. *Environmental Health Criteria (Second edition)*. Geneva, World Health Organization.
- WHO. (2001). *Arsenic and arsenic compounds*. Geneva.
- Zhiling Gong, X. L. (Abril, 2002). *Iron mental Ciencias de la Salud Programa, Departamento de Ciencias de Salud Publica "Especiacion de Arsenico"*. Facultad de Medicina.

ANEXOS VI

Anexo A 1 Recolección de Muestras





Fueron colectadas en baldes para su posterior clasificación, luego rotuladas, envueltas en papel aluminio y refrigeradas para el traslado a laboratorio.

Fuente: Elaboración Propia

Anexo A 2 Procedimiento de digestión de muestra



Adición de ácido nítrico para la destrucción de la materia orgánica



Cerrar los vasos de digestión para llevar al carrusel



Preparacion de carrusel para la digestion



Enfriar el sistema y dejar reposar a temperatura ambiente y transferir la muestra digerida a un matraz aforado de 10 mL y aforar con agua 18-D

Anexo B. 1. Determinación de la linealidad

Tabla B. 1 Resultados de lecturas de estándares para la determinación de la curva de calibración

Conc. µg As/L	Ensayo1	Ensayo2	Ensayo3	Ensayo4	Ensayo5
0,00	0,002	0,001	0,003	0,002	0,003
0,50	0,019	0,020	0,019	0,018	0,018
1,50	0,049	0,048	0,049	0,050	0,047
2,50	0,080	0,076	0,080	0,078	0,079
3,50	0,110	0,109	0,111	0,107	0,111
4,50	0,142	0,139	0,139	0,140	0,139
5,50	0,175	0,170	0,170	0,172	0,172
R ²	0,9998	0,9994	0,9998	0,9995	0,9997

El siguiente grafico representa los valores de absorbancia vs concentración (Figura B.1)

