



Universidad Nacional Autónoma de México

*Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza*

*Protocolo de validación para la determinación de cloro libre
en agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A :

Ávila Pérez Cristina

*Director de tesis: QFB. Sandra Ortega Munguía
Asesor de tesis: Mtra. Dora Alicia Pérez González*



México, D.F., a 11 de Marzo de 2013



Índice



<i>Resumen</i>	1
<i>Introducción</i>	2
<i>Marco teórico</i>	3
<i>Planteamiento del problema</i>	19
<i>Objetivo</i>	20
<i>Hipótesis</i>	21
<i>Método</i>	22
<i>Resultados y análisis de resultados</i>	26
<i>Protocolo</i>	30
<i>Conclusiones</i>	46
<i>Referencias</i>	47



Resumen



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Farmacéutica L-313, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Campus II. Donde se llevó a cabo el protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina (DFD); con base en la guía de validación de métodos analíticos emitida por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (CNQFB).

El método analítico implementado fue una modificación de la técnica titulométrica de la DFD ferrosa del "Standard Methods for the examination of water and wastewater" en un rango de 0.75 a 2.25 ppm de cloro libre.

Los resultados preliminares en las pruebas piloto presentaron para la linealidad del sistema un coeficiente de correlación de 0.9985, y una ecuación $Y = 0.0166x + 0.1822$; para la precisión del sistema la ecuación $Y = -0.0066x + 0.2066$, y un coeficiente de determinación de 0.9942; para la linealidad del método su porcentaje de recuperación fue del 97 al 103% con la siguiente ecuación $Y = 0.9426x + 0.0546$ y un coeficiente de determinación del 0.9986. Con lo que respecta a la repetibilidad el coeficiente de variación fue menor al 3%, su exactitud osciló en un rango de 97.3 a 102.5. Finalmente la reproducibilidad de igual manera el coeficiente de variación no sobrepasa el 3% establecido por el CNQFB.

Con base en los resultados obtenidos para las pruebas piloto el método analítico desarrollado con DFD fue lineal, exacto y preciso en un intervalo de 0.75 a 2.25 ppm de cloro libre.



Introducción



Ino de los problemas más importantes en el mundo es la escasez y contaminación del agua. La Organización Mundial de la Salud (OMS) asegura que invertir en el saneamiento de ésta, es benéfico para la salud y para la economía de los países en desarrollo.

En México, se creó el Programa Nacional Hídrico 2007-2012 cuyo objetivo es incrementar la cobertura de los servicios de agua potable en el país; ya que la falta de acceso al agua potable tiene como consecuencia el padecimiento de enfermedades de origen hídrico. Razón, por la cual el monitoreo de la calidad del agua en el territorio nacional es obligatoria y corresponde su vigilancia a la Secretaría de Salud, en coordinación con los gobiernos estatales, municipales, gobierno del Distrito Federal, así como a la Comisión Nacional del Agua.

La desinfección del agua con cloro, tiene el propósito de prevenir enfermedades derivadas de la presencia de contaminantes bacteriológicos. Sin embargo el cloro que se agrega al agua potable para desinfectarla reacciona con el material húmico, lo que puede formar compuestos genotóxicos y potencialmente carcinogénicos. Estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo de agua clorada está asociado con un incremento en el riesgo de cáncer gástrico, de vejiga y recto. Es por esto que la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización", establece que el agua para uso y consumo humano debe contener cloro residual libre en una concentración de 0.2 a 1.5 mg/L.

La técnica más recomendada para medir cloro residual es el método colorimétrico de DFD, pero en la actualidad, no existe un método "ideal" para la cuantificación de cloro ya que todos los métodos de análisis de cloro muestran cierta falta de especificidad y no son suficientemente selectivos.

Por las razones antes expuestas en el presente trabajo se elaboró el protocolo de validación para la determinación de cloro libre en agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina.



Marco teórico



La historia de la desinfección del agua empieza desde tiempos remotos. La ley persa establecía que el agua debía ser almacenada en vasijas de cobre o de plata antes de su uso; los trabajos de Aristóteles muestran que también se utilizaron vasijas de porcelana no vitrificada con el propósito de impedir la diseminación de enfermedades de origen hídrico.¹

La epidemia de cólera aparecida en Londres en 1854, es la primera observación registrada de una amplia transmisión de enfermedades por un suministro de agua pública. John Snow y John York, secretario e inspector respectivamente del comité de investigación del cólera de Londres, llevaron a cabo un cuidadoso estudio del foco epidémico, y los resultados obtenidos concluyeron de forma contundente, que la epidemia estaba asociada con la contaminación del suministro del agua de pozo del distrito.²

En el año de 1904, Mr. Alexander Houston del Consejo de aguas de la ciudad de Londres introdujo la cloración continua de un suministro de agua pública; se utilizó hipoclorito de sodio como desinfectante y en 1908 se introdujo la desinfección química de los suministros públicos en los Estados Unidos, utilizando hipoclorito de calcio para el suministro de agua, de la ciudad de Chicago. En el año 1910, el Tribunal Supremo de New Jersey paso por una orden por la cual la ciudad de Jersey tenía el derecho de clorar su suministro de agua en interés de la salud pública, esto se consideró como la decisión más importante con respecto a la desinfección química.²

Desinfección y desinfectantes del agua

Los desinfectantes se utilizan en casi todos los sistemas de potabilización. La confianza en la calidad del agua, es producto de la concentración de los desinfectantes y de la eficiencia de los mismos.³

La concentración se cuantifica mediante análisis químicos, mientras que la eficiencia por la reducción de organismos indicadores (coliformes). Para que estos sean de utilidad práctica, deben poseer las siguientes propiedades:¹

1. Destruir gran cantidad de patógenos introducidos en las aguas residuales municipales, además de hacerlo en un lapso de tiempo corto y en una amplia gama de temperatura, así como ser estable en fluctuaciones en composición y concentración.
2. En las concentraciones requeridas, no deben ser tóxicos al hombre ni a los animales domésticos.
3. Deben ser aplicables a un bajo costo, fácil de almacenar, transportar, manipular y aplicar.
4. Su concentración en el agua tratada debe ser determinable con facilidad, rapidez y de preferencia automáticamente.
5. Deben persistir en el agua con la concentración suficiente para contrarrestar una nueva contaminación.

Métodos de desinfección del agua

La clasificación del método de desinfección se realiza por el tipo de desinfectante usado y se divide en dos grupos: los primeros son los métodos no químicos y los segundos métodos químicos.¹

Métodos no químicos

Los principales métodos incluyen la aplicación de energía térmica y radiación de alta frecuencia. Estas técnicas tienen escasa importancia para las operaciones de tratamiento del agua en gran escala, pero si tienen cierto interés para situaciones en que deban tratarse pequeños volúmenes de agua.¹

Métodos térmicos

La aplicación directa de calor es uno de los métodos más antiguos y eficaces para la desinfección del agua. Una esterilización casi total puede obtenerse por ebullición del agua.¹

Radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta (UV) se emite con lámparas especiales y es efectiva para matar todos los microorganismos siempre y cuando el tiempo de exposición sea el adecuado.⁴ La energía UV se absorbe por el material genético de los microorganismos, anulando así su capacidad para reproducirse y sobrevivir.³ Como ventajas de la desinfección UV se puede mencionar que no hay formación de sabores u olores, su mantenimiento es mínimo y sin peligro de una sobredosis; contrariamente tiene como desventaja un alto costo económico.⁵



Métodos químicos

Éstos comprenden: ozono, permanganato de potasio, algunos metales pesados y a los halógenos (bromo, yodo y cloro). Desde el punto de vista bacteriológico, no tiene por objeto destruir todos los organismos vivos del agua, pero sí, garantizar la ausencia de los gérmenes patógenos y suprimir el riesgo de contaminación del sistema de distribución.⁶

El **ozono** (O_3) es uno de los más potentes germicidas usados en el tratamiento de aguas. Las ventajas del ozono radican en su alta efectividad desinfectante, su habilidad para remover muchos problemas de color, olor y sabor.^{1, 2, 7}

El **permanganato de potasio** ($KMnO_4$) es un compuesto oxidante, y es utilizado en estaciones de tratamiento de aguas para el control de olor y sabor, remoción de color, crecimiento de bacterias (por ejemplo: coliformes, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri* y virus (polivirus, bacteriófagos). También remueve hierro, manganeso, y precursores de trihalometanos.⁷

La **plata, cobre, cobalto** y el **níquel** presentan buenas propiedades bactericidas, el efecto desinfectante del metal pesado fue primeramente observado en aguas almacenadas en contenedores de plata. Aunque la plata es uno de los varios metales que exhiben este comportamiento, es el más importante de la desinfección del agua potable. De hecho, la plata es el único metal pesado con una eficacia razonable como desinfectante. La **plata coloidal** en concentraciones de 25 a 40 $\mu g/L$ es un buen desinfectante.^{1, 2, 6}

