

*Validación de un método espectrofotométrico
para la determinación de hierro en muestras
de agua procedentes de torres de
refrigeración y condensadores.*

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Por: Xavier Jiménez Herraiz

Dirigido por el Dr. Antonio Rodríguez Fortea

Grado de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

07/06/2017

Índice

ABSTRACT	4
1. OBJETIVO	5
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1. Elecnor S.A.	6
2.2. Torres de refrigeración y condensadores	6
2.2.1. Condensadores	7
2.2.2. Torres de refrigeración	7
2.3. Legislación y Normativa	7
2.3.1. Real Decreto 865/2003	7
2.3.2. UNE-EN ISO/IEC 17025:2005	8
3. FUNDAMENTO TEÓRICO	9
3.1. Instrumentación	9
3.2. Plan de Validación	10
3.2.1. Analito	11
3.2.2. Rango de concentraciones y especificaciones	12
3.2.3. Matriz	12
3.3. Criterios de Validación	12
3.3.1. Selectividad	13
3.3.2. Límite de detección y cuantificación	14
3.3.3. Linealidad	15
3.3.4. Exactitud	16
3.3.4.1. Veracidad	16
3.3.4.2. Precisión	17

3.3.5. Robustez	18
3.3.6. Incertidumbre	19
4. PARTE EXPERIMENTAL	21
4.1. Reactivos	21
4.1.1. FerroVer®	21
4.1.2. Solución patrón certificada de hierro	21
4.2. Equipo	22
4.3. Material	22
4.4. Procedimiento del método de análisis	22
4.5. Validación	23
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
5.1. Selectividad	26
5.2. Límites de detección y cuantificación	27
5.3. Linealidad	27
5.4. Exactitud	28
5.4.1. Repetibilidad	28
5.4.2. Precisión intermedia i veracidad	28
5.5. Robustez	30
5.6. Incertidumbre	31
6. CONCLUSIONES	32
7. REFERENCIAS	33

ABSTRACT

A study of validation statistical parameters for an iron determination method in water samples of cooling towers and evaporative condensates, using UV/Vis spectrophotometry, routinely used in the Laboratory of Elecnor S.A. in Tarragona, is performed. The operation of cooling towers and the legislation, which is subject to the iron determination in these types of samples, is briefly described.

Theoretical principle of spectrophotometry is explained and operation and general parts of a UV/Vis spectrophotometer are given. Analyte, matrix types and validation criteria are described, establishing acceptability ranges before the experimentation. Linearity, selectivity, repeatability, intermediate precision, trueness and robustness are studied; detection and quantification limits are calculated and the uncertainty is estimated.

Tests are performed using surrogate samples with a certified standard, calculating the recoveries. In this way, we take into account a possible matrix effect on the analyte determination. Selectivity of the method is demonstrated by observing the UV/Vis absorption spectra of the reactant and indicator product, with maximum absorption wavelengths sufficiently separated. A possible chemical interferences are indicated, which we consider when working with surrogate samples calculating the recoveries. A good linearity in the selected work range, as well as, limits of detection and quantification more than enough for our purpose, are determined. Precision and trueness of the method satisfy the pre-established acceptance criteria, finding better precisions in the high concentration range. Method robustness is studied by introducing changes in the stipulated reaction time, not finding significant differences by performing an F-test and a t-test. The uncertainty estimation also satisfies the preset requirements, finding a higher uncertainty for the low concentration range.

1. OBJETIVO

Los objetivos marcados y que se pretenden conseguir en este proyecto son:

- Demostrar que el método espectrofotométrico empleado para la determinación de la concentración de hierro en muestras de agua procedentes de torres de refrigeración y condensadores, es válido para este propósito dentro de nuestro rango de trabajo.
- Calcular la incertidumbre asociada al método en cada nivel de concentraciones estudiado.
- Trabajar según los requerimientos de la UNE-EN ISO/IEC 17025 para la futura acreditación del método en el laboratorio de Elecnor, siguiendo las pautas marcadas por sus Procedimientos Normalizados de Trabajo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ELECNOR S.A.

Elecnor S.A., en su origen Electrificaciones del Norte, es una empresa española de ingeniería que se constituyó en Bilbao en 1958 por un grupo de empresarios, que después de 50 años aun siguen siendo sus mayores accionistas. Elecnor se organiza en torno a dos grandes áreas de negocio: Infraestructuras y Patrimonial. El área de infraestructuras lleva a cabo proyectos de electricidad, generación de energía, telecomunicaciones, instalaciones, gas, construcción, mantenimiento, medio ambiente, ferrocarriles y espacio. El área patrimonial se centra en la participación de la empresa como promotor, inversor y operador en el sector de las energías renovables, de transporte de gas, del medio ambiente y de sistemas satelitales. En la actualidad Elecnor es una de las principales corporaciones globales internacionales en su sector.

Dentro de esta expansión, la empresa se ha introducido en el sector industrial, ofreciendo a sus clientes el control analítico necesario para el correcto mantenimiento de sus instalaciones. Siguiendo este crecimiento, el pasado mes de Julio de 2016, Elecnor inició su actividad como laboratorio en Tarragona a través de su cliente Nalco Champion, analizando diariamente muestras de agua procedentes de torres de refrigeración, condensadores, calderas, plantas de tratamiento de aguas y de distintos sistemas de proceso llevados a cabo en la industria química y petrolífera.

Elecnor S.A. dispone desde 1995 de un Sistema de Calidad certificado por AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación) de acuerdo con la norma UNE-EN ISO 9001 y siguiendo con la intención de mejorar la satisfacción con el cliente, en el laboratorio de Tarragona se pretenden validar distintos métodos analíticos para una posible futura acreditación de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 de algunos de ellos. Uno de los métodos a validar y el que tratamos en este proyecto dada su importancia, es el de la determinación de hierro en aguas de torres de refrigeración y condensadores. Un alto contenido de hierro en este tipo de agua puede ser indicativo de la presencia de corrosión o incrustaciones en el sistema, además de ensuciamiento microbiano, lo que haría disminuir la eficacia y rendimiento de los equipos de refrigeración, ocasionando pérdidas de energía y reducción de la transferencia de calor, pudiendo resultar en paradas de planta.

2.2. TORRES DE REFRIGERACIÓN Y CONDENSADORES

La mayor parte de las industrias utilizan agua como medio de refrigeración, dada su disponibilidad y su elevado calor específico. El agua que circula tiene como objetivo refrigerar los diferentes equipos, que por necesidades de proceso así lo requieren, por transferencia de calor.

La transferencia de calor consiste en el intercambio de calor entre dos corrientes, la más caliente es la fuente y la más fría es el receptor. La fuente no entra en contacto directo con el receptor, sino que la

transferencia de calor se realiza a través de una superficie metálica conductora. Los equipos en los que se lleva a cabo esta transferencia se denominan intercambiadores de calor y, más concretamente, los equipos en los que el intercambio conlleva un cambio de estado de la corriente a enfriar se denominan condensadores.

2.2.1. Condensadores

El condensador es uno de los intercambiadores más utilizados en la industria. Estos intercambiadores están constituidos por un haz tubular por el que normalmente circula el fluido caliente, en forma de vapor, y una carcasa por la que circula el agua fría, procedente de la torre de refrigeración. Al entrar las dos corrientes en contacto a través del metal, se produce el intercambio de calor, haciendo que la corriente caliente se enfríe y se condense.