Figura B. 1 Curva de Calibración

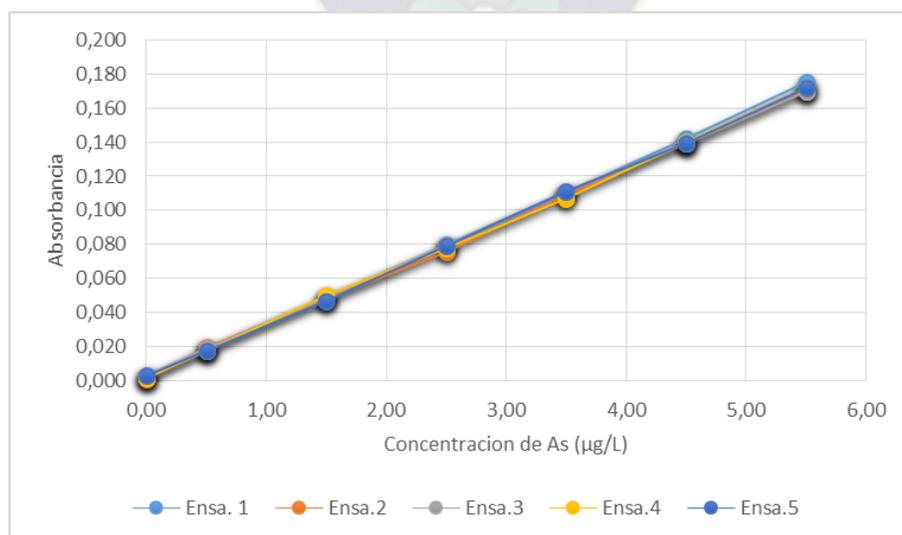


Tabla B. 2. Datos generados para la determinación del Rango Lineal

Nivel 1																						
Ens.	0,513	0,511	0,515	0,503	0,514	0,511	0,513	0,515	0,510	0,515	0,499	0,518	0,499	0,518	0,509	0,515	0,518	0,490	0,512	Prom.	DS	
1	0,513	0,511	0,515	0,503	0,514	0,511	0,513	0,515	0,510	0,515	0,499	0,518	0,499	0,518	0,509	0,515	0,518	0,490	0,512	0,510	0,007	
2	0,516	0,504	0,517	0,516	0,516	0,499	0,512	0,509	0,515	0,512	0,517	0,503	0,512	0,488	0,513	0,515	0,510	0,509	0,514	0,511	0,007	
3	0,513	0,515	0,515	0,511	0,514	0,507	0,521	0,511	0,506	0,518	0,516	0,475	0,504	0,494	0,513	0,508	0,523	0,522	0,517	0,511	0,011	
4	0,516	0,509	0,507	0,519	0,519	0,514	0,487	0,514	0,510	0,518	0,518	0,519	0,516	0,518	0,517	0,503	0,492	0,515	0,518	0,512	0,009	
5	0,507	0,518	0,512	0,508	0,511	0,522	0,518	0,522	0,508	0,487	0,513	0,517	0,505	0,513	0,518	0,521	0,519	0,522	0,510	0,514	0,008	
Nivel 2																						
Ens.	1,515	1,491	1,506	1,510	1,523	1,518	1,497	1,522	1,486	1,516	1,520	1,522	1,516	1,508	1,511	1,509	1,489	1,517	1,520	1,522	Prom.	DS
1	1,515	1,491	1,506	1,510	1,523	1,518	1,497	1,522	1,486	1,516	1,520	1,522	1,516	1,508	1,511	1,509	1,489	1,517	1,520	1,522	1,511	0,012
2	1,496	1,520	1,524	1,499	1,517	1,493	1,525	1,516	1,495	1,523	1,498	1,495	1,522	1,512	1,521	1,496	1,517	1,521	1,513	1,508	1,510	0,012
3	1,500	1,521	1,510	1,510	1,519	1,513	1,495	1,513	1,519	1,512	1,519	1,500	1,516	1,509	1,525	1,524	1,519	1,527	1,518	1,541	1,516	0,010
4	1,510	1,520	1,503	1,525	1,509	1,520	1,516	1,513	1,521	1,520	1,512	1,515	1,522	1,519	1,506	1,522	1,518	1,523	1,512	1,519	1,516	0,006
5	1,514	1,522	1,510	1,522	1,519	1,513	1,517	1,520	1,510	1,513	1,519	1,520	1,510	1,508	1,498	1,510	1,512	1,521	1,514	1,510	1,514	0,006
Nivel 3																						
Ens.	2,517	2,507	2,520	2,517	2,518	2,515	2,492	2,521	2,525	2,490	2,510	2,513	2,490	2,514	2,493	2,516	2,486	2,521	2,527	2,510	Prom.	DS
1	2,517	2,507	2,520	2,517	2,518	2,515	2,492	2,521	2,525	2,490	2,510	2,513	2,490	2,514	2,493	2,516	2,486	2,521	2,527	2,510	2,510	0,013
2	2,512	2,515	2,523	2,493	2,522	2,520	2,516	2,516	2,496	2,521	2,512	2,518	2,522	2,515	2,499	2,513	2,512	2,521	2,513	2,522	2,514	0,009
3	2,515	2,514	2,515	2,507	2,509	2,511	2,532	2,514	2,517	2,508	2,519	2,497	2,511	2,524	2,511	2,515	2,514	2,504	2,513	2,517	2,513	0,007
4	2,516	2,517	2,510	2,513	2,514	2,520	2,513	2,522	2,513	2,531	2,520	2,515	2,509	2,497	2,530	2,518	2,513	2,523	2,492	2,515	0,009	
5	2,509	2,515	2,487	2,510	2,528	2,513	2,517	2,517	2,515	2,522	2,513	2,520	2,512	2,527	2,520	2,513	2,488	2,514	2,521	2,500	2,513	0,011
Nivel 4																						
Ens.	3,496	3,523	3,524	3,517	3,512	3,485	3,526	3,513	3,506	3,521	3,518	3,486	3,531	3,493	3,515	3,521	3,499	3,512	3,531	3,493	Prom.	DS
1	3,496	3,523	3,524	3,517	3,512	3,485	3,526	3,513	3,506	3,521	3,518	3,486	3,531	3,493	3,515	3,521	3,499	3,512	3,531	3,493	3,511	0,014
2	3,521	3,534	3,532	3,524	3,515	3,519	3,492	3,529	3,499	3,522	3,492	3,523	3,519	3,502	3,489	3,526	3,506	3,496	3,528	3,499	3,513	0,015
3	3,516	3,512	3,497	3,517	3,510	3,511	3,509	3,510	3,510	3,516	3,510	3,508	3,514	3,521	3,524	3,517	3,514	3,509	3,516	3,511	3,512	0,006
4	3,513	3,515	3,507	3,499	3,509	3,515	3,524	3,534	3,522	3,515	3,517	3,507	3,512	3,517	3,503	3,519	3,515	3,488	3,517	3,515	3,513	0,010
5	3,510	3,519	3,518	3,510	3,487	3,505	3,518	3,512	3,516	3,513	3,511	3,522	3,479	3,502	3,521	3,510	3,516	3,520	3,513	3,490	3,510	0,012
Nivel 5																						
Ens.	4,514	4,507	4,494	4,502	4,499	4,518	4,518	4,513	4,520	4,514	4,520	4,512	4,518	4,507	4,497	4,524	4,520	4,510	4,498	4,500	Prom.	DS
1	4,514	4,507	4,494	4,502	4,499	4,518	4,518	4,513	4,520	4,514	4,520	4,512	4,518	4,507	4,497	4,524	4,520	4,510	4,498	4,500	4,510	0,009
2	4,493	4,517	4,518	4,522	4,508	4,513	4,492	4,487	4,518	4,516	4,521	4,514	4,521	4,519	4,515	4,490	4,506	4,521	4,516	4,514	4,511	0,011
3	4,512	4,508	4,509	4,515	4,519	4,531	4,509	4,516	4,521	4,517	4,515	4,488	4,509	4,532	4,513	4,518	4,490	4,520	4,512	4,499	4,513	0,011
4	4,513	4,515	4,497	4,509	4,518	4,513	4,483	4,513	4,521	4,503	4,524	4,511	4,517	4,520	4,521	4,515	4,499	4,501	4,516	4,514	4,511	0,010
5	4,511	4,492	4,515	4,520	4,499	4,519	4,528	4,516	4,511	4,515	4,528	4,516	4,523	4,518	4,495	4,526	4,522	4,518	4,515	4,488	4,514	0,012
Nivel 6																						
Ens.	5,499	5,494	5,490	5,494	5,490	5,499	5,487	5,486	5,496	5,527	5,499	5,489	5,529	5,496	5,502	5,474	5,529	5,496	5,505	5,495	Prom.	DS
1	5,499	5,494	5,490	5,494	5,490	5,499	5,487	5,486	5,496	5,527	5,499	5,489	5,529	5,496	5,502	5,474	5,529	5,496	5,505	5,495	5,499	0,014
2	5,489	5,512	5,515	5,517	5,521	5,514	5,520	5,512	5,515	5,499	5,520	5,517	5,514	5,530	5,513	5,521	5,515	5,531	5,509	5,520	5,515	0,009
3	5,513	5,521	5,520	5,514	5,498	5,502	5,524	5,514	5,492	5,514	5,490	5,512	5,519	5,514	5,495	5,526	5,501	5,520	5,512	5,498	5,510	0,011
4	5,521	5,517	5,506	5,519	5,522	5,513	5,519	5,514	5,517	5,516	5,519	5,512	5,521	5,513	5,518	5,508	5,518	5,519	5,514	5,491	5,515	0,007
5	5,512	5,520	5,516	5,530	5,518	5,489	5,514	5,520	5,519	5,523	5,527	5,510	5,494	5,522	5,510	5,520	5,512	5,512	5,515	5,510	5,515	0,010