El uso del **bromo** se ha incrementado estos últimos años y se emplea principalmente para la desinfección de las aguas de piscina. De un modo general sus propiedades físicas y químicas son similares a las del cloro; sin embargo es menos electronegativo y su reactividad química es inferior a dosis iguales, siendo su actividad bactericida más débil.^{1, 5, 8}

El **yodo** es el menos soluble en agua, posee un bajo potencial de oxidación, por lo que ofrece reactividad mínima con los compuestos orgánicos. Estudios realizados indican que el yodo es más efectivo en la desinfección de *Entamoeba histolytica*.^{1, 2}

El **hipoclorito de sodio** proporciona desde el 5% hasta el 15% de cloro disponible.^{2, 3, 9} El **cloro** actúa sobre las bacterias por envenenamiento enzimático de su citoplasma.⁸

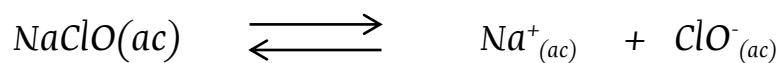
Mecanismos de la desinfección con cloro

La cloración del agua potable se lleva a cabo mediante el burbujeo del cloro gaseoso o mediante la disolución de los compuestos de cloro y su posterior dosificación. El cloro en cualquiera de sus formas, se hidroliza al entrar en contacto con el agua, y forma ácido hipocloroso (HClO) de la siguiente forma:¹⁰

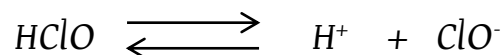
En el caso del cloro gaseoso, la reacción que tiene lugar es:



En el caso del hipoclorito de sodio, la reacción que tiene lugar es:



Posteriormente, los iones de hipoclorito formados establecen un equilibrio con el ácido hipocloroso de acuerdo a la siguiente ecuación:¹⁰



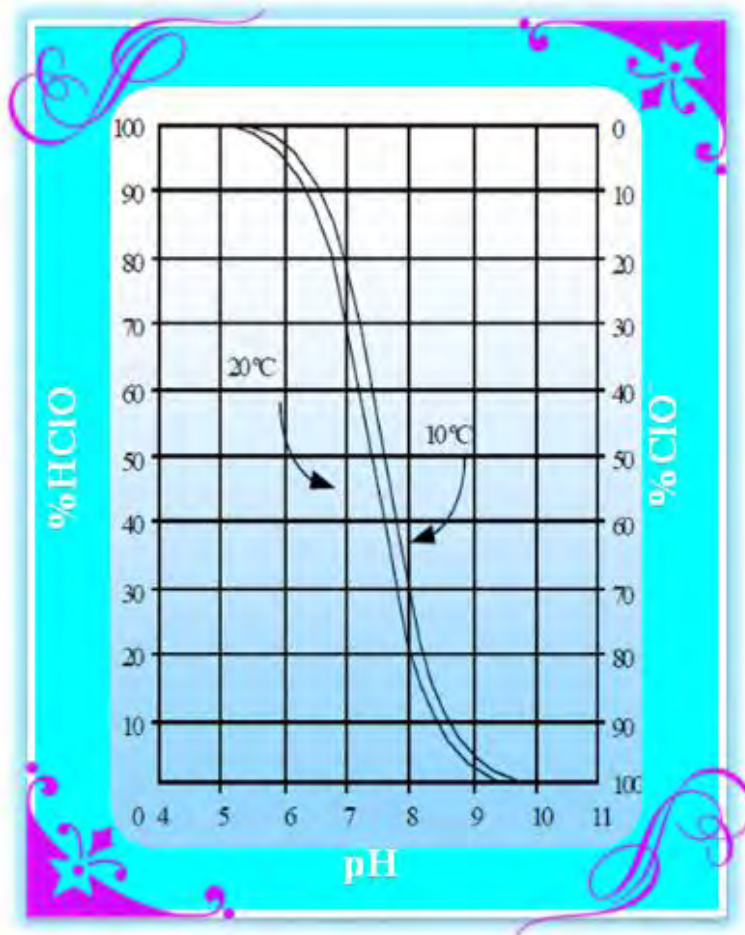


Figura 1. Concentraciones relativas del HClO y ClO⁻ en función del pH.¹⁰

*En general, el HClO es más efectivo como desinfectante que el ClO⁻.*¹⁰

Ambas fracciones (HClO y ClO⁻) coexisten en el agua a pH entre 6.0 y 9.0 (el rango usual para el agua natural y potable). Cuando el valor de pH del agua clorada es 7.5, el 50% de la concentración de cloro presente será ácido hipocloroso no dissociado y el otro 50% será ion hipoclorito. Los diferentes porcentajes de HClO y ClO⁻ en función de pH; se muestran en la figura 1.¹⁰

Química de la cloración

Cuando se añade cloro al agua, este se combina con amonio y otros componentes del nitrógeno y se producen compuestos tales como cloraminas, dicloraminas y tricloraminas; estas sustancias forman el cloro combinado y el cloro que permanece en el agua no combinado recibe el nombre de cloro residual libre. El cloro libre tiene una actividad desinfectante más efectiva que el combinado.³

Si al aplicar el cloro, este reacciona con las impurezas propias del agua tales como la materia orgánica, los sulfuros, el hierro y los nitritos; se crea una demanda de cloro.³

Si se grafica la dosis aplicada contra los residuales se obtiene una curva de demanda de cloro. En dicha curva se observa un incremento inicial en los residuales de cloro seguido de una declinación y finalmente de otro incremento, a partir de un punto conocido como punto de quiebre.^{2, 11, 12} El análisis de la curva de demanda de cloro (figura 2) permite hacer las observaciones siguientes.^{2, 4, 5, 11}

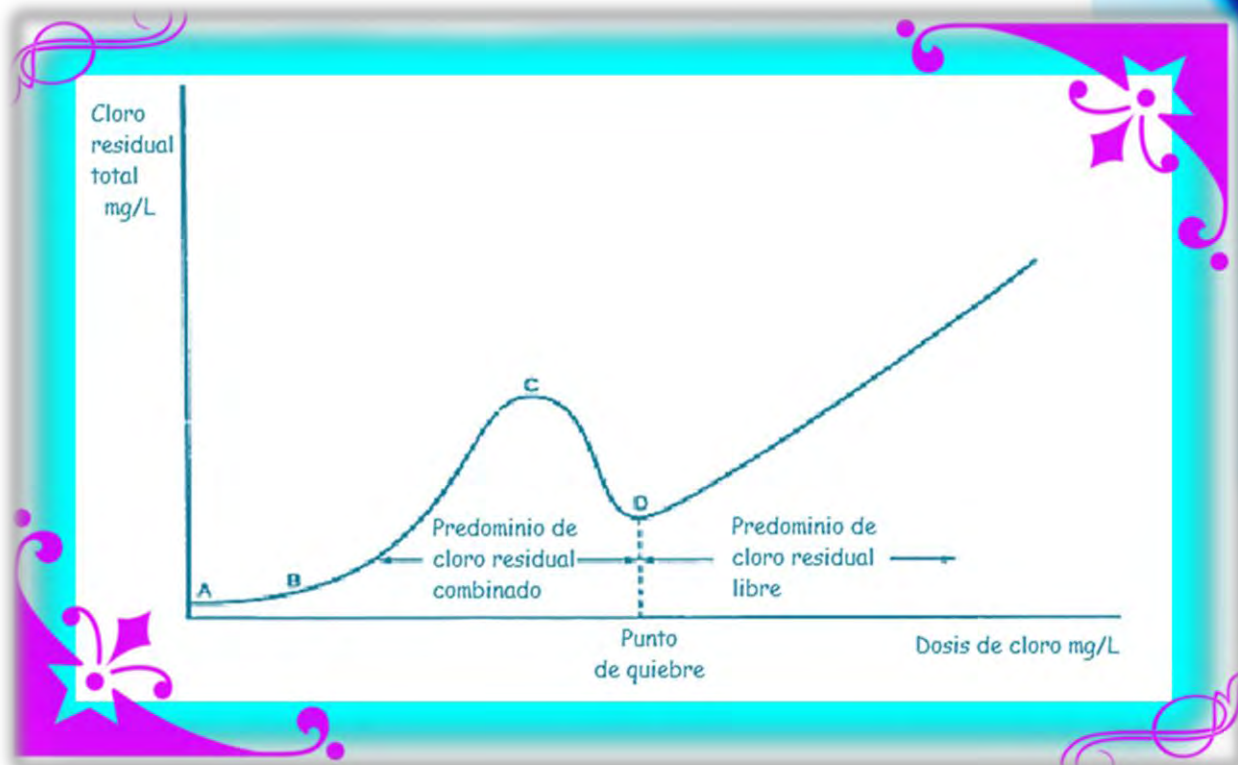


Figura 2. Curva de demanda de cloro²

A-B: el cloro reacciona inicialmente con los agentes reductores presentes y no forman un residual detectable. La dosis de cloro en el punto B representa la cantidad de cloro requerido para satisfacer la demanda ejercida por los agentes del agua.^{2, 4, 5,11}