2.2.2. Torres de refrigeración

En la torre de refrigeración el agua caliente llega por la parte superior a través de un sistema distribuidor. Este sistema, dispone de unas boquillas que dispersan el agua sobre unos bloques de relleno, permitiendo así aumentar la superficie de contacto con el aire y conseguir reducir más rápidamente su temperatura. El agua pasa a través del relleno y cae en forma de lluvia a la balsa de recogida inferior, desde donde es bombeada de nuevo al circuito.

Existen varios tipos de torres de refrigeración siendo el más utilizado en la industria el de tiro inducido. En estas torres el enfriamiento se realiza por contacto a contracorriente de aire, que es inducido por un ventilador situado en la parte superior de la torre, con el agua que circula por el relleno. El principio básico de operación es la eliminación del calor del agua a través de la evaporación de una parte del caudal recirculado, evacuando el calor latente obtenido de la corriente de agua. En menor medida, también es debido a la transferencia de calor desde el agua al aire. En otras palabras, una pequeña cantidad de agua se evapora para enfriar el resto y el aire sirve como vehículo al agua que se evapora para salir del sistema.¹

2.3. LEGISLACIÓN Y NORMATIVA

2.3.1. Real Decreto 865/2003

Dadas las condiciones de temperatura y humedad que existen en las torres de refrigeración, cabe la posibilidad de que proliferen bacterias tales como la *Legionella*, por lo que se hace necesario adoptar medidas legislando los controles higiénico-sanitarios. El Real Decreto 865/2003 establece los criterios para la prevención y control de la legionelosis, incluyendo especificaciones en los parámetros indicadores de la calidad del agua en torres de refrigeración y condensadores, entre ellos el hierro. La empresa, ha de regir sus especificaciones y controles a partir de este documento legislativo.²

2.3.2. UNE-EN ISO/IEC 17025:2005

Con la finalidad de promover el aseguramiento de la calidad en los laboratorios de la Unión Europea, la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 establece los requisitos generales relativos a la competencia técnica de los laboratorios de ensayo y calibración que ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) utiliza como criterios para la acreditación. La finalidad de esta normativa es que todos los laboratorios acaben teniendo una misma forma de trabajar con eficacia i calidad a nivel global, demostrando la veracidad y trazabilidad de sus resultados, trabajando para una mejora continua.³

Esta acreditación aportará entonces confianza tanto en la competencia y experiencia técnica del laboratorio en la emisión de resultados fiables, como en su capacidad de ofrecer un servicio adecuado a las necesidades de los clientes.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1. INSTRUMENTACIÓN

La instrumentación utilizada en nuestro método consta de un espectrofotómetro de ultravioleta-visible, pero antes de explicar cómo funciona este equipo, es necesario hacer un pequeño inciso en qué es la espectrofotometría.

La espectrofotometría UV-Visible ofrece la relación entre el poder de radiación y una longitud de onda (λ) espectral comprendida entre 190 y 800 nm, midiendo la intensidad de la luz cuando un haz luminoso pasa a través de la muestra, de manera que ésta absorbe parte de la radiación incidente en este espectro y promueve la transición de los electrones de valencia hacia un estado excitado, transmitiendo un haz de menor energía radiante en la salida. Esta transición ocurre desde orbitales ocupados por electrones hacia un orbital vacío y dependiendo del tipo de transición variarán las diferencias de energías. De esta forma el detector medirá la transmitancia (T), que es la relación entre la intensidad incidente (I_0) y la que resta después de pasar a través de la muestra (I). A partir de la transmitancia se define la absorbancia (A) que se puede relacionar con la constante de absortividad (a), con la distancia que recorre la luz (d) y la concentración del analito a partir de la ley de Lambert-Beer:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Ecuación 1: transmitancia.

$$A = \log \frac{1}{T}$$

Ecuación 2: absorbancia.

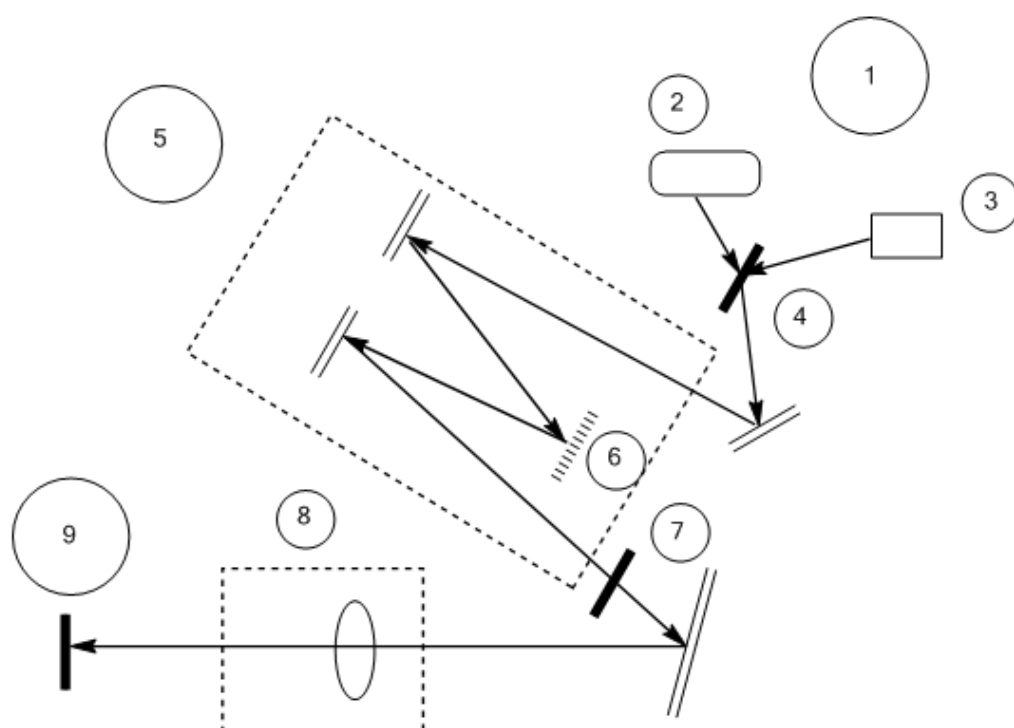
$$A = a \cdot b \cdot c$$

Ecuación 3: ley de Lambert-Beer.

Esta técnica se basa en que cada sustancia absorbe o transmite luz sobre un cierto rango de longitudes de onda, pues la energía debe coincidir exactamente con la energía necesaria para la transición electrónica de un nivel cuántico a otro en la especie molecular considerada. En otras palabras, la energía necesaria para la transición electrónica es distinta para cada sustancia, lo que hará que la longitud de onda absorbida sea distinta y característica. El hecho de que la λ se encuentre en el rango del UV-Visible es lo que hace que la sustancia tenga color dependiendo de ésta, pues absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que incide sobre ellas dejando pasar a nuestros ojos las complementarias, es decir, aquellas no absorbidas.