Anexo C 1 Datos para la determinación de precisión en diferentes niveles.

ENSAYITA	VR											
	0,5 µgAs/L				1,5 µgAs/L				2,5 µgAs/L			
	N											
	1				2				3			
1	0,503	0,512	0,512	0,514	1,539	1,518	1,518	1,510	2,498	2,551	2,551	2,500
2	0,481	0,509	0,508	0,496	1,510	1,476	1,476	1,486	2,461	2,520	2,520	2,430
1	0,502	0,498	0,495	0,513	1,550	1,492	1,519	1,520	2,555	2,484	2,583	2,530
2	0,495	0,503	0,493	0,489	1,581	1,513	1,547	1,570	2,550	2,476	2,515	2,480
1	0,513	0,512	0,485	0,511	1,544	1,498	1,551	1,480	2,509	2,537	2,469	2,510

ENSAYITA	VR											
	3,5 µgAs/L				4,5 µgAs/L				5,5 µgAs/L			
	N											
	4				5				6			
1	3,496	3,520	3,520	3,460	4,422	4,535	4,535	4,480	5,552	5,485	5,485	5,530
2	3,499	3,542	3,502	3,510	4,560	4,488	4,488	4,500	5,474	5,510	5,510	5,510
1	3,546	3,576	3,510	3,550	4,491	4,585	4,558	4,460	5,489	5,493	5,567	5,480
2	3,487	3,475	3,543	3,420	4,489	4,429	4,458	4,500	5,501	5,440	5,474	5,540
1	3,550	3,449	3,518	3,550	4,561	4,492	4,525	4,400	5,642	5,510	5,576	5,540

Anexo C 2 Calculo de precisión en reproducibilidad y repetibilidad de cada nivel

Ensayista	Nivel 1				Prom.	T3					
						NUMERO	DS	T1	T2	T4	T5
1	0,503	0,512	0,512	0,514	0,510	4	0,005	2,040	1,040	16	0,000
2	0,481	0,509	0,508	0,496	0,499	4	0,013	1,996	0,996	16	0,001
3	0,502	0,498	0,495	0,513	0,502	4	0,008	2,008	1,008	16	0,000
4	0,495	0,503	0,493	0,489	0,495	4	0,006	1,980	0,980	16	0,000
5	0,513	0,512	0,485	0,511	0,505	4	0,014	2,020	1,020	16	0,001
						20		10,044	5,045	80	0,001

P	5
Sr2	0,000
SL2	0,000
SR2	0,000
m^	0,502
Sr	0,010
Sw	0,010

Ensayista	Nivel 2				Prom.	T3					
						NUMERO	DS	T1	T2	T4	T5
1	1,539	1,518	1,518	1,510	1,521	4	0,012	6,084	9,254	16	0,000
2	1,510	1,476	1,476	1,486	1,487	4	0,016	5,948	8,845	16	0,001
3	1,550	1,492	1,519	1,520	1,520	4	0,024	6,080	9,242	16	0,002
4	1,581	1,513	1,547	1,570	1,553	4	0,030	6,212	9,647	16	0,003
5	1,544	1,498	1,551	1,480	1,518	4	0,035	6,072	9,217	16	0,004
						20		30,396	46,205	80	0,009