B-C: satisfecha la demanda ejercida por los agentes reductores o demanda inmediata de cloro, este reacciona con todo el amoníaco y las aminas orgánicas presentes para formar un residual de cloro combinado. Cuando todo el amoníaco y las aminas orgánicas han reaccionado con el cloro, empieza a formarse un residual de cloro libre. A una cierta concentración crítica, punto C, la concentración de cloro libre es lo suficientemente alto como para oxidar las cloraminas.^{2, 4,11}

C-D: en este punto la oxidación de cloraminas reduce el cloro residual y es acompañada por la formación de óxido nitroso, nitrógeno y tricloruro de nitrógeno.^{2, 4,11}

D: completa la oxidación de los compuestos susceptibles a la oxidación, todo el cloro degradado desarrolla un residual de cloro libre. El punto D, se conoce como punto de quiebre.^{2, 4, 5,11}

Subproductos de la desinfección

(OSZD)

Hacia la mitad de los años setentas, se descubrió que el cloro además de desactivar los microorganismos, reacciona con la materia orgánica presente en el agua; generando subproductos de la desinfección (SPD), específicamente compuestos orgánicos sintéticos como los trihalometanos (THM), aunque se ha identificado a otros SPD tales como los ácidos haloacéticos (AHA).¹³

La formación de los subproductos se ve afectada por: la concentración de materia orgánica, el potencial de hidrogeno (pH), la temperatura, la dosis del cloro y el tiempo de contacto.¹³

Materia orgánica

La materia orgánica natural (MON) es el precursor de los subproductos de la desinfección en el agua potable. Está presente de manera natural en el agua sin tratar, pero su cantidad y reactividad varían de acuerdo con las fuentes de agua (lagos, ríos, arroyos, agua subterránea).¹³

Potencial de hidrógeno (pH)

El pH, condiciona las características de las reacciones químicas responsables de la formación de los SPD, pero su valor es susceptible de ser ajustado antes de la desinfección.¹³

La temperatura

Las condiciones estacionales afectan la disponibilidad de la materia orgánica natural y su composición; en el caso de la formación de trihalometanos, a mayor temperatura se ve favorecida la reacción entre el cloro residual libre y la materia orgánica, por lo que las concentraciones de trihalometanos en el agua son mayores en el verano.¹³

Tiempo de contacto

Un parámetro fundamental de la formación de subproductos es el tiempo de contacto entre el desinfectante y la materia orgánica natural, el cual corresponde al tiempo de permanencia del agua tratada en la red de distribución. A mayor tiempo de contacto, mayor es la concentración de los subproductos.¹³

Dosis de cloro

La dosis de desinfectante aplicada al agua durante el tratamiento afecta directamente la formación de los SPD, ya que una mayor dosis de cloro favorece la formación de ácidos haloacéticos en lugar de trihalometanos, así como también la formación de subproductos.¹³

Métodos de análisis del cloro

En 1940 se demostró la diferencia del poder desinfectante entre el cloro residual total y el cloro residual libre. En consecuencia los métodos para medir cloro se pueden dividir en dos grupos: 1) los métodos para la determinación de cloro residual total y 2) métodos para la determinación del cloro residual libre además del combinado.¹⁴

1. Métodos para la determinación de cloro residual total

Todos los métodos para medir cloro residual dependen de su capacidad oxidante, dentro de estos métodos encontramos el de la ortotoluidina y el yodométrico.^{8, 14, 15}

Método de la ortotoluidina

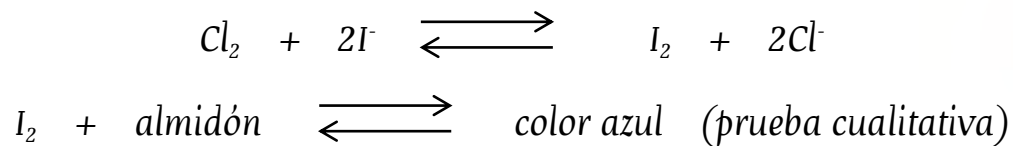
En 1909 Phelps¹⁵ propuso el uso de la ortotoluidina como indicador colorimétrico para los residuales de cloro. Ellms y Hauseren en 1913 incorporaron el uso de los colores estándares haciendo, de esta manera, la prueba cuantitativa. Poco después, se idearon aparatos patentados que emplean discos de vidrio de colores, apropiado para el uso en el trabajo de campo y en el laboratorio.^{8, 15}

Esto hizo de la cloración un método práctico de desinfección incluso en los abastecimientos más pequeños debido a la simplicidad de la prueba. Sin embargo, la prueba de ortotoluidina ofrece relativamente poca precisión y exactitud, si se compara con otros métodos disponibles hoy en día. Además, en la actualidad la ortotoluidina se conoce como un compuesto tóxico de potencial carcinógeno. Por tanto, su uso como procedimiento estándar ha sido eliminado del “Standard Methods for the examination of water and wastewater”, publicado por la American Public Health Association, que es la encargada de determinar los métodos para el análisis químico, físico y microbiológico del agua potable y residual.^{8, 14, 15}

Método yodométrico

Este método sirvió como base para el control de la cloración hasta aproximadamente 1913; y se basa en la capacidad oxidante del cloro residual libre y combinado para convertir el ion yoduro a yodo libre.^{7, 10, 11}

Las reacciones se representan en la siguiente forma:^{14, 15, 16, 17}



1. Cloro residual libre o combinado

Con el paso del tiempo se hizo importante hacer la diferenciación entre el cloro libre y el combinado. Actualmente se dispone de varios métodos, entre los más usados se encuentran: la titulación amperométrica y el DFD (N,N-dietil-p-fenilendiamina).^{8, 14, 15}

Método de titulación amperométrica

Los procedimientos de titulación oxidación-reducción fueron los primeros métodos utilizados para la medición del cloro residual libre o combinado. Un aparato usado para estas titulaciones es el titulador amperométrico, que se basa en los principios de polarografía, el cual dispone de un electrodo que indica el momento en que finalizan las reacciones de titulación de oxidación-reducción.^{8, 14, 15}

El óxido de fenilarsina (C_6H_5AsO) es el agente reductor que se usa normalmente como titulante. Reacciona de manera cuantitativa con el cloro residual libre, a valores de pH entre 6.5 y 7.5. A pH inferior a 6.0, las cloramidas se reducen cuando el ion yoduro está presente. Las cloramidas oxidan el yoduro a yodo; y el óxido de fenilarsina reduce el yodo, así que la cantidad de yodo reducido permite determinar la cantidad de cloroamidas presentes. El procedimiento de titulación amperométrica no está sujeto a interferencias de color ni turbiedad, lo que es una ventaja especial al medir cloro residual en algunas aguas residuales.^{8, 14, 15}

Método de N,N-dietil-p-fenilendiamina

El método de N,N-dietil-p-fenilendiamina (DFD), es similar al del método amperométrico. Cuando se añade DFD a una muestra que contiene cloro residual libre, ocurre una reacción instantánea que produce un color rojo. Si se le agrega a la muestra una pequeña cantidad de yoduro, la monocloramida reacciona produciendo yodo, que a su vez oxidan más DFD para formar color rojo adicional. La concentración de cloro libre o combinado se puede establecer por titulación con ion ferroso o directamente por análisis colorimétrico.^{8, 14, 15}

Los miembros del Comité Europeo de Normalización (CEN) son los organismos nacionales de normalización de países como: Alemania, Austria, Bélgica, Dinamarca, España, Finlandia, Francia, Grecia, Irlanda, Islandia, Italia, Portugal, Suecia, Suiza y Reino Unido. Dicho Comité obliga a sus miembros a determinar el cloro libre en el agua mediante el uso de la Norma Europea UNE-EN ISO 7393-1:2000, "Calidad del agua. Determinación de cloro libre y de cloro total. Método por valoración con N,N-dietil-p-fenilendiamina".¹⁸

Método analítico

El método analítico se refiere a la forma de realizar el análisis. Este debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. El desarrollo lógico de un método analítico transcurre en tres fases:¹⁹

1. Definición de las características y requerimientos que debe satisfacer el método analítico: precisión, exactitud, sensibilidad, selectividad, tiempo, bajo costo, entre otros.
2. Puesta del método analítico, desde los primeros estudios de tanteo con patrones hasta la utilización del método con muestras reales, pasando por la definición de los parámetros de idoneidad que garanticen el buen funcionamiento en el sistema de análisis.
3. Validación del método analítico, esta tercera etapa permite conocer la fiabilidad del método para su aplicación rutinaria y en combinación con las etapas anteriores, sus características de funcionamiento.

Validación de métodos de medida

Existen numerosas definiciones de validación que expresan la misma idea, consideremos dos de ellas:

“Se llama validación a la obtención de pruebas, convenientemente documentadas demostrativas de que un método de fabricación o control es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos”.¹⁹

De acuerdo con la guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados con los métodos analíticos adecuados a su propósito (EURACHEM 1998) “La validación es la adquisición de información que demuestre que el método establecido es adecuado para el fin requerido”.²⁰

La validación es necesaria porque proporciona un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico; además de cumplir con las exigencias legales. Es importante aclarar que es un proceso de investigación teórica y experimental, por lo que es necesario seguir los principios fundamentales del método científico en el que se establecen hipótesis y se realizan estudios para comprobarlas.²⁰ La figura 3 resume las fases que consta una validación.