El espectrofotómetro entonces, es un instrumento que nos permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto y una solución de referencia.⁴

La **Figura 1** muestra como ejemplo el esquema general de nuestro espectrofotómetro UV/Vis. Éste está constituido por una fuente de radiación que emite el haz de luz y que consta de dos lámparas: una de deuterio que produce la luz en el espectro ultravioleta (190 a 360 nm) y otra halógena para el espectro visible (320 a 1100 nm). El haz producido, será reflejado por un espejo que actuará de selector de lámpara, según sea la región de trabajo y que dirigirá el haz hacia el monocromador. El monocromador consta de distintos espejos y de una rejilla, la cual servirá de filtro para seleccionar una longitud de onda determinada. De esta manera el haz de luz pasa a través del elemento de referencia y se dirige hacia la cubeta que contiene la muestra, a una longitud de onda determinada, llegando al sistema de detección, el cual amplificará y transformará la señal producida en un valor de absorbancia, transmitancia o concentración en el display.⁵



1 Fuente de radiación	6 Rejilla
2 Lámpara de deuterio	7 Sistema de referencia
3 Lámpara halógena	8 Cubeta de medición
4 Selector de lámpara	9 Sistema de medición
5 Monocromador	

Figura 1: esquema general espectrofotómetro UV/Vis.

3.2. PLAN DE VALIDACIÓN

“La validación 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”. Antes de llevar a cabo la experimentación, para iniciar la validación, tenemos que definir el analito, el rango de concentraciones y

la matriz. También es necesario establecer previamente los requisitos a cumplir para la aceptación de cada parámetro de estudio.³

3.2.1. Analito

El analito a determinar es el hierro total en forma de Fe^{+2} utilizando el reactivo Ferrover® de HACH. Este reactivo cuenta con agentes reductores y mejoradores de la solubilidad del hierro en solución acuosa, por lo que son capaces de reaccionar con todo el hierro soluble y con la mayor parte de sus formas insolubles presentes en la muestra, para producir hierro ferroso (Fe^{+2}) soluble. Estos agentes son el ditionito y metabisulfito de sodio. El ditionito de sodio se disuelve con facilidad en agua y cuando esto sucede, se disocia en bisulfito sódico y bisulfato sódico. El bisulfito hará que el Fe^{+3} presente en la muestra se reduzca a Fe^{+2} (**Figura 2**).



Figura 2: Reacción de reducción del hierro con ditionito de sodio.

El metabisulfito de sodio también se disuelve fácilmente en agua, disociándose en bisulfito sódico. Durante el proceso, se libera una pequeña cantidad de dióxido de azufre que se combinará con el agua para crear ácido sulfuroso. El bisulfito de sodio ahora reaccionará con el Fe^{+3} insoluble, del óxido de hierro, y lo reducirá a Fe^{+2} soluble. (**Figura 3**).⁶

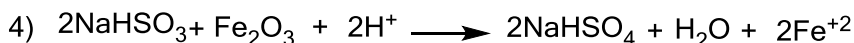
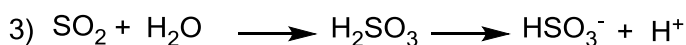
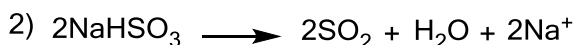
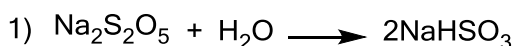


Figura 3: Reacción de reducción del metabisulfito de sodio.

El Fe^{+2} reacciona con el ligando indicador 1,10-fenantrolina, presente en el reactivo en forma de sal de sodio, formando la tris(1,10-fenantrolina)hierro (II) o ferroína, que desarrolla una coloración naranja proporcional a la concentración de hierro total. El complejo de coordinación octaédrico formado presenta una composición de tres ligandos con un centro metálico (**Figura 4**) y que absorbe en el rango de UV-Vis a una longitud de onda máxima de 510 nm.⁷

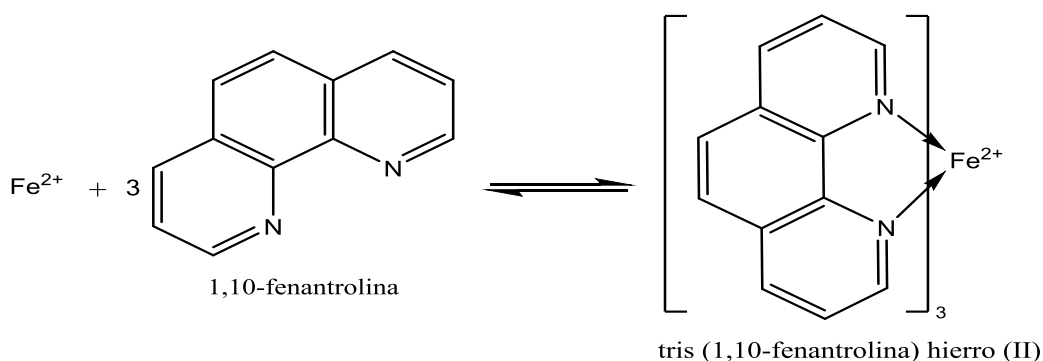


Figura 4: esquema de reacción de la 1,10-fenantrolina con el hierro (II).

3.2.2. Rango de concentraciones y especificaciones

El rango de trabajo está comprendido entre 0,10 y 3,00 mg/L de Fe. La especificación del Fe en aguas de torres de refrigeración y condensadores es de < 2 mg/L según el Real Decreto 865/2003.²

3.2.3. Matriz

Las matrices que se llevan a evaluación son aguas de torres de refrigeración (TR) y condensadores (CE).

3.3. CRITERIOS DE VALIDACIÓN

Para efectuar la validación de nuestro método analítico, estudiaremos las siguientes características:

- Selectividad: es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes en la matriz.
- Linealidad: la linealidad de un método analítico es su capacidad, dentro de un cierto intervalo, de obtener resultados directamente proporcionales a la concentración de la impureza a determinar, o por una transformación matemática bien definida.
- Límite de detección: es la mínima concentración que da señal detectable en las condiciones de trabajo establecidas por el método.
- Límite de cuantificación: es la mínima concentración que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión.
- Exactitud: grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia. Cuando se aplica a un método de ensayo se refiere a una combinación de veracidad (error sistemático) y precisión (error aleatorio).
 - Veracidad: es el parámetro que expresa el grado de concordancia entre el valor verdadero o valor de referencia aceptado y el valor determinado por el análisis.

- **Precisión** (repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad): es el grado de concordancia entre resultados obtenidos al aplicar el procedimiento experimental repetidas veces bajo las condiciones establecidas. Se calcula como desviación estándar o coeficiente de variación de los resultados de las mediciones. Cuanto mayor sea la desviación estándar, menor será la precisión obtenida.
- **Robustez**: sensibilidad que presenta un método ante pequeñas variaciones en las condiciones de ensayo descritas en el procedimiento.
- **Incertidumbre**: parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mesurando.⁸

Es esencial establecer criterios u objetivos previos a la aceptación de un estudio de validación. Los criterios de la validación vienen determinados por unos criterios generales expuestos en los Planes Normalizados de Trabajo de Elecnor S.A. o por los aspectos particulares de una especificación o límite superior fijado por Nalco Champion. La **Tabla 1** recoge un resumen de los criterios de aceptación para cada parámetro.

En el estudio se establecen dos niveles de concentración:

- Nivel bajo entre 0,10 y 0,50 mg/L de Fe
- Nivel alto entre 1,50 y 3,00 mg/L de Fe

Tabla 1: Resumen de los criterios de aceptación.