P	5
Sr2	0,001
SL2	0,000
SR2	0,001
m^	1,520
Sr	0,032
Sw	0,025

Ensayista	Nivel 3					Prom.	T3				
	NUMERO	DS	T1	T2	T4	T5					
1	2,498	2,551	2,551	2,500	2,525	4	0,030	10,100	25,503	16	0,003
2	2,461	2,520	2,520	2,430	2,483	4	0,045	9,932	24,661	16	0,006
3	2,555	2,484	2,583	2,530	2,538	4	0,042	10,152	25,766	16	0,005
4	2,550	2,476	2,515	2,480	2,505	4	0,035	10,020	25,100	16	0,004
5	2,509	2,537	2,469	2,510	2,506	4	0,028	10,024	25,120	16	0,002
						20		50,228	126,150	80	0,020

P	5
Sr2	0,001
SL2	0,000
SR2	0,001
m^	2,511
Sr	0,038
Sw	0,037

Ensayista	Nivel 4					Prom.	T3				
	NUMERO	DS	T1	T2	T4	T5					
1	3,496	3,520	3,520	3,460	3,499	4	0,028	13,996	48,972	16	0,002
2	3,499	3,542	3,502	3,510	3,513	4	0,020	14,052	49,365	16	0,001
3	3,546	3,576	3,510	3,550	3,546	4	0,027	14,184	50,296	16	0,002
4	3,487	3,475	3,543	3,420	3,481	4	0,050	13,924	48,469	16	0,008
5	3,550	3,449	3,518	3,550	3,517	4	0,048	14,068	49,477	16	0,007
						20		70,224	246,580	80	0,020

P	5
Sr2	0,001
SL2	0,000
SR2	0,002
m^	3,511
Sr	0,040
Sw	0,037

Ensayista	Nivel 5					Prom.	T3				
							NUMERO	DS	T1	T2	T4
1	4,422	4,535	4,535	4,480	4,493	4	0,054	17,972	80,748	16	0,009
2	4,560	4,488	4,488	4,500	4,509	4	0,034	18,036	81,324	16	0,003
3	4,491	4,585	4,558	4,460	4,524	4	0,058	18,096	81,866	16	0,010
4	4,489	4,429	4,458	4,500	4,469	4	0,032	17,876	79,888	16	0,003
5	4,561	4,492	4,525	4,400	4,494	4	0,069	17,976	80,784	16	0,014
						20		89,956	404,611	80	0,040

P	5
Sr2	0,003
SL2	0,000
SR2	0,002
m^	4,498
Sr	0,049
Sw	0,051

Ensayista	Nivel 6					Prom.	T3				
							NUMERO	DS	T1	T2	T4
1	5,552	5,485	5,485	5,530	5,513	4	0,034	22,052	121,573	16	0,003
2	5,474	5,510	5,510	5,510	5,501	4	0,018	22,004	121,044	16	0,001
3	5,489	5,493	5,567	5,480	5,507	4	0,040	22,028	121,308	16	0,005
4	5,501	5,440	5,474	5,540	5,489	4	0,042	21,956	120,516	16	0,005
5	5,642	5,510	5,576	5,540	5,567	4	0,057	22,268	123,966	16	0,010
						20		110,308	608,407	80	0,024

P	5
Sr2	0,002
SL2	0,001
SR2	0,002
m^	5,515
Sr	0,046
Sw	0,040

Anexo C 3 Tabla de datos de repetibilidad para el criterio de aceptabilidad en base al coeficiente de Horwitz.

Muestra	Nivel 1			Nivel 2			Nivel 3		
	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.1	Rep.2	Rep.3
1	0,503	0,502	0,513	1,539	1,550	1,544	2,498	2,555	2,509
2	0,512	0,498	0,512	1,518	1,492	1,498	2,551	2,484	2,537
3	0,512	0,495	0,485	1,518	1,519	1,551	2,551	2,583	2,469
4	0,514	0,513	0,511	1,510	1,520	1,480	2,500	2,530	2,510
Prom.	0,510	0,502	0,505	1,521	1,520	1,518	2,525	2,538	2,506
DS	0,005	0,008	0,014	0,012	0,024	0,035	0,030	0,042	0,028
CVr%	0,97	1,57	2,69	0,82	1,56	2,28	1,19	1,66	1,12
CVh%	25,12			21,29			19,71		

Muestra	Nivel 4			Nivel 5			Nivel 6		
	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.1	Rep.2	Rep.3
1	3,496	3,546	3,550	4,422	4,491	4,561	5,552	5,489	5,642
2	3,520	3,576	3,449	4,535	4,585	4,492	5,485	5,493	5,510
3	3,520	3,510	3,518	4,535	4,558	4,525	5,485	5,567	5,576
4	3,460	3,550	3,550	4,480	4,460	4,400	5,530	5,480	5,540
Prom.	3,499	3,546	3,517	4,493	4,524	4,494	5,513	5,507	5,567
DS	0,028	0,027	0,048	0,054	0,058	0,069	0,034	0,040	0,057
CVr%	0,81	0,77	1,35	1,20	1,28	1,53	0,61	0,73	1,02
CVh%	18,73			18,04			17,51		

Anexo C 4 Tabla de datos de reproducibilidad para el criterio de aceptabilidad en base al coeficiente de Horwitz.