Figura 3. Diagrama de flujo para las etapas que debe seguir una validación.¹⁹

De acuerdo con la Entidad Mexicana de Acreditación, la validación de los métodos de medida se establece en tres aplicaciones: validación de diseño, validación de prueba inicial de desempeño y control de calidad de resultados.²⁰

Validación de diseño

Esta aplica cuando se crea un nuevo método o se modifica uno ya aceptado y sirve para demostrar que cumple con los requisitos para los cuales fue diseñado. En esta etapa se definen las condiciones normalizadas de medición y puede incluir la forma de realizar la medida; establecimiento de controles instrumentales, ambientales, de las características de los objetos medidos, entre otros.²⁰

Validación de prueba inicial de desempeño

Es la validación que realiza un laboratorio cuando se implementa un método ya validado y sirve para asegurar que el comportamiento del método implementado por primera vez cumple con lo establecido.²⁰

Control de calidad de los resultados

Se realiza rutinariamente y permanentemente para demostrar que el método establecido en el laboratorio, en las condiciones normales de operación y aun conforme al tiempo, cumple con los requisitos establecidos en la validación de diseño.²⁰

Uno de los aspectos importantes en la validación de un método de medición consiste en establecer la responsabilidad, es decir; el personal que crea y diseña el método es el responsable de realizar la validación de diseño, mientras que el personal que realiza la medición es el responsable de hacer las pruebas iniciales de desempeño, así como las pruebas de control de calidad de los resultados.²⁰

La Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006/ISO/IEC 17025. “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración”, para la precisión y linealidad del método; establece que para los métodos propios o desarrollados por el laboratorio, ampliados o modificados debe mostrar evidencia objetiva de los ensayos que involucren mediciones analíticas de acuerdo a lo siguiente: límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, reproducibilidad, repetibilidad, sesgo o error, sensibilidad, selectividad y robustez.²⁰



Planteamiento del problema



Hasta la fecha, el cloro se usa como desinfectante del agua por ser económico y efectivo. Si bien la cloración puede reducir el riesgo de consumo de agua contaminada con microorganismos patógenos; es difícil determinar el nivel de riesgos que causa ésta a la salud humana, ya que los estudios epidemiológicos hasta ahora realizados no son suficientes para poder distinguir entre el peligro de contraer cáncer por la cloración versus el riesgo por enfermedades de origen hídrico.

La determinación de cloro libre puede hacerse mediante Kit de pruebas colorimétricas constituidos por juegos de reactivos con escalas de colores. Para este análisis hay muchos kits disponibles en el comercio, sin embargo la evaluación frecuente del parámetro implica un gasto económico recurrente.

La Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Campus II dentro del programa de servicio social clave 2009-12/48-1865, implementado en el Laboratorio de Microbiología Farmacéutica L-313, llevó a cabo de manera semanal durante el periodo comprendido del 5 de octubre de 2009 al 15 de abril de 2010, el análisis de parámetros fisicoquímicos a muestras de agua y uno de los parámetros que se determina es el de cloro libre. Para esta determinación se emplea un reactivo comercial, lo que implica un gasto constante en la adquisición de dicho insumo.

Es por esta razón, que se pretende realizar el protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina (DFD); y de esta forma reducir el gasto económico al sustituir el reactivo comercial ya mencionado por el reactivo de DFD.

La Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006/ISO/IEC 17025. "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración", establece, que si existe alguna modificación al método analítico entonces se debe validar.²¹ Pero desde el punto de vista de gestión antes de validar un método de medida se debe elaborar un protocolo de la validación y después validar el método.



Objetivo



General

Realizar el protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina (DFD).

Particulares

Establecer el método analítico que sustituya el reactivo comercial por el reactivo de DFD.

Determinar cloro residual libre empleando DFD en un rango de 0-2.25 ppm.

Realizar pruebas piloto a la técnica analítica desarrollada para determinar la linealidad, precisión, exactitud, repetibilidad y reproducibilidad del método.

Elaborar el protocolo de validación con base en la guía de validación de métodos analíticos emitida por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.²²



Hipótesis



Con el desarrollo de la técnica analítica para la determinación de cloro residual libre en agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina, se obtendrá un ahorro económico para el programa de servicio social así como contribuir a la disminución de desechos nocivos.

Por lo que se espera que la técnica analítica implementada sea fiable y reproducible con respecto al reactivo comercial y posteriormente realizar el protocolo de validación.



Método



Lugar donde se desarrolló

Laboratorio de Microbiología Farmacéutica L-313, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Campus II. Batalla 5 de mayo s/n, Colonia Ejército de Oriente CP. 09230, Delegación Iztapalapa; México Distrito Federal.

Calibración y calificación de los equipos

Se empleó una balanza analítica, METTLER, modelo H80, rango 0.0001 a 160 g y sensibilidad 0.1 mg. El cual fue calibrado de acuerdo al procedimiento para la calibración de instrumentos de pesar de bajo alcance de medición.²³

Espectrofotómetro, BAUSCH & LOMB, Spectronic 20. Se realizó la verificación de la calibración de espectrofotómetro de acuerdo al diagnóstico del funcionamiento de fotómetros.²⁴

Elección de la longitud de onda

Se estableció una longitud de onda de 525 nm, debido a que ésta longitud es la establecida en el procedimiento utilizado con el polvo comercial.

Preparación de disoluciones

Preparar estándares de trabajo de cloro a concentración de 0.75, 1.50 y 2.25 ppm con hipoclorito de sodio, de ALDRICH del 10- 15%.

Elaborar una disolución de sulfato de N,N-dietil-p-fenilendiamina (DFD), a una concentración de 0.005 M, de FLUKA.

Realizar una disolución tampón de fosfatos 0.5 M a pH 7.0, con Fosfato de sodio dibásico heptahidratado, de TÉCNICA QUÍMICA y fosfato de potasio monobásico, de J.T. BAKER.

Desarrollo del método analítico con



Esta técnica fue una modificación del método titulométrico de la DFD ferrosa del “Standard Methods for the examination of water and wastewater”.¹⁵

Con el fin de utilizar un patrón estándar de trabajo, primeramente se estandarizó el hipoclorito de sodio por dos métodos: 1) el método yodométrico²⁵ y 2) el método del DFD con disolución de sulfato ferroso amoniacal.²⁶

Una vez conocida la concentración del hipoclorito de sodio; se prepararon 100 mL de cada uno de los estándares de trabajo a tres niveles de concentración (0.75, 1.50 y 2.25 ppm). Cada nivel se preparó por quintuplicado durante tres días diferentes.

Se prepararon 100 mL de la disolución tampón de fosfatos y se mezcló con 50 mL de la disolución indicadora de DFD.

Se tomaron 10 mL de cada una de las concentraciones del estándar y se adicionó 1.5 mL de la mezcla de fosfatos y DFD.

Se verifico que el pH de la disolución antes preparada fuera de 7.0 y se procedió a leer inmediatamente en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 525 nm.

Las concentraciones de los estándares de trabajo, se determinaron comparando la absorbancia del estándar de trabajo para cada uno de los niveles de concentración con la absorbancia de un patrón estándar de cloro libre marca HANNA de 1 ppm (CERT93701-11-R0372/11).

Pruebas piloto

Con los estándares de trabajo a cada nivel de concentración se realizaron las pruebas piloto, para lo cual, se analizaron por quintuplicado en tres ocasiones cada uno de los niveles de concentración. En cada caso se evaluó la linealidad del sistema y del método, precisión (reproducibilidad y repetibilidad) y exactitud.

1. Linealidad

1.1 Sistema.

A cada nivel de concentración (0.75, 1.50 y 2.25 ppm) se le determinó la linealidad del sistema, cada muestra fue analizada por triplicado bajo las mismas condiciones. Utilizar el polvo comercial en lugar de la mezcla de buffer y DFD.

1.1.1 Precisión del sistema

Se analizó por triplicado la concentración de (0.75, 1.50 y 2.25 ppm) y se le determinó la precisión.

1.2 Método

Cada nivel de concentración fue analizado por quintuplicado, pero se empleó la mezcla de buffer y DFD.

Para la linealidad del sistema y método se determinó, la ecuación de la recta, el coeficiente de determinación y la precisión de cada nivel de concentración.

2. Precisión

2.1 Reproducibilidad

Un mismo analista realizó por triplicado los diferentes niveles de concentración (0.75, 1.50 y 2.25 ppm) y fueron analizados bajo las mismas condiciones durante tres días diferentes. Se determinó el coeficiente de variación de cada nivel.

2.2 Repetibilidad

Un mismo analista realizó en un día cinco repeticiones de cada nivel (0.75, 1.50 y 2.25 ppm). A cada nivel se determinó el coeficiente de variación.

3. Exactitud

De los resultados obtenidos en la repetibilidad y reproducibilidad se determinó la concentración promedio de cada nivel.