Parámetro	General	Nivel Bajo	Nivel Alto
Límite de detección	LD $\leq$ 0,1 mg/L	-	-
Linealidad	C.L $\geq$ 95% R > 0,999	-	-
Veracidad	-	80% - 110% de R	80% - 110% de R
Repetibilidad	-	%C.V < 11,30%	%C.V < 8,00%
Precisión intermedia	-	%C.V < 15,10%	%C.V < 10,70%
Incertidumbre (U)	-	Uexp < 32%	Uexp < 32%

3.3.1. Selectividad

En este apartado se tendrán en cuenta las λ de absorción máximas de los reactivos y de los productos, las cuales deberán ser lo suficientemente distintas como para que en caso de que parte de reactivo no reaccione, éste no interfiera en la medida. También se deberán tener en cuenta otras posibles interferencias que afecten a la determinación del analito mediante el método de estudio. Debido a que la validación la realizamos de dos tipos de matrices distintas evaluaremos los resultados del porcentaje de

recuperación obtenido tras el dopaje de las muestras con un patrón estándar certificado. De esta manera estudiaremos si existe alguna posible interferencia en nuestras matrices. Esto lo haremos así en el estudio de todos los parámetros, excepto en el caso de la linealidad y el límite de detección, con los que trabajaremos directamente con la absorbancia. El dopaje se realiza añadiendo una cantidad de hierro conocida a la muestra mediante un patrón certificado y la concentración final será siempre como mínimo, el doble de la inicial. La recuperación (%R) es la relación entre la concentración de analito encontrado en la muestra y la concentración de analito añadido (**Ecuación 4**). En caso de que las recuperaciones obtenidas, para uno o los dos tipos de matrices estudiados, no entraran dentro de los límites preestablecidos, deberán evaluarse y aplicarse factores de corrección a la hora de ofrecer los resultados finales.⁹

$$\%R = \frac{C_{MA} - C_M}{C_A} \cdot 100$$

Ecuación 4: % de recuperación

Donde:

- C_{MA} = concentración de la muestra con el analito añadido
- C_M = concentración de la muestra
- C_A = concentración de analito añadida

3.3.2. Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) los calcularemos a partir de la evaluación de diez medidas de nuestro reactivo en agua desmineralizada utilizando las **Ecuación 5** y **Ecuación 6**. De esta forma tendremos en cuenta la posible absorbancia que pueda tener el reactivo FerroVer®, dado que el cero se realiza con la muestra a analizar sin el reactivo.

Los límites de detección y cuantificación deberán ser $\leq 0,1$ mg/L, pues es el límite inferior fijado en la validación.

$$LD = \bar{X} + 3.S$$

Ecuación 5: límite de detección.

$$LQ = \bar{X} + 10.S$$

Ecuación 6: límite de cuantificación

Donde:

- $\bar{X}$ = media de las medidas
- S = desviación de las medidas

3.3.3. Linealidad

La linealidad se determina mediante un mínimo de cuatro niveles distintos, espaciados regularmente, con un mínimo de tres repeticiones. Establecemos como criterio de aceptación un Coeficiente de Linealidad (CL) mayor del 95% y un coeficiente de regresión $R > 0,999$. Las fórmulas utilizadas para el desarrollo de la ecuación de la recta ($y = mx + b$) y sus desviaciones son las siguientes:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

Ecuación 7: ordenada al origen

$$m = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

Ecuación 8: pendiente de la recta

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}}$$

$$r = \frac{S_{xy}}{S_x \cdot S_y}$$

Ecuación 9: coeficiente de regresión

$$S_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i \cdot Y_i}{n} - (\bar{X} \cdot \bar{Y})$$

Ecuación 10: desviación entre variables

$$S_x = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^n X_i^2}{n} - \bar{X}^2 \right)}$$

Ecuación 11: desviación variable independiente

$$S_y = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^n Y_i^2}{n} - \bar{Y}^2 \right)}$$

Ecuación 12: desviación variable dependiente

$$C_L = \left(1 - \frac{S_m}{m} \right) \cdot 100$$

Ecuación 13: coeficiente de linealidad

$$S_{res} = \sqrt{\frac{S_{yy} - m^2 \cdot S_{xx}}{n - 2}}$$

Ecuación 14: error residual

$$S_m = \frac{S_{res}}{S_x}$$

Ecuación 15: desviación de la pendiente

$$S_b = \sqrt{S_{res}^2 \cdot \left(\frac{1}{n - \frac{(\sum X_i)^2}{\sum X_i^2}} \right)}$$

Ecuación 16: error de la recta

Donde:

- X_i = concentraciones
- $\bar{X}$ = media de las concentraciones
- Y_i = respuestas del equipo
- $\bar{Y}$ = media de las respuestas del equipo
- S = desviación de las medidas
- n = número de puntos de la recta

3.3.4. Exactitud

Como se ha comentado en el punto 3.3 de este documento, la exactitud es la combinación de errores sistemáticos (veracidad) y aleatorios (precisión). Así será necesaria la evaluación de los dos tipos de errores tal y como se detalla a continuación. Se deberá tener en cuenta la presencia o no de outliers, mediante su identificación utilizando el Test de Grubbs. Para ello se ordenan los datos de menor a mayor y se calculan los valores de G inferior (**Ecuación 17**) y G superior (**Ecuación 18**). Una vez hechos estos cálculos se comparan con un valor G tabulado para un nivel de confianza del 95%. Si el valor tabulado es mayor que el valor calculado, se acepta el resultado.

$$G_i = \frac{\bar{X} - X_i}{S}$$

Ecuación 17: Valor de G inferior.

$$G_s = \frac{X_s - \bar{X}}{S}$$

Ecuación 18: Valor de G superior.

Donde:

- G_i = valor de G para el valor inferior
- G_s = valor de G para el valor superior
- X_i = valor más pequeño
- X_s = valor más grande
- S = desviación estándar

3.3.4.1. Veracidad

El estudio de la veracidad lo realizaremos evaluando las recuperaciones obtenidas por nuestro método en dos niveles de concentraciones en condiciones de precisión intermedia. El criterio de aceptabilidad de resultados será el rango entre el 80% y el 110% de %R. El cálculo del sesgo lo realizaremos por diferencia, teniendo en cuenta el valor ideal de una %R = 100% en valor absoluto.⁹

3.3.4.2. Precisión

La evaluación de la precisión la realizaremos calculando el coeficiente de variación, %CV (**Ecuación 19**). Se consideran la repetibilidad y la precisión intermedia, estudiándose ambas en dos niveles de concentraciones.

$$\%CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Ecuación 19: coeficiente de variación.

Donde:

- S = desviación de las medidas de %R
- $\bar{X}$ = media de %R

Establecemos el criterio de aceptabilidad de la precisión en base al coeficiente de variación de Horwitz (**Ecuación 20**), donde “c” es el valor nominal del analito expresado en potencia de 10, ejemplo: 1 ppm = 1mg/L = 10⁻⁶.

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

Ecuación 20: coeficiente de variación de Horwitz.

Así pues, se establece para la repetibilidad un %CV < %CVh/2 y para la precisión intermedia un %CV < 2. $\frac{\%CVh}{3}$. Entonces, para nuestros niveles de estudio los criterios de aceptación de la precisión serán los indicados en la **Tabla 2**.¹⁰

Tabla 2: Criterios aceptabilidad de la precisión.