Muestra	Nivel 1		Nivel 2		Nivel 3		Nivel 4		Nivel 5		Nivel 6	
	Rep.1	Rep.2	Rep.1	Repl.2	Rep.1	Rep.2	Rep.1	Rep.2	Rep.1	Rep.2	Rep.1	Rep.2
1	0,481	0,495	1,510	1,581	2,461	2,550	3,5	3,487	4,560	4,489	5,474	5,501
2	0,509	0,503	1,476	1,513	2,520	2,476	3,54	3,475	4,488	4,429	5,510	5,440
3	0,508	0,493	1,476	1,547	2,520	2,515	3,502	3,543	4,488	4,458	5,510	5,474
4	0,496	0,489	1,486	1,570	2,430	2,480	3,510	3,420	4,500	4,500	5,510	5,540
Prom.	0,499	0,495	1,487	1,553	2,483	2,505	3,513	3,481	4,509	4,469	5,501	5,489
DS	0,013	0,006	0,016	0,030	0,045	0,035	0,020	0,050	0,034	0,032	0,018	0,042
CVRi%	2,62	1,18	1,08	1,93	1,81	1,38	0,56	1,45	0,76	0,72	0,33	0,77
CVhRi%	33,48		28,38		26,28		24,99		24,06		23,34	

Anexo C 5 Tabla de datos para la determinación de exactitud en distintos niveles

ENSAYITA	VR											
	0,5 µgAs/L				1,5 µgAs/L				2,5 µgAs/L			
	N											
	1				2				3			
	1	0,503	0,512	0,512	0,514	1,539	1,518	1,518	1,510	2,498	2,551	2,551
2	0,481	0,509	0,508	0,496	1,510	1,476	1,476	1,486	2,461	2,520	2,520	2,430
3	0,502	0,498	0,495	0,513	1,550	1,492	1,519	1,520	2,555	2,484	2,583	2,530
4	0,495	0,503	0,493	0,489	1,581	1,513	1,547	1,570	2,550	2,476	2,515	2,480
5	0,513	0,512	0,485	0,511	1,544	1,498	1,551	1,480	2,509	2,537	2,469	2,510

ENSAYITA	VR											
	3,5 µgAs/L				4,5 µgAs/L				5,5 µgAs/L			
	N											
	4				5				6			
1	3,496	3,520	3,520	3,460	4,422	4,535	4,535	4,480	5,552	5,485	5,485	5,530
2	3,499	3,542	3,502	3,510	4,560	4,488	4,488	4,500	5,474	5,510	5,510	5,510
3	3,546	3,576	3,510	3,550	4,491	4,585	4,558	4,460	5,489	5,493	5,567	5,480
4	3,487	3,475	3,543	3,420	4,489	4,429	4,458	4,500	5,501	5,440	5,474	5,540
5	3,550	3,449	3,518	3,550	4,561	4,492	4,525	4,400	5,642	5,510	5,576	5,540

No	0,5 µgAs/L				Prom.	DSij	DSij 2	G	dij	dij2
1	0,503	0,512	0,512	0,514	0,510	0,005	0,0000	1,361	0,010	0,00011
2	0,481	0,509	0,508	0,496	0,499	0,013	0,0002	0,628	-0,002	0,00000
3	0,502	0,498	0,495	0,513	0,502	0,008	0,0001	0,036	0,002	0,00000
4	0,495	0,503	0,493	0,489	0,495	0,006	0,0000	1,217	-0,005	0,00002
5	0,513	0,512	0,485	0,511	0,505	0,014	0,0002	0,519	0,005	0,00003

Prom.(y= j)	0,502
Cexp	0,389
DSj	0,006
C tab	0,532

∑ (dij)	0,0002
p	5
DESRd	0,006
ECMR	1,26
dj	0,0022
DSj	0,0059
texp	0,837
ttab	2,132

No	1,5 µgAs/L				Prom.	DSij	DSij 2	G	dij	dij2
1	1,539	1,518	1,518	1,510	1,521	0,012	0,0002	0,058	0,021	0,0005
2	1,510	1,476	1,476	1,486	1,487	0,016	0,0003	1,414	-0,013	0,0002
3	1,550	1,492	1,519	1,520	1,520	0,024	0,0006	0,015	0,020	0,0004
4	1,581	1,513	1,547	1,570	1,553	0,030	0,0009	1,411	0,053	0,0028
5	1,544	1,498	1,551	1,480	1,518	0,035	0,0012	0,071	0,018	0,0003