Resultados y análisis de resultados

Linealidad del sistema

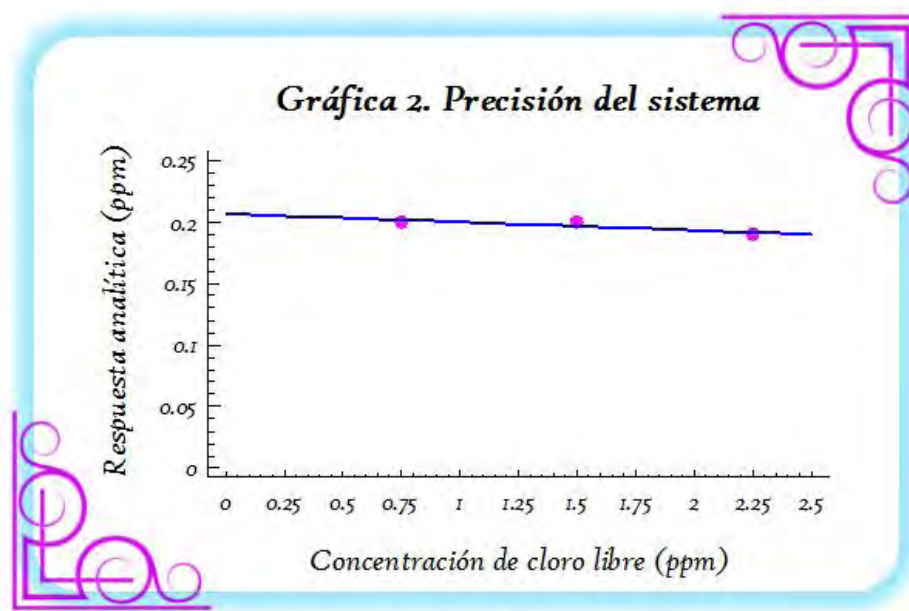


En el estudio de linealidad del sistema se analizaron por triplicado las concentraciones de 0.75, 1.50 y 2.25 ppm. Las cuales al ser evaluadas estadísticamente se obtiene como resultado un coeficiente de correlación de 0.9985 y r^2 de 0.9970%, mismo que es superior al 0.98% establecido por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (CNQFB). Lo cual demuestra una relación lineal entre la concentración de cloro libre (variable independiente) y la absorbancia (variable dependiente). Se observa en la gráfica 1 que el método tiene un comportamiento lineal de donde se obtiene $Y = mx + b$; con valores para la ordenada igual a 0.0166 y una pendiente de 0.1822.

Precisión del sistema

Tabla 1. Precisión del sistema (polvo comercial).

Concentración adicionada (ppm)	Media $\left(\frac{\text{Abs. Problema}}{\text{Conc. Adicionada}} \right) \pm$ Desviación estándar(ppm)	Coficiente de variación (CV %)
0.75	0.20 \pm 0.00	0.00
1.50	0.20 \pm 0.01	0.03
2.5	0.19 \pm 0.01	0.03



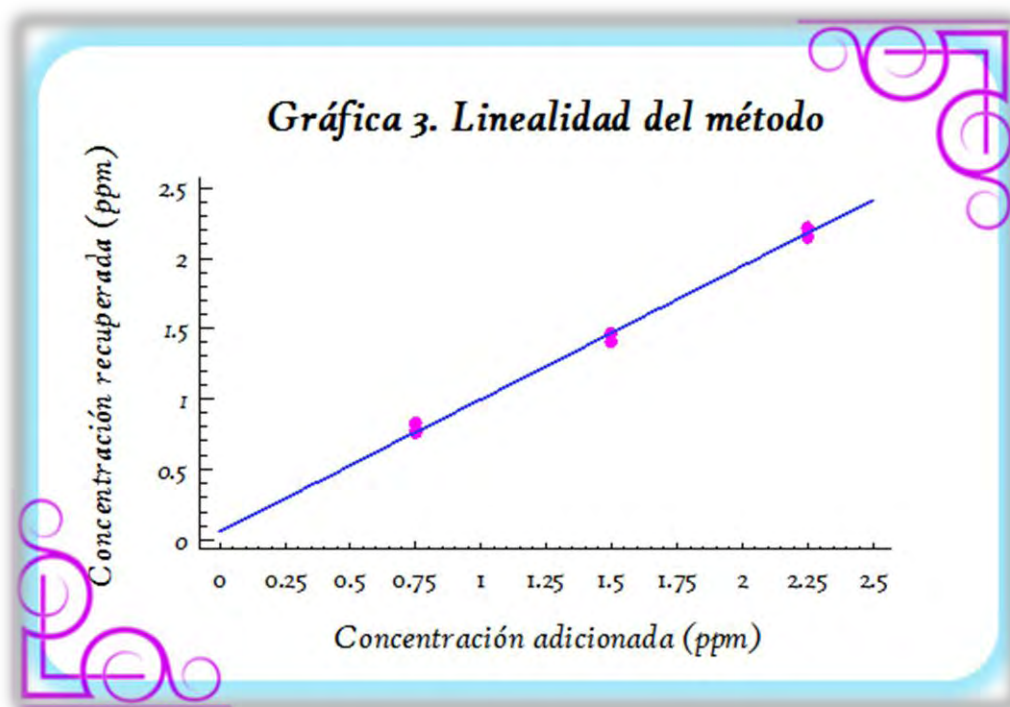
La precisión del sistema se determinó con el promedio de tres determinaciones de cada uno de los niveles de concentración (0.75, 1.50 y 2.25 ppm). En la tabla 1 se observa la concentración promedio de estos niveles, la desviación estándar y el coeficiente de variación. La precisión fue evaluada con el valor del coeficiente de variación como lo establece el CNQFB, la cual al ser menor del 1.5% se tiene un sistema preciso en el intervalo de concentración de 0.75 a 2.25 ppm de cloro libre.

La gráfica 2 muestra una línea recta para la precisión del sistema; de donde se obtiene la ecuación $Y = -0.0066x + 0.2066$ y un coeficiente de determinación de 0.9942. Estos resultados evidencian que el sistema es preciso. Lo que asegura que el espectrofotómetro se comportará de manera confiable al aplicar el método con DFD.

Linealidad del método

Tabla 2. Linealidad del método con DFD. Porcentaje de recuperación.

Concentración adicionada (ppm)	Media de la Concentración medida \pm Desviación estándar (ppm)	Coefficiente de variación CV (%)	Porcentaje de recuperación
0.75	0.77 \pm 0.00	0.58	102.49
1.50	1.44 \pm 0.00	0.31	97.06
2.25	2.19 \pm 0.01	0.25	97.32



El método analítico con DFD presentó linealidad en un intervalo de concentración de 0.75 a 2.25 ppm con un coeficiente de variación no mayor al 3% para cada una de los niveles de concentración (tabla 2) como lo establece el CNQFB. El porcentaje de recuperación oscila entre el 97 y el 103%.

En la gráfica 3 puede apreciarse la linealidad del método, con una ecuación $Y = 0.9426x + 0.0546$ y un coeficiente de determinación del 0.9986, al analizar muestras de hipoclorito de sodio de concentración establecida (0.75 a 2.25 ppm), lo cual indica que hay una respuesta directamente proporcional a la concentración de cloro libre presente en cada muestra problema.

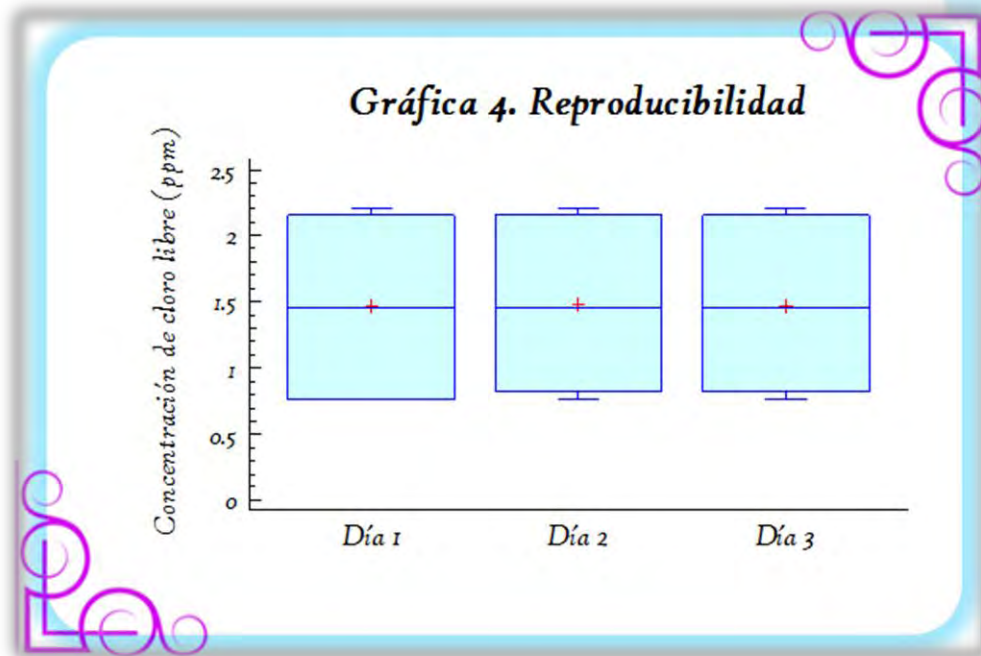
Precisión y exactitud

Tabla 3. Repetibilidad y exactitud para el método con DFD.