	Nivel bajo (0,10 a 0,50 ppm)	Nivel alto (1,50 a 3,00 ppm)
Repetibilidad	%CV < 11,30%	%CV < 8,00%
P. Intermedia	%CV < 15,10%	%CV < 10,70%

La precisión intermedia se estudia considerando la dispersión a lo largo de los días de un nivel de concentración. Se evalúan los %CV y se calcula la desviación total debida a la precisión intermedia mediante el test de diseño anidado, utilizando la tabla ANOVA siguiente:¹¹

Donde:

- p = nº de días
- n = nº de repeticiones

Tabla 3: tabla ANOVA para el diseño anidado.

Varianza	Expresión	Grados de libertad
Repetibilidad (S_r^2)	MS_E	$p \cdot (n-1)$
Entre días ($S_{días}^2$)	$\frac{MS_{días} - MS_E}{n}$	-
Intermedia ($S_{I(días)}^2$)	$S_{días}^2 + S_r^2$	-
Valores medios ($S_{\bar{X}}^2$)	$\frac{MS_{días}}{n}$	$p-1$

$$MS_E = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n ((X_{ij} - \bar{X}_i)^2)}{p \cdot (n-1)}$$

Ecuación 21: variación dentro del grupo.

$$MS_{días} = \frac{n \cdot \sum_{i=1}^p (\bar{X}_i - \bar{\bar{X}})^2}{(p-1)}$$

Ecuación 22: variación entre días.

$$S_{I(días)}^2 = S_r^2 + S_{días}^2$$

Ecuación 23: variación de la precisión intermedia.

3.3.5. Robustez

El estudio de la robustez lo realizaremos introduciendo pequeñas variaciones deliberadamente y comprobando si existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos a un nivel superior e inferior y en caso de que se produjeran resultados significativamente diferentes, tiene que quedar correctamente indicada la importancia de esa variable en el Procedimiento Normalizado de Trabajo de análisis y en el informe final de validación.

Para ello realizamos una comparativa estadística de los resultados obtenidos en el nivel inferior y el nivel superior mediante un test-F y un test-t. Primero se comprueba si hay o no diferencias significativas entre varianzas con el test-F, como expresa la siguiente ecuación, donde $S_1^2 > S_2^2$:

$$F_{cal} = S_1^2 / S_2^2$$

Ecuación 24: F calculada.

Se compara el valor de F calculado con el valor tabulado de una distribución F de dos colas para una probabilidad del 95% y (n_1-1) y (n_2-1) grados de libertad. Si $F_{tab} > F_{cal}$, no hay diferencias significativas entre las desviaciones por lo que son comparables.

Dependiendo de si las precisiones anteriores son comparables o no, se aplica una fórmula distinta para el cálculo del estadístico t y sus grados de libertad:

- Si las precisiones son similares se calcula:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{(n_1-1) \cdot s_1^2 + (n_2-1) \cdot s_2^2}{n_1+n_2-2} \cdot \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

Ecuación 25: t calculada para precisiones similares.

Se compara el valor de t calculado (**Ecuación 25**) con el valor de t tabulado en una distribución de dos colas para una probabilidad del 95% y con $(n_1 + n_2 - 2)$ grados de libertad.

- Si las precisiones no son similares se calcula:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}}$$

$$V_{eff} = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2 \cdot (n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2 \cdot (n_2-1)}}$$

Ecuación 26: t calculada para precisiones no similares

Ecuación 27: g.l. para precisiones no similares

Se compara el valor de t calculado (**Ecuación 26**) con el valor de t tabulado en una distribución de dos colas para una probabilidad del 95% y con V_{eff} (**Ecuación 27**) grados de libertad.

En los dos casos, si $t_{tab} > t_{cal}$, no hay diferencias significativas entre las medias de los dos grupos. En caso de que existieran diferencias significativas entre los resultados de los dos niveles estudiados, esta desviación, deberá tenerse en cuenta en el cálculo de la incertidumbre.

3.3.6. Incertidumbre

En la evaluación de la incertidumbre tendremos en cuenta las máximas fuentes de error del método analítico. La incertidumbre combinada estándar (u_c) recoge todas las fuentes individuales de error y como su nombre indica, proviene de combinar varios componentes expresados como varianzas o cantidades equivalentes. La u_c se multiplica por un factor de cobertura de $k=2$ por tal de tener una confianza razonable en el resultado. Este factor de cobertura da aproximadamente un 95% de probabilidad de que

el valor obtenido esté dentro del intervalo calculado. Se establece un criterio de aceptación del 32% de incertidumbre para todo el rango de trabajo.⁸

$$U_{\text{expandida}} = K \sqrt{U_{\text{método}}^2 + U_{\text{veracidad}}^2 + U_{\text{c,patrón}}^2}$$

Ecuación 28: incertidumbre total expandida.

$$U_{\text{método}} = S_{\text{intermedia}}$$

Ecuación 29: incertidumbre del método.

$$U_{\text{veracidad}} = \frac{S_{\text{sesgo}}}{\sqrt{3}}$$

Ecuación 30: incertidumbre de la veracidad.

$$U_{\text{c,patrón}} = C_{\text{patrón}} \cdot \sqrt{I_{\text{patrón}}^2 + I_{\text{pipeta}}^2 + I_{\text{aforado}}^2}$$

Ecuación 31: incertidumbre del patrón.

$$I_{\text{patrón}} = \frac{U_{\text{patrón}}}{C_{\text{patrón}}}$$

Ecuación 32: incertidumbre relativa del patrón.

$$I_{\text{pipeta}} = \frac{U_{\text{pipeta}}}{V_{\text{pipeteado}}}$$

Ecuación 33: incertidumbre relativa de la pipeta.

$$U_{\text{pipeta}} = \frac{T_{\text{pipeta}}}{\sqrt{3}}$$

Ecuación 34: incertidumbre asociada a la pipeta.

$$I_{\text{aforado}} = \frac{U_{\text{aforado}}}{V_{\text{aforado}}}$$

Ecuación 35: incertidumbre relativa del aforado.

$$U_{\text{aforado}} = \frac{T_{\text{aforado}}}{\sqrt{3}}$$

Ecuación 36: incertidumbre asociada al aforado.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. REACTIVOS

Los reactivos utilizados en los ensayos analíticos que se han llevado a cabo para la validación del método son el reactivo FerroVer® y una solución patrón certificada de 1000 mg/L en hierro. A continuación se detallan sus composiciones, sus declaraciones de peligro y su correcta manipulación y almacenaje.

4.1.1. FerroVer®

El reactivo utilizado para la determinación de hierro en agua es una mezcla preparada de la marca HACH, que denominan FerroVer® y que contiene:

Tabla 4: composición del reactivo FerroVer®.

Nombre Químico	CAS nº	Rango de concentraciones
Ditionito de Sodio	7681-57-4	20 - 30%
Metabisulfito de Sodio	7775-14-6	10 - 20%
1,10 – Fenantrolina	92798-16-8	1 - 5%

- Declaraciones de peligro:

H302 – Nocivo por ingestión.

H315 – Provoca irritación de la piel.

H318 – Provoca lesiones oculares graves.

H334 – Puede causar síntomas de alergia o asma o dificultad para respirar si se inhala.

H335 – Puede irritar las vías respiratorias.

H402 – Nocivo para la vida acuática.

EUH031 – En contacto con ácidos puede liberar gases tóxicos.

- Manipulación y almacenaje:

- Utilizar el equipo de protección personal para evitar el contacto en la piel, ojos o ropa.