Prom.(y= j)	1,520
Cexp	0,392
DSj	0,023
C tab	0.532

∑ (dij)	0,0041
p	5
DESRd	0,029
ECMR	2,04
dj	0,020
DSj	0,023
texp	1,914
ttab	2,132

No	2,5 µgAs/L				Prom.	DSij	DSij 2	G	dij	dij2
1	2,498	2,551	2,551	2,500	2,525	0,030	0,0009	0,643	0,025	0,0006
2	2,461	2,520	2,520	2,430	2,483	0,045	0,0020	1,361	-0,017	0,0003
3	2,555	2,484	2,583	2,530	2,538	0,042	0,0018	1,259	0,038	0,0014
4	2,550	2,476	2,515	2,480	2,505	0,035	0,0012	0,294	0,005	0,0000
5	2,509	2,537	2,469	2,510	2,506	0,028	0,0008	0,247	0,006	0,0000

Prom.(y= j)	2,511
Cexp	0,302
DSj	0,021
C tab	0.532

∑ (dij)	0,0024
p	5
DESRd	0,022
ECMR	0,96
dj	0,011
DSj	0,021
texp	1,214
ttab	2,132

No	3,5 µgAs/L				Prom.	DSij	DSij 2	G	dij	dij2
1	3,496	3,52	3,520	3,460	3,499	0,028	0,0008	0,511	-0,001	0,0000
2	3,499	3,542	3,502	3,510	3,513	0,020	0,0004	0,089	0,013	0,0002
3	3,546	3,576	3,510	3,550	3,546	0,027	0,0007	1,446	0,045	0,0021
4	3,487	3,475	3,543	3,420	3,481	0,050	0,0025	1,259	-0,019	0,0004
5	3,550	3,449	3,518	3,550	3,517	0,048	0,0023	0,236	0,017	0,0003

Prom.(y= j)	3,511
Cexp	0,377
DSj	0,024
C tab	0.532

∑ (dij)	0,0029
p	5
DESRd	0,024
ECMR	0,75
dj	0,011
DSj	0,024
texp	1,049
ttab	2,132

No	4,5 µgAs/L				Prom.	DSij	DSij 2	G	dij	dij2
1	4,422	4,535	4,535	4,480	4,493	0,054	0,0029	0,234	-0,007	0,0000
2	4,560	4,488	4,488	4,500	4,509	0,034	0,0012	0,553	0,009	0,0001
3	4,491	4,585	4,558	4,460	4,524	0,058	0,0034	1,267	0,024	0,0006
4	4,489	4,429	4,458	4,500	4,469	0,032	0,0010	1,416	-0,031	0,0010
5	4,561	4,492	4,525	4,400	4,494	0,069	0,0048	0,170	-0,006	0,0000

Prom.(y= j)	4,498
Cexp	0,359
DSj	0,020
C tab	0.532

∑ (dij)	0,0017
p	5
DESRd	0,018
ECMR	0,45
dj	-0,002
DSj	0,020
texp	-0,247
ttab	2,132

No	5,5 µgAs/L				Prom.	DSij	DSij 2	G	dij	dij2
1	5,552	5,485	5,485	5,530	5,513	0,034	0,0011	0,080	0,013	0,0002
2	5,474	5,510	5,510	5,510	5,501	0,018	0,0003	0,477	0,001	0,0000
3	5,489	5,493	5,567	5,480	5,507	0,040	0,0016	0,270	0,007	0,0001
4	5,501	5,440	5,474	5,540	5,489	0,042	0,0018	0,881	-0,011	0,0001
5	5,642	5,510	5,576	5,540	5,567	0,057	0,0032	1,708	0,067	0,0045

Prom.(y= j)	5,515
Cexp	0,398
DSj	0,030
C tab	0.532

∑ (dij)	0,0049
p	5
DESRd	0,031
ECMR	0,62
dj	0,015
DSj	0,030
texp	1,139
ttab	2,132

G tab = 1,715

G tab = Test de Grubb's

C exp = Test de Cochran's experimental

DSj = Desviación estandar

C tab = Test de Cochran's tabulado

DESRd = Desviación estandar relativa del sesgo

ECMR = Error cuadrático medio relativo

dj = Sesgo

t exp = t de student experimental

t tab = t de student tabulado

Anexo E 1 Tablas

Tabla de distribución t - Student

1 cola α v	90%	95%	97.5%	99%	99,5%
	0.10	0.05	0.025	0.01	0,0015
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576