Método con DFD Intra-día (n=5 cada nivel)			
Concentración adicionada (ppm)	Media (Concentración medida ± Desviación estándar) ppm	Coefficiente de variación CV (%)	Exactitud (%)
0.75	0.77 ± 0.00	0.58	102.49
1.50	1.46 ± 0.00	0.00	97.06
2.25	2.19 ± 0.01	0.25	97.32

Tabla 4. Reproducibilidad y exactitud para el método con DFD.

Método con DFD Inter-día (3 días, n=3 cada nivel)			
Concentración adicionada (ppm)	Media (Concentración medida ± Desviación estándar) ppm	Coefficiente de variación CV (%)	Exactitud (%)
0.75	0.77 ± 0.00	0.57	102.67
1.50	1.46 ± 0.00	0.23	97.49
2.25	2.19 ± 0.01	0.24	97.20



La variabilidad del método (repetibilidad) con DFD se puede observar en la tabla 3, de donde el CV para los diferentes niveles de concentración es menor al 3%, la exactitud es de 102.49, 97.06 y 97.32 para las concentraciones de 0.75, 1.50 y 2.25 ppm respectivamente, mismos que cumplen con el intervalo de aceptación del 97-103%, establecido por el CNQFB.

En cuanto a la variabilidad entre días (reproducibilidad inter-días) se puede observar en la tabla 4 de igual manera, que el CV no sobrepasa el 3%, así mismo cumplen un intervalo de aceptación del 97-103% para la exactitud. Los valores encontrados en la reproducibilidad son muy homogéneos para los tres días (gráfica 4). El análisis de varianza muestra que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres días de análisis ($p = 0.9916$) con un nivel de confianza del 95%. Con estos resultados podemos decir que el método es reproducible y exacto.

Con base en los resultados obtenidos en las pruebas piloto para la determinación de cloro residual libre en agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina. Se puede decir, que el método desarrollado es lineal, exacto y preciso en un intervalo de 0.75 a 2.25 ppm de cloro libre, por lo que se sugiere implementar el siguiente protocolo de validación.



Laboratorio de Microbiología Farmacéutica
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en
agua con N,N-dietil-*p*-fenilendiamina

Emita: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

Página 1 de 15

Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en agua con N,N-dietil-*p*-fenilendiamina

Realizó	Revisó	Autorizó



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en
agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina

Emita: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

Índice

1. OBJETIVO 3

2. ALCANCE..... 3

3. RESPONSABILIDADES..... 3

4. DEFINICIONES..... 3

5. PRINCIPIO..... 4

6. REACTIVOS 4

7. MATERIAL E INSTRUMENTOS..... 5

8. PROCEDIMIENTO..... 5

9. VALIDACIÓN 6

10. REFERENCIAS..... 15

Realizó	Revisó	Autorizó



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en
agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina

Emite: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

1. OBJETIVO

Establecer el procedimiento a seguir en la validación del método analítico para la determinación de cloro libre en agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina.

2. ALCANCE

Este procedimiento se utilizará para la determinación de cloro libre en un rango de 0.75 a 2.25 ppm expresado como Cl₂.

3. RESPONSABILIDADES

La responsabilidad de aplicación y alcance de este procedimiento recae sobre todo el personal de servicio social o tesistas inscritos en el programa de análisis de agua.

4. DEFINICIONES

- ☞ **Cloro combinado:** la fracción de cloro total presente en forma de cloraminas y de cloraminas orgánicas.
- ☞ **Cloro libre:** cloro presente en forma de ácido hipocloroso, de ion hipoclorito o en forma de cloro elemental disuelto.
- ☞ **Exactitud:** es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado.
- ☞ **Límite de cuantificación:** es la cantidad más pequeña de un compuesto presente en una muestra que puede cuantificarse con la precisión y exactitud establecidas en el método y se expresa como concentración del analito.
- ☞ **Límite de detección:** el menor contenido que puede medirse con una certeza estadística razonable. La menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba.
- ☞ **Linealidad:** define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito.
- ☞ **Material de Referencia Certificado (MRC):** material o sustancia en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos, acompañado de un certificado en el cual se expresa los valores de la propiedad y cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel de confianza.

Realizó	Revisó	Autorizó



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en
agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina

Emite: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

- ☞ **Porcentaje de recuperación:** la fracción de analito adicionada a una muestra de prueba (muestra fortificada o adicionada); el porcentaje de recuperación (%R) entre las muestras fortificadas y sin fortificar se calcula como sigue:

$$\%R = [(CF - CU) / CA] \times 100$$

Dónde: CF es la concentración de analito medida en la muestra fortificada; CU es la concentración de analito medida en la muestra sin fortificar; CA es la concentración del analito adicionado (valor medido, no determinado por el método) en la muestra fortificada.

- ☞ **Precisión:** es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.
- ☞ **Repetibilidad:** precisión en condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados independientes de una prueba se obtienen con el mismo método, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo o dentro de intervalos de tiempo cortos.
- ☞ **Reproducibilidad:** precisión bajo condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en diferentes laboratorios, por diferentes operadores, usando diferentes equipos.
- ☞ **Validación:** confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

5. PRINCIPIO

El principio de este método se basa en la reacción instantánea entre el cloro libre presente en el agua con el N, N-dietil-p-fenilendiamina (DFD). En ausencia de iones yoduro, reacciona en su forma reducida para producir el DFD oxidado que es de color rojo.

6. REACTIVOS

Ácido sulfúrico (H₂SO₄), J.T. BAKER, No. CAS 7664-93-9.

EDTA sal disódica (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂*2H₂O), SIGMA, No. Catalogo 80333, No. CAS 6381-92-6.

Solución de hipoclorito de sodio (NaClO), ALDRICH 10-15%, No. Catalogo 425044, No. CAS 7681-52-9.

Sulfato de N, N-dietil-p-fenilendiamina (C₁₀H₁₆N₂*H₂SO₄), FLUKA, No. Catalogo 07672, No. CAS 6283-63-2.

Fosfato de sodio dibásico heptahidratado (Na₂HPO₄*7H₂O), TÉCNICA QUÍMICA.

Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), J.T. BAKER.

Polvo comercial para la determinación de cloro residual libre el cual contiene N,N-dietil-p-fenilendiamina.

Realizó	Revisó	Autorizó



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en
agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina

Emite: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

Agua destilada exenta de cloro.

Yoduro de potasio granular (KI), J.T. BAKER.

Ácido acético glacial (CH_3COOH), TÉCNICA QUÍMICA.

Almidón soluble, LABORATORIOS LAITZ.

Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), J.T. BAKER.

Patrón estándar de cloro, HANNA de 1 ppm.

7. MATERIAL E INSTRUMENTOS

7.1 Material de vidrio.

Matraces volumétricos de 25 ± 0.04 mL, 100 ± 0.08 mL y 200 ± 0.15 mL, BLAU BRAND.

Pipetas graduadas de 1 ± 0.020 mL de 1/10 mL, 5 ± 0.03 mL, BLAU BRAND y 10 ± 0.06 mL de 1/10.

Pipetas volumétricas de 1,2 y 3 mL, PYREX.

Bureta graduada de 25 ± 0.06 mL, subdivisión de 0.1 mL, KIMAX.

Matraces Erlenmeyer de 125 mL, PYREX.

Vasos de precipitados de 50,100 y 250 mL, PYREX.

7.2 Instrumentos

Balanza analítica, METTLER, modelo H80, rango 0.0001 a 160 g, sensibilidad 0.1 mg.

Espectrofotómetro, BAUSCH & LOMB, Spectronic 20.

8. PROCEDIMIENTO

8.1 Preparación de las disoluciones

a) **Solución tampón de fosfato 0.5 M a pH 7.**

Disuélvase 4.528 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 4.6 g de KH_2PO_4 anhidro y aforar a 100 mL con agua destilada. Protegerse de la luz y desechar cuando se observe turbidez, indicativo de crecimiento microbiano.

b) **Solución indicadora de N,N-dietil-p-fenilendiamina (DFD) 0.005 M.**

Disuélvase 0.0555 g de sulfato de N, N-dietil-p-fenilendiamina en agua destilada exenta de cloro que contenga 0.4 mL de H_2SO_4 1:3, y 10 mg de EDTA llevar al aforo a 50 mL, conservar en un frasco ámbar y deséchese cuando se decolore.