- No respirar el polvo.

- Mantener los contenedores bien cerrados en un lugar seco, fresco y bien ventilado.

- No inflamable.

4.1.2. Solución patrón certificada de hierro

Como material de referencia se utiliza la solución de hierro estándar de 1000 mg/L CL01.0905 de la casa Chem-lab, tiene certificado de análisis de IONEX, con una incertidumbre del 0,2% calculada con un factor de cobertura de $k=2$, que en una distribución normal corresponde a un nivel de confianza del 95%. IONEX prepara y certifica sus materiales de referencia bajo el sistema de calidad ISO 9001 según los principios de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025. Su hoja de datos de seguridad no menciona ningún peligro en su

manipulación y tampoco hay datos conocidos de toxicidad. No existe ningún tipo de manipulación ni almacenaje especial para este producto.

4.2. EQUIPO

El equipo utilizado para la determinación del hierro en agua es un espectrofotómetro de UV/Vis de HACH, concretamente el DR-6000 que dispone de un rango de longitud de onda de 190 a 1100 nm.⁵

Tabla 5: descripción del equipo utilizado.

TAG	Equipo	Marca	Modelo
EF-01	Espectrofotómetro UV/Vis	HACH-LANGE	DR-6000

4.3. MATERIAL

El material utilizado durante los ensayos de la validación del método y su codificación se detalla a continuación:

Tabla 6: descripción y codificación del material utilizado en los ensayos.

Código	Material
MP-01	Micropipeta 1000 µL
MA-50	Matraz aforado 50 mL
MA-100	Matraz aforado 100 mL
MA-250	Matraz aforado 250 mL
C-873	Cubeta 10 mL
PR-25	Probeta 25 mL
-	Vaso de plástico 100 mL

4.4. PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

El método de análisis se encuentra descrito en el PNT-11 del Laboratorio de Elecnor S.A.. Los pasos a seguir son los siguientes:

- i) Encender el espectrofotómetro y seleccionar el número 265 de programas almacenados.
- ii) Llenar un vaso de precipitados de plástico con 25 ml de muestra con la probeta PR-25.
- iii) Añadir el contenido de un sobre del reactivo FerroVer®.
- iv) Agitar suavemente para mezclar.
- v) Seleccionar el icono del reloj y dar a empezar el período de reacción de 3 minutos.

- vi) Cuando finalice el tiempo de reacción, llenar la cubeta de lectura con la propia muestra. Éste será el BLANCO y realizamos el CERO en el espectrofotómetro.
La pantalla marcará **0.00 ppm Fe**.
Para esta analítica se precisa de una cubeta propia, para así evitar cualquier contaminación.
- vii) Llenar la cubeta con la muestra analizada y realizar la lectura; en la pantalla aparecerá el resultado de **ppm de Fe**.
- viii) Una vez finalizado el ensayo, apagar el equipo y dejar todo el material bien limpio.
Lavar con agua y jabón el material de plástico utilizado, enjuagando posteriormente con agua desmineralizada. La cubeta de lectura, se lavará con HCl 1:1 para eliminar cualquier interferencia, finalizando con un lavado con agua desmineralizada.¹²

4.5. VALIDACIÓN

Teniendo en cuenta los criterios de validación expuestos en el punto 3.3 de este proyecto, se realizaron los análisis correspondientes para el estudio de las características especificadas.

Se realizó una búsqueda bibliográfica de las $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción del reactivo 1,10-fenantrolina y de la tris(1,10-fenantrolina)hierro (II) para compararlas y determinar su posible solapamiento. Además, los parámetros relacionados con la exactitud se trabajan con valores de recuperaciones para determinar si existe alguna interferencia debida a la matriz. Todas las demás posibles interferencias han sido evaluadas por el propio fabricante y vienen indicadas en el manual del método (**Tabla 7**).¹²

Tabla 7: interferencias.

Especies interferentes	Nivel de interferencia
Calcio, Ca^{+2}	No afecta hasta los 10,000 mg/L como CaCO_3
Cloruro, Cl^-	No afecta hasta los 185,000 mg/L Cl^-
Magnesio	No afecta hasta los 10,000 mg/L como CaCO_3
Molibdeno/Molibdato	No afecta hasta los 50 mg/L como Mo
Altos niveles de hierro	Inhibe el desarrollo de la coloración.
Cobre, Cu^{+2}	No afecta. El reactivo FerroVer® contiene un agente enmascarante.
Altos niveles de sulfuro, S^{-2}	Pretratamiento de la muestra según el manual del fabricante
Turbidez	Pretratamiento de la muestra según el manual del fabricante.

Para la determinación del límite de detección y de cuantificación se realizó la medida de 10 muestras de agua desmineralizada conteniendo el reactivo Ferrover®, calculando la media de las absorbancias y la desviación de estas medidas, extrapolando con la ecuación de la recta para determinar los límites en mg/L.

Para el estudio de la linealidad del rango de concentraciones llevado a estudio (de 0,10 mg/L a 3,00 mg/L) se utilizaron cuatro niveles distintos de concentración (0,10mg/L, 1,00mg/L, 2,00 mg/L y 3,00mg/L) realizando tres repeticiones del ensayo para cada nivel. Se representaron las absorbancias obtenidas en frente de la concentración del correspondiente patrón de hierro.

Los patrones de 1,00 mg/L, 2,00 mg/L y 3,00 mg/L se prepararon en matraces aforados de 100 mL a partir de un patrón estándar certificado de 1000 mg/L Fe. El patrón de 0,1 mg/L se preparó a partir de un patrón madre de 100 mg/L, diluido del patrón estándar certificado.

Hecho esto, se calcularon las ecuaciones según el método de mínimos cuadrados utilizando el programa de hoja de cálculo Excel. También se calculó el coeficiente de regresión (R) y el coeficiente de linealidad (C_L).

La evaluación de la exactitud se llevó a cabo estudiando la veracidad y la precisión de las recuperaciones (%R) obtenidas por nuestro método analítico en el nivel bajo y alto de concentración de hierro y con los dos tipos de matrices.

La repetibilidad se estudió determinando primero la concentración de hierro presente en una muestra de cada una de las dos matrices que se pretenden validar. Se realizaron tres ensayos de cada una y se calculó la media de la concentración de hierro presente. Se utilizaron aguas de condensadores para la evaluación en el rango bajo de concentraciones y aguas de torres de refrigeración para el rango alto. Una vez que se conoció la concentración de hierro presente en cada muestra, se realizó el dopaje con el patrón estándar.

- Para el estudio a nivel bajo se preparó una solución en un matraz aforado de 250 mL, añadiendo 250 μ L de una solución patrón de 100 mg/l de hierro y enrasando con la muestra de agua de condensador.
- Para el estudio a nivel alto se preparó una solución en un matraz aforado de 250 mL, añadiendo 500 μ L de una solución patrón de 1000 mg/l de hierro y enrasando con la muestra de agua procedente de torres de refrigeración.

Una vez se obtuvieron los resultados de las muestras sin dopar y dopadas, se realizaron los cálculos de %R, las medias, las desviaciones, los coeficientes de variación y el sesgo.