VALORES TABULADOS DE t A 95,46 % Y 99,73 % DE PROBABILIDAD

Grados de libertad	95,46%		99,73%		Grados de libertad	95,46%		99,73%	
	Una Cola	Dos Colas	Una Cola	Dos Colas		Una Cola	Dos Colas	Una Cola	Dos Colas
1	6,964	13,999	117,890	235,784	26	1,756	2,102	3,035	3,316
2	3,088	4,532	13,553	19,206	27	1,754	2,098	3,025	3,303
3	2,461	3,310	7,256	9,219	28	1,752	2,094	3,016	3,291
4	2,218	2,871	5,480	6,620	29	1,749	2,091	3,007	3,280
5	2,091	2,650	4,687	5,507	30	1,747	2,088	2,999	3,270
6	2,013	2,518	4,247	4,904	31	1,746	2,085	2,992	3,261
7	1,960	2,430	3,969	4,530	32	1,744	2,082	2,985	3,252
8	1,922	2,368	3,778	4,277	33	1,742	2,080	2,978	3,244
9	1,894	2,321	3,640	4,094	34	1,741	2,077	2,972	3,236
10	1,871	2,285	3,535	3,957	35	1,739	2,075	2,966	3,229
11	1,854	2,256	3,453	3,850	36	1,738	2,073	2,961	3,222
12	1,839	2,233	3,387	3,764	37	1,736	2,071	2,956	3,216
13	1,827	2,213	3,332	3,694	38	1,735	2,069	2,951	3,210
14	1,816	2,196	3,287	3,636	39	1,734	2,067	2,946	3,204
15	1,807	2,182	3,248	3,586	40	1,733	2,065	2,942	3,199
16	1,800	2,170	3,215	3,544	41	1,732	2,064	2,938	3,194
17	1,793	2,159	3,187	3,507	42	1,731	2,062	2,934	3,189
18	1,787	2,150	3,162	3,475	43	1,730	2,061	2,930	3,184
19	1,782	2,142	3,139	3,447	44	1,729	2,059	2,927	3,180
20	1,777	2,134	3,120	3,422	45	1,728	2,058	2,924	3,175
21	1,773	2,127	3,102	3,400	46	1,727	2,057	2,920	3,171
22	1,769	2,121	3,086	3,380	47	1,727	2,056	2,917	3,168
23	1,765	2,116	3,071	3,361	48	1,726	2,054	2,914	3,164
24	1,762	2,111	3,058	3,345	49	1,725	2,053	2,912	3,160
25	1,759	2,106	3,046	3,330	50	1,724	2,052	2,909	3,157

**VALORES TABULADOS DE “C” PARA EL TEST DE COCHRAN’S A 1% Y
5% DE PROBABILIDAD**

p	n=2		n=3		n=4		n=5		n=6	
	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%
2	---	---	0,995	0,975	0,979	0,939	0,959	0,906	0,937	0,877
3	0,993	0,967	0,942	0,871	0,883	0,798	0,834	0,746	0,793	0,707
4	0,968	0,906	0,864	0,768	0,781	0,684	0,721	0,629	0,676	0,590
5	0,928	0,841	0,788	0,684	0,696	0,598	0,633	0,544	0,588	0,506
6	0,883	0,781	0,722	0,616	0,626	0,532	0,564	0,480	0,520	0,445
7	0,838	0,727	0,664	0,561	0,568	0,480	0,508	0,431	0,466	0,397
8	0,794	0,680	0,615	0,516	0,521	0,438	0,463	0,391	0,423	0,360
9	0,754	0,638	0,573	0,478	0,481	0,403	0,425	0,358	0,387	0,329
10	0,718	0,602	0,536	0,445	0,447	0,373	0,393	0,331	0,357	0,303
11	0,684	0,570	0,504	0,417	0,418	0,348	0,366	0,308	0,332	0,281
12	0,653	0,541	0,475	0,392	0,392	0,326	0,343	0,288	0,310	0,262
13	0,624	0,515	0,450	0,371	0,369	0,307	0,322	0,271	0,291	0,243
14	0,599	0,492	0,427	0,352	0,349	0,291	0,304	0,255	0,274	0,232
15	0,575	0,471	0,407	0,335	0,332	0,276	0,288	0,242	0,259	0,220
16	0,553	0,452	0,388	0,319	0,316	0,262	0,274	0,230	0,246	0,208
17	0,532	0,434	0,372	0,305	0,301	0,250	0,261	0,219	0,234	0,198
18	0,514	0,418	0,356	0,293	0,288	0,240	0,249	0,209	0,223	0,189
19	0,496	0,403	0,343	0,281	0,276	0,230	0,238	0,200	0,214	0,181
20	0,480	0,389	0,330	0,270	0,265	0,220	0,229	0,192	0,205	0,174
21	0,465	0,377	0,318	0,261	0,255	0,212	0,220	0,185	0,197	0,167
22	0,450	0,365	0,307	0,252	0,246	0,204	0,212	0,178	0,189	0,160
23	0,437	0,354	0,297	0,243	0,238	0,197	0,204	0,172	0,182	0,155
24	0,425	0,343	0,287	0,235	0,230	0,191	0,197	0,166	0,176	0,149
25	0,413	0,334	0,278	0,228	0,222	0,185	0,190	0,160	0,170	0,144
26	0,402	0,325	0,270	0,221	0,215	0,179	0,184	0,155	0,164	0,140
27	0,391	0,316	0,262	0,215	0,209	0,173	0,179	0,150	0,159	0,135
28	0,382	0,308	0,255	0,209	0,202	0,168	0,173	0,146	0,154	0,131
29	0,372	0,300	0,248	0,203	0,196	0,164	0,168	0,142	0,150	0,127
30	0,363	0,293	0,241	0,198	0,191	0,159	0,164	0,138	0,145	0,124
31	0,355	0,286	0,235	0,193	0,186	0,155	0,159	0,134	0,141	0,120
32	0,347	0,280	0,229	0,188	0,181	0,151	0,155	0,131	0,138	0,117
33	0,339	0,273	0,224	0,184	0,177	0,147	0,151	0,127	0,134	0,114
34	0,332	0,267	0,218	0,179	0,172	0,144	0,147	0,124	0,131	0,111
35	0,325	0,262	0,213	0,175	0,168	0,140	0,144	0,121	0,127	0,108
36	0,318	0,256	0,208	0,172	0,165	0,137	0,140	0,118	0,124	0,106
37	0,312	0,251	0,204	0,168	0,161	0,134	0,137	0,116	0,121	0,103
38	0,306	0,246	0,200	0,164	0,157	0,131	0,134	0,113	0,119	0,101