Realizó	Revisó	Autorizó



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en
agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina

Emite: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

- c) **Soluciones estándar de hipoclorito de sodio:** en primer lugar estandarizar el hipoclorito de sodio del modo siguiente: colocar 3 mL de NaClO al 10% en un matraz Erlenmeyer y diluir con 50 mL de agua destilada. Añádase alrededor de 0.64 g de KI y 5 mL de ácido acético. Titular, la disolución de hipoclorito de sodio con tiosulfato de sodio al 0.1 N, cuando se observa el color ámbar se agregan 2 mL de almidón al 10%. Estas muestras se protegen de la luz y se preparan el mismo día de análisis. Se calcula el porcentaje de NaClO con la siguiente ecuación:

$$\% \text{NaClO} = \frac{\text{mL} \times N \times \left(\frac{\text{NaClO}}{2000} \right) \times 100}{\text{muestra en peso}}$$

Después de conocer la concentración del NaClO, preparar una disolución de 100 ppm de hipoclorito de sodio. A partir de esta disolución (100 ppm) se preparan cuatro niveles de concentración de cloro en un rango de 0.75 a 2.25 ppm, estas disoluciones son las soluciones patrón de cloro o estándar de trabajo.

9. VALIDACIÓN

9.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Método

- Analizar por sextuplicado los niveles de concentración 0.75, 1.00, 1.50 y 2.25 ppm del hipoclorito de sodio (NaClO).
- En un tubo de 15x180 mm (perfectamente lavados y secos), adicionar 10 mL de cada uno de los niveles de concentración de hipoclorito de sodio.
- Posteriormente a cada uno de los estándares, añadir un sobre del polvo comercial, agitar y leer inmediatamente en el espectrofotómetro a una $\lambda=525$ nm y utilizar un blanco de agua destilada.

Realizó	Revisó	Autorizó



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en
agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina

Emite: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

CV
≤ 1.5%

FÓRMULAS

Media aritmética	Desviación estándar	Coefficiente de variación
$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$	$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$	$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$

n= número de mediciones.

9.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Método

- a) Analizar por triplicado las soluciones de concentraciones 0.75, 1.00, 1.50 y 2.25 ppm de NaClO conforme a la precisión del sistema.
- b) Calcular el valor de la pendiente (**b₁**), la ordenada en el origen (**b₀**), el coeficiente de determinación (**r²**) y el intervalo de confianza para la pendiente poblacional (**IC (β₁)**).

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

r ²	IC(β ₁)
≥ 0.98	≠ 0

Realizó	Revisó	Autorizó



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina

Emite: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

FÓRMULAS

Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de determinación	Intervalo de confianza para la pendiente
$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$ <p>n = número de mediciones (concentración – respuesta analítica).</p>	$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$	$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} Sb_1$ $Sb_1 = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$ $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 1}}$

9.3. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Método

- Se mezclan los 100 mL de la solución tampón de fosfatos y los 50 mL de la solución indicadora de DFD. El orden de la adición de los reactivos no debe ser modificado.
- Posteriormente en tubos de 15x180 mm (perfectamente lavados y secos), adicionar 10 mL de cada uno de los niveles de concentración de hipoclorito de sodio.
- Después a cada uno de los estándares añadir 1.5 mL de la mezcla de fosfatos con DFD y agitar.
- Leer inmediatamente en el espectrofotómetro a una $\lambda=525$ nm y utilizar un blanco de agua destilada.
- Analizar por sextuplicado cada uno de los diferentes niveles de concentración de NaClO.
- La concentración de los diferentes niveles, se determina mediante la absorbancia del patrón estándar de cloro libre de 1 ppm con la siguiente ecuación:

$$(\text{Absorbancia}_1 \text{ Concentración}_1) = (\text{Absorbancia}_2 \text{ Concentración}_2)$$

Dónde:

Absorbancia₁ = absorbancia del patrón estándar de cloro libre marca HANNA.

Concentración₁ = concentración del patrón estándar de cloro libre marca HANNA.

Absorbancia₂ = absorbancia de la solución estándar problema.

Realizó	Revisó	Autorizó



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina

Emite: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

IC(μ)	CV
97-103%	$\leq 3\%$

FÓRMULAS

Media aritmética	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza
$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$	$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$	$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$	$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975,n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$

9.4. LINEALIDAD DEL MÉTODO

Método

- Proceder conforme a los puntos 9.3a, b, c, d, e y f.
- Con los resultados obtenidos de la comparación del estándar, graficar la concentración adicionada contra la concentración recuperada, determinar la ecuación de la recta, el coeficiente de determinación y la precisión de cada nivel de concentración.
- Calcular el porcentaje de recobro, el promedio aritmético (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional IC (μ) del porcentaje de recobro.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

IC	CV
97-103%	$\leq 3\%$

Realizó	Revisó	Autorizó



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina

Emite: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

FÓRMULAS

Media aritmética	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza
$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$	$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$	$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$	$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975,n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$

9.5. PRECISIÓN DEL MÉTODO (PRECISIÓN INTERMEDIA O TOLERANCIA INTERMEDIA/ANALISTA).

Método

- Proceder conforme a los puntos 9.3a, b, c, d, e y f.
- Calcular el porcentaje de recobro, el promedio aritmético (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional IC (μ) del porcentaje de recobro.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

IC	CV
97-103%	$\leq 3\%$

FÓRMULAS

Media aritmética	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza
$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$	$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$	$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$	$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975,n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$

Realizó	Revisó	Autorizó



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en
agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina

Emite: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

9.6. REPETIBILIDAD

Método

- Proceder conforme a los puntos 9.3a, b, c, d y e.
- Realizar diez repeticiones de cada uno de los niveles de concentración, el mismo día, por un mismo analista, y mismo equipo.
- Determinar el coeficiente de variación (CV) de cada nivel.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

CV
≤ 3%

FÓRMULAS

Media aritmética	Desviación estándar	Coefficiente de variación
$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$	$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$	$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$

9.7. REPRODUCIBILIDAD

Método

- Proceder conforme a los puntos 9.3a, b, c, d y e.
- Realizar diez repeticiones de cada uno de los niveles de concentración, en tres días diferentes bajo las mismas condiciones de trabajo.
- Determinar el coeficiente de variación (CV) de cada nivel.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

CV
≤ 3%

Realizó	Revisó	Autorizó



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en
agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina

Emite: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

FÓRMULAS

Media aritmética	Desviación estándar	Coefficiente de variación
$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$	$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$	$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$

9.8. LÍMITE DE DETECCIÓN

Método

- Preparar tres niveles de concentración de cloro libre (0.25, 0.50 y 0.75 ppm) y tres blancos de reactivo.
- Proceder conforme a los puntos 9.3a, b, c y d.
- Medir las respuestas analíticas y calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Para cada uno de los blancos, calcular la desviación estándar de los mismos.
- Calcular el coeficiente de detección con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1}$$

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

r^2	$IC(\beta_1)$	LD
≥ 0.98	$\neq 0$	\leq especificación

Realizó	Revisó	Autorizó



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina

Emite: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

FÓRMULAS

Pendiente	Coefficiente de determinación	Intervalo de confianza para la pendiente
$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$ <p>n = número de mediciones (concentración – respuesta analítica).</p>	$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S b_1$ $S b_1 = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$ $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$ $b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$ $LD = \frac{3.3 X S_{y/x}}{b_1}$

9.9. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Método

- Preparar tres niveles de concentración de cloro libre (0.25, 0.5 y 0.75 ppm) y tres blancos de reactivo.
- Proceder conforme a los puntos 9.3a, b, c y d.
- Medir las respuestas analíticas y calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Para cada uno de los blancos, calcular la desviación estándar de los mismos.
- Calcular el coeficiente de detección con la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10 X S_{y/x}}{b_1}$$

Realizó	Revisó	Autorizó



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en
 agua con N,N-dietil-*p*-fenilendiamina

Emite: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

r^2	IC (β_1)	LC
≥ 0.98	$\neq 0$	\leq especificación

FÓRMULAS

Pendiente	Coefficiente de determinación	Intervalo de confianza para la pendiente
$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$ <p>n = número de mediciones (concentración – respuesta analítica).</p>	$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} Sb_1$ $Sb_1 = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$ $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$ $b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$ $LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$

Realizó	Revisó	Autorizó



Protocolo de validación para la determinación de cloro residual libre en
agua con N,N-dietil-p-fenilendiamina

Emite: Laboratorio de Microbiología Farmacéutica

10. REFERENCIAS

1. EURACHEM Guides The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1998; [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.eurachem.org>. Consultado el 7 de Septiembre de 2011.
2. Diario Oficial de la Federación. Norma Mexicana NMX-AA-108-SCFI-2001. Calidad del agua. Determinación de cloro libre y cloro total. 13 de Agosto de 2001.
3. APHA, AWWA, WPCF. Métodos normalizados para el análisis de agua potable y residual. 17ª Ed. Madrid: Díaz de Santos; 1989.
4. Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. A.C. (2002).
5. Diario Oficial de la Federación. Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006, ISO/IEC 17025:2005, ISO/ IEC 17025:2005/Cor1:2006, COPANT-ISO/ IEC 17025:2005 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

Realizó	Revisó	Autorizó



Conclusiones



Con base en las pruebas piloto realizadas se puede decir que: el método analítico desarrollado para sustituir el polvo comercial con N,N-dietil-p-fenilendiamina (DFD) es adecuado para la cuantificación de cloro libre en agua por espectrofotometría; ya que, el método cumplió con los requisitos establecidos por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Por tanto esta técnica analítica se puede validar.