La evaluación de la precisión intermedia y veracidad se llevaron a cabo obteniendo tres resultados de %R en cada nivel de concentración, utilizando las dos distintas matrices y en 6 días distintos. Una vez obtenidos los resultados, se calcularon las medias de las recuperaciones, las desviaciones, los coeficientes de variación y el sesgo. Las diluciones fueron preparadas de igual forma que en el estudio de la repetibilidad pero en matraces de 100mL.

La robustez del método se estudió teniendo en cuenta el tiempo de reacción, dado que las demás fuentes de posible variabilidad que podamos introducir en el método las tenemos en cuenta con el estudio de la recuperación. Este tiempo está fijado en tres minutos según el procedimiento del fabricante y en este punto se evaluó si existen diferencias significativas entre los resultados de recuperación obtenidos con un tiempo de reacción de 2 minutos y un tiempo de 4 minutos. Para ello se realizaron seis ensayos que se midieron a los 2 minutos y posteriormente a los 4 minutos. Estas mediciones se realizaron en condiciones de repetibilidad, en el nivel alto y bajo de concentraciones y utilizando las dos matrices.

Previo a cualquier tratamiento estadístico de los datos, se realiza un Test de Grubbs para determinar algún posible punto discrepante. El resultado fue negativo en todos los casos, por lo que se pudo contar con todos los datos. Como ejemplo, la **Tabla 8** muestra el Test de Grubbs realizado a los resultados de recuperación en el estudio de la repetibilidad, donde podemos observar como la G_{tab} es mayor que la G_{min} y la $G_{\text{máx}}$.

Tabla 8: ejemplo de test de Grubbs.

	%R	G_{min}	G_{max}	$G_{\text{tab}} (n=6)$
	98,92	1,37	1,31	1,82
	100,00			
	100,55			
	100,79			
	102,31			
	102,77			
%$\bar{R}$	100,89			
S	1,44			

En la evaluación de la incertidumbre para los dos niveles de concentración estudiados se tuvieron en cuenta: la incertidumbre del método, la incertidumbre de la trazabilidad y la incertidumbre del patrón. La incertidumbre del método proviene de la desviación total encontrada en condiciones de precisión intermedia, la incertidumbre de la trazabilidad proviene del sesgo, la incertidumbre del patrón proviene de la incertidumbre dada en el certificado de análisis y de las tolerancias del material volumétrico utilizado en la preparación de las diluciones. Se utilizó una $k=2$ para una probabilidad de cobertura del 95%.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. SELECTIVIDAD

A continuación la **Figura 5**¹³ y la **Figura 6**¹⁴ muestran los espectros de absorción del reactivo 1,10-fenantrolina y de la ferroína, los cuales muestran una λ de absorción máxima de 264 nm y 510 nm respectivamente, con absorción de cero o prácticamente cero, por parte de la 1,10-fenantrolina en la zona de 510 nm que es la λ utilizada en el método, por lo que podemos demostrar que la parte de indicador que pudiese quedar sin reaccionar, no absorberá en la longitud de onda de trabajo del método. El resto de las posibles interferencias nunca influirán en nuestro método llevado a validación, pues las matrices que se evalúan no superarán los niveles de afectación, ya sea por razones de proceso, por especificaciones legislativas o de la empresa Nalco Champion.

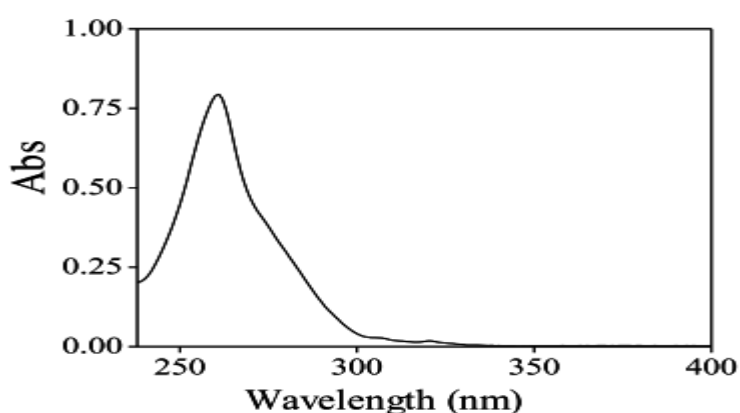


Figura 5: Espectro UV/Vis de la 1,10-fenantrolina.

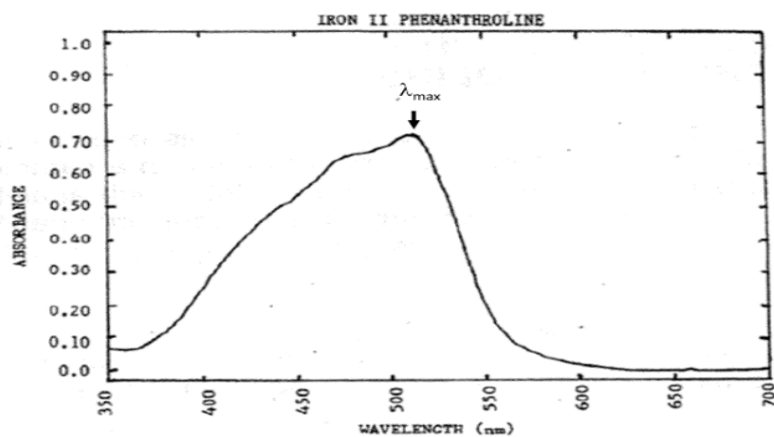


Figura 6: Espectro UV/Vis de la ferroína.

5.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La **Tabla 9** presenta los resultados en absorbancia y mg/L, de los límites de detección y cuantificación encontrados con la repetición de 10 blancos.

Tabla 9: Resultados determinación del LD y LC.

	Abs	[Fe] mg/L
LD	0,014	0,02
LC	0,026	0,05

Podemos aceptar los resultados obtenidos, pues son menores que el límite máximo fijado de 0,10 mg/L para el límite de detección. Si necesitáramos unos límites inferiores a los encontrados, podríamos intentar realizar un estudio de linealidad en el rango de 0 a 0,10 mg/L, de esta manera posiblemente nos aproximaríamos aún más a cero, pero para nuestro alcance los límites encontrados son más que suficientes.

5.3. LINEALIDAD

Los resultados de la linealidad de nuestro método cumplen con los criterios previamente establecidos de un coeficiente de regresión (r) mayor que 0,999 y un coeficiente de linealidad (C.L.) mayor o igual que el 95%.

La **Figura 7** muestra la línea de tendencia y la ecuación obtenida en el estudio de este apartado.

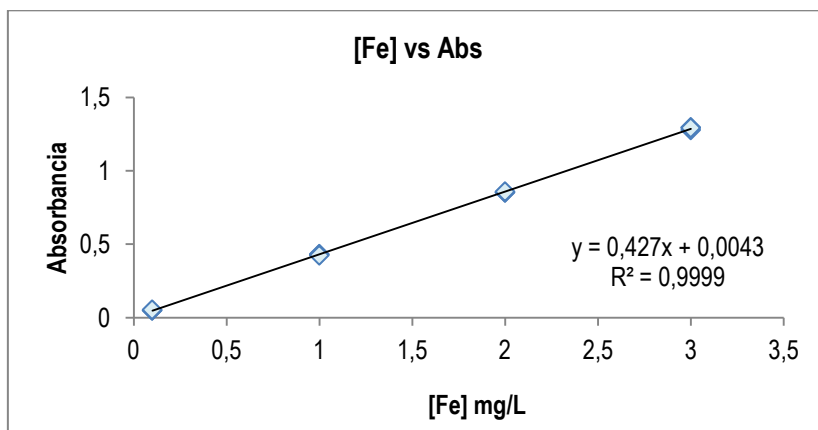


Figura 7: Gráfica de dispersión, línea de tendencia y ecuación de la recta.