**VALORES TABULADOS DE “G” PARA EL TEST DE GRUBB’S AL 1% Y AL 5
% DE PROBABILIDAD**

p	Prueba simple de un solo valor alejado		Prueba doble de dos valores alejados	
	Arriba de 1%	Arriba de 5%	Bajo 1%	Bajo 5%
3	1,155	1,154	---	---
4	1,496	1,481	0,0000	0,0002
5	1,764	1,715	0,0018	0,0090
6	1,973	1,887	0,0116	0,0349
7	2,139	2,020	0,0308	0,0708
8	2,274	2,127	0,0563	0,1101
9	2,387	2,215	0,0851	0,1492
10	2,482	2,290	0,1150	0,1864
11	2,564	2,355	0,1448	0,2213
12	2,636	2,412	0,1738	0,2537
13	2,699	2,462	0,2016	0,2836
14	2,755	2,507	0,2280	0,3112
15	2,806	2,548	0,2530	0,3367
16	2,852	2,586	0,2767	0,3603
17	2,894	2,620	0,2990	0,3822
18	2,932	2,652	0,3200	0,4025
19	2,968	2,681	0,3398	0,4214
20	3,001	2,708	0,3585	0,4391
21	3,031	2,734	0,3761	0,4556
22	3,060	2,758	0,3927	0,4711
23	3,087	2,780	0,4019	0,4857
24	3,112	2,802	0,4234	0,4994
25	3,135	2,822	0,4376	0,5123
26	3,158	2,841	0,4510	0,5245
27	3,179	2,859	0,4638	0,5360
28	3,199	2,876	0,4759	0,5470
29	3,218	2,893	0,4875	0,5574
30	3,236	2,908	0,4985	0,5672
31	3,253	2,924	0,5091	0,5766
32	3,270	2,938	0,5192	0,5856
33	3,286	2,952	0,5288	0,5941
34	3,301	2,965	0,5381	0,6023
35	3,316	2,978	0,5469	0,6101
36	3,330	2,991	0,5554	0,6175
37	3,343	3,003	0,5636	0,6247
38	3,356	3,014	0,5714	0,6316

Tabla de Horwitz

CONCENTRACIÓN			REPETIBILIDAD CV%	REPRODUCIBILIDAD INTERNA CV%
1 ppt	$1 / 10^{12}$	1,00E-12	64,0	85,3
10 ppt	$10 / 10^{12}$	1,00E-11	45,3	60,3
100 ppt	$100 / 10^{12}$	1,00E-10	32,0	42,7
1 ppb	$1 / 10^9$	1,00E-09	22,6	30,2
10 ppb	$10 / 10^9$	1,00E-08	16,0	21,3
100 ppb	$100 / 10^9$	1,00E-07	11,3	15,1
1 ppm	$1 / 10^6$	1,00E-06	8,00	10,7
10 ppm	$10 / 10^6$	1,00E-05	5,66	7,54
100 ppm	$100 / 10^6$	1,00E-04	4,00	5,33
1000 ppm	$1000 / 10^6$	1,00E-03	2,83	3,77
1%	$1 / 10^1$	1,00E-02	2,00	2,67
10%	$10 / 10^1$	1,00E-01	1,41	1,89

Tabla de % Recuperación

ANALITO	UNIDAD	RECUPERACIÓN ESTIMADO (%)
100	100%	98 – 102
10	10%	98 – 102
1	1%	97 - 103
0,1	0,10%	95 – 105
0,01	100 ppm	90 – 107
0,001	10 ppm	80 – 110
0,0001	1 ppm	80 – 110
0,00001	100 ppb	80 – 110
0,000001	10 ppb	60 – 115
0,0000001	1 ppb	40 – 120