El método analítico presentó linealidad, exactitud y precisión en un intervalo de 0.75 a 2.25 ppm de cloro libre.

El reactivo DFD a una concentración de 0.005 M, puede sustituir al reactivo comercial.

El método con DFD para la determinación de cloro libre es sencillo, rápido, económico y solo requiere de 10 mL de muestra en el análisis. Esta última ventaja puede contribuir a reducir la contaminación de desechos.

Se recomienda, que para llevar a cabo la validación, se amplíen los niveles de concentración, pero solo dentro del intervalo ya mencionado (0.75 a 2.25 ppm), ya que, el método en concentraciones superiores a las evaluadas (2.25 ppm); presenta un "desvanecimiento del color en la disolución" debida a la formación de iminas inestables; lo que conlleva a una subvaluación de la concentración de cloro libre.

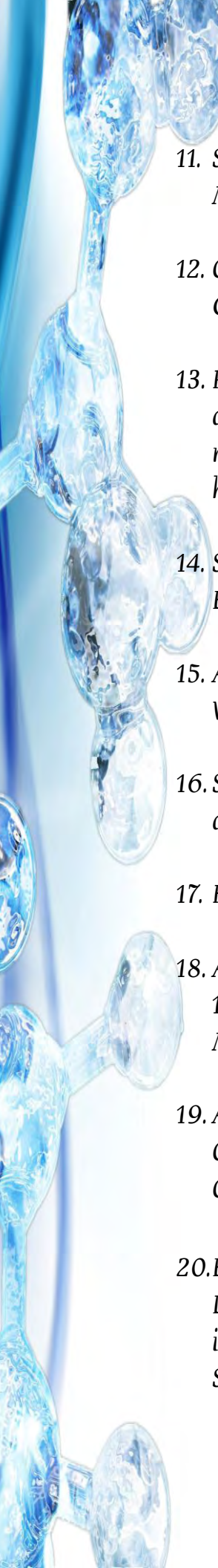
Si se tiene la necesidad de analizar concentraciones superiores a las recomendadas (0.75 a 2.25 ppm), entonces realizar diluciones de las muestras para obtener resultados confiables (exactos y precisos).



Referencias




1. *Walter J, Weber JR. Control de calidad del agua. Procesos fisicoquímicos. Barcelona: Reverte; 1979.*
2. *Romero RA. Calidad del agua. 2ª Ed. México: Alfaomega; 1999.*
3. *Spellman FR, Drinan J. Manual del agua potable. España: Acribia; 2004.*
4. *Gray NF. Calidad del agua potable. Problemas y soluciones. España: Acribia; 1994.*
5. *Tebbutt TH. Fundamentos de control de calidad del agua. México: Limusa; 2007.*
6. *Maskew FG, Charles GJ. Ingeniería sanitaria y de aguas residuales. Volumen II. Purificación de aguas y tratamiento y remoción de aguas residuales. México: Limusa; 2008.*
7. *Guimaraes JR, Ibáñez J, Litter MI, Pizarro R. Desinfección del agua. [en línea]. Disponible en: <http://www.psa.es>. Consultado el 26 de Mayo de 2011.*
8. *Rodier L. Análisis de agua. Barcelona: Omega; 1990.*
9. *Hardenbergh WA, Rodie EB. Ingeniería sanitaria. 8ª Ed. México: Continental; 1984.*
10. *Biblioteca Virtual de Desarrollo Sostenible y Salud Ambiental. Cloro. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.bvsde.ops-oms.org>. Consultado el 26 de Mayo de 2011.*

- 
11. Sans FR, Ribas JP. *Ingeniería ambiental. Contaminación y tratamientos*. México: Alfaomega; 1999.
 12. Custodio E, Ramón M. *Hidrología subterránea*. 2ª Ed. Tomo I. Barcelona: Omega; 1996.
 13. Rodríguez MJ, Rodríguez G, Serodes J, Sadiq R. Subproductos de la desinfección del agua potable: formación, aspectos sanitarios y reglamentación. *INTERCIENCIA*. 2007; 32: 749-756. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx>. Consultado el 26 de Mayo de 2011.
 14. Sawyer CN, McCarty PL, Parkin GF. *Química para ingeniería ambiental*. 4ª Ed. Colombia: McGraw Hill; 2001.
 15. APHA, AWWA, WPCF. *Standard Methods for the Examination of Water of Wastewater*. 18ª Ed. USA: Joint Board; 1992.
 16. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Fundamentos de química analítica*. 8ª Ed. México: International Thomson; 2005.
 17. Harris DC. *Análisis químico cuantitativo*. 3ª Ed. España: Reverté; 2007.
 18. Asociación Española de Normalización y Certificación. UNE-EN ISO 7393-1. *Calidad del agua. Determinación de cloro libre y de cloro total. Parte 1: Método por valoración con N,N-dietil-1,4-fenilendiamina*. Septiembre 2000.
 19. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Sección Catalana, Comisión de Buenas Prácticas de Fabricación y Control de Calidad. *Validación de Métodos Analíticos*. Madrid, 1996.
 20. EURACHEM *Guides The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 1998; [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.eurachem.org>. Consultado el 7 de Septiembre de 2011.

21. *Diario Oficial de la Federación. Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006, ISO/IEC 17025:2005, ISO/ IEC 17025: 2005/Corr: 2006, COPANT-ISO/ IEC 17025:2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.*
22. *Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. A.C. (2002).*
23. *García OA. Procedimiento para la calibración de instrumentos de pesar de bajo alcance de medición. SINALP QUÍMICA. 1994; 1 (2): 14-17.*
24. *Alva S, Benito MC, Cabaña E, Pizano F. Programa de evaluación de la calidad entre laboratorios. Diagnóstico del funcionamiento de fotómetros. Laborat-acta. 1991; 3 (2): 17-19.*
25. *Jenkins LLG, Knevel MA, DiGangi EF. Jenkins' Quantitative Pharmaceutical Chemistry 7th Ed. USA: McGraw-Hill; 1977.*
26. *Fernández-Crehuet NM, Moreno AO y Pérez LJ. Determinación de cloro residual. Método del DPD. Higiene y Sanidad Ambiental. 2001, 1: 6-7.*
27. *Comisión Nacional del Agua. Situación del Subsector Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento. Edición 2009. [en línea]. Disponible en: <http://www.conagua.gob.mx>. Consultado el 22 de junio de 2012.*
28. *Meléndez I, Zuleta M, Marín I, Calle J, Salazar D. Actividad mutagénica de aguas de consumo humano antes y después de clorar en la planta de Villa Hermosa, Medellín. ATREIA. 2001; 14 (3): 167-175.*
29. *Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-2000. Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites*

permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Secretaría de Salud. 22 de noviembre de 2000.

30. Camargo GI, Mariscal UK. Escasez de agua: en busca de soluciones normativas. *Economía Informa*. 2012; 374: 54-62 [en línea]. Disponible en: <http://www.economia.unam.mx>. Consultado el 22 de junio de 2012.
31. González VG. ¿Por qué preocuparnos por el tema del agua, y cuánto sabemos acerca de él? *Revista de Posgrado*. 2010; 5 (12): 22-26. [en línea]. Disponible en: <http://www.revistas.unam.mx>. Consultado el 22 de junio de 2012.
32. White GC. *Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants*, 5th Ed. USA: John Wiley & Sons; 2010.
33. Harp DL. *Current Technology of Chlorine Analysis for Water and Wastewater*. Technical Information. 2002, 17: 2-20. [en línea]. Disponible en: <http://www.hach.com>. Consultado el 22 de junio de 2012.
34. Guerrero M. *El Agua*. México: Fondo de Cultura Económica; 1998.
35. Catalán LJ. *Química del agua*. España: Blume; 1969.
36. Marín RG. *Fisicoquímica y Microbiología de los medios acuáticos: tratamiento y control de calidad de aguas*. Madrid: Díaz de Santos; 2003.
37. Organización Mundial de la Salud. *Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF). Segunda parte: Validación*. 1998.
38. *Guidance for industry. Analytical Procedures and Methods Validation. Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation*. August 2000. [en línea]. Disponible en: <http://www.labcompliance.de>. Consultado el 17 de mayo de 2012.



39. *Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*. November 1996. [en línea]. Disponible en: <http://www.fda.gov>. Consultado el 17 de mayo de 2012.

40. *Diario Oficial de la Federación*. Norma Mexicana NMX-AA-108-SCFI-2001. *Calidad del agua determinación de cloro libre y cloro total método de prueba*. 13 de Agosto de 2001.

41. *Diario Oficial de la Federación*. Norma Mexicana NMX-AA-116-SCFI-2001. *Análisis de agua-guía de solicitud para la presentación de métodos alternos*. 17 de abril de 2001.



TSUKINOUSAGI