5.4. EXACTITUD

5.4.1. Repetibilidad

La **Tabla 10** y la **Tabla 11** muestran los resultados de recuperaciones y coeficientes de variación obtenidos para el estudio de la repetibilidad del método en el rango bajo y el rango alto de concentraciones para los dos tipos de matrices respectivamente.

Podemos observar que se cumple con los criterios de aceptabilidad previamente establecidos de una $\%CV < 11,30\%$ para el rango bajo y $\%C.V < 8,00\%$ para el rango alto de concentraciones. Como era de esperar se obtiene un coeficiente de variación mayor trabajando en el nivel bajo de concentración, mientras que en el nivel alto, la repetibilidad es mucho mayor ($\%C.V.$ menor).

Tabla 10: Repetibilidad rango bajo de concentraciones.

Matriz	[Fe] mg/L muestra sin dopar	[Fe] mg/L dopaje	[Fe] mg/L muestra dopada	R%	$\overline{\%R}$	S	%C.V.
CE	0,03	0,10	0,12	90,0	103,3	8,16	7,90
			0,13	100,0			
			0,13	100,0			
			0,14	110,0			
			0,14	110,0			
			0,14	110,0			

Tabla 11: Repetibilidad rango alto de concentraciones.

Matriz	[Fe] mg/L muestra sin dopar	[Fe] mg/L dopaje	[Fe] mg/L muestra dopada	R%	$\overline{\%R}$	S	%C.V.
TR	0,22	2,00	2,22	100,0	100,9	1,44	1,43
			2,27	102,3			
			2,23	100,6			
			2,28	102,8			
			2,20	98,9			
			2,24	100,8			

5.4.2. Precisión intermedia y veracidad

La **Tabla 12** y la **Tabla 13** recogen los resultados del estudio de la precisión intermedia y de la veracidad a lo largo de seis semanas en el rango bajo y alto de concentraciones respectivamente. Se muestran los tipos de matrices utilizados en cada análisis, la concentración de hierro presente en la muestra antes y después del dopaje, los promedios de las recuperaciones de los tres ensayos y sus desviaciones y coeficiente de variación de cada día. También se incluye el promedio total, junto con el sesgo obtenido.

Tabla 12: ensayos para la determinación de la precisión intermedia y el sesgo en el rango bajo de concentraciones.

Día	Matriz	[Fe] mg/L muestra sin dopar	[Fe] mg/L dopaje	[Fe] mg/L muestra dopada	$\overline{\%R}$	S	%CV
13/04/2017	CE	0,02	0,10	0,13	106,67	5,77	5,41%
21/04/2017	CE	0,03	0,10	0,13	100,00	0,00	0,00%
02/05/2017	CE	0,02	0,10	0,11	90,00	0,00	0,00%
12/05/2017	TR	0,14	0,50	0,65	102,63	4,30	4,19%
16/05/2017	TR	0,17	0,50	0,65	96,67	5,03	5,21%
24/05/2017	CE	0,02	0,10	0,11	86,67	5,77	6,66%
					$\overline{\overline{\%R}}$		97,10%
					Sesgo		2,90%

Tabla 13: ensayos para la determinación de la precisión intermedia y el sesgo en el rango alto de concentraciones.

Día	Matriz	[Fe] mg/L muestra sin dopar	[Fe] mg/L dopaje	[Fe] mg/L muestra dopada	$\overline{\%R}$	S	%CV
13/04/2017	TR	0,22	2,00	2,23	100,46	0,45	0,00
21/04/2017	TR	0,19	2,00	2,24	102,50	0,50	0,00
02/05/2017	TR	0,15	2,00	2,00	92,67	0,76	0,01
12/05/2017	TR	0,14	2,00	2,23	104,28	1,09	0,01
16/05/2017	TR	0,17	2,00	2,28	105,33	1,04	0,01
24/05/2017	TR	0,11	2,00	2,14	101,33	3,01	0,03
					$\overline{\overline{\%R}}$		101,10%
					Sesgo		1,10%

Se obtienen en todos los casos, valores de recuperación que están dentro del rango previamente establecido de entre el 80% y el 110%, con resultados más próximos al 100% en el rango alto de concentraciones. Esto se puede comprobar viendo que el sesgo es más pequeño trabajando en el rango alto de concentraciones que en el rango bajo.

La **Tabla 14** muestra los resultados de las desviaciones de la repetibilidad de los distintos días, las desviaciones entre días y la desviación total de la precisión intermedia utilizando el diseño anidado con ANOVA. También muestra sus coeficientes de variación totales para el rango bajo y alto de concentraciones respectivamente. En ambos casos se cumple con el criterio preestablecido de aceptación, obteniendo también una mayor precisión en el rango alto de concentraciones (%CV menor).

Tabla 14: Resultados de precisión intermedia para ambos rangos de concentraciones.

	Rango bajo	Rango alto
$S_{\text{repetibilidad}}$	4,29%	1,44%
$S_{\text{entre días}}$	7,20%	4,43%
$S_{\text{intermedia}}$	8,38%	4,66%
%CV	8,63%	4,61%

5.5. ROBUSTEZ

La **Tabla 15** y la **Tabla 16** muestran, respectivamente para el rango bajo y alto de concentraciones, la concentración de hierro presente en la muestra inicialmente, la concentración de patrón de hierro con la que se dopa, las concentraciones finales de hierro y los resultados de las recuperaciones para los tiempos de reacción (T_r) de 2 y 4 minutos. También incluyen los resultados de los test-F y t calculados con los análisis de datos de la hoja de cálculo Excel.

Tabla 15: estudio del tiempo de reacción en el rango bajo de concentraciones.

[Fe] mg/L muestra sin dopar	[Fe] mg/L dopaje	[Fe] mg/L muestra dopada $T_r = 2 \text{ min}$	[Fe] mg/L muestra dopada $T_r = 4 \text{ min}$	%R $T_r = 2 \text{ min}$	%R $T_r = 4 \text{ min}$	F_{cal}	F_{tab}	t_{cal}	t_{tab}
0,02	0,10	0,10	0,11	80,00	90,00	1,60	7,15	0,62	2,23
		0,11	0,11	90,00	90,00				
		0,11	0,11	90,00	90,00				
		0,11	0,10	90,00	80,00				
		0,10	0,11	80,00	90,00				
		0,11	0,11	90,00	90,00				

Tabla 16: estudio del tiempo de reacción en el rango alto de concentraciones.

[Fe] mg/L muestra sin dopar	[Fe] mg/L dopaje	[Fe] mg/L muestra dopada $T_r = 2 \text{ min}$	[Fe] mg/L muestra dopada $T_r = 4 \text{ min}$	%R $T_r = 2 \text{ min}$	%R $T_r = 4 \text{ min}$	F_{cal}	F_{tab}	t_{cal}	t_{tab}
0,11	2,00	2,13	2,17	101,00	103,00	1,52	7,15	1,95	2,23
		2,08	2,10	98,50	99,50				
		2,15	2,21	102,00	105,00				
		2,08	2,13	98,50	101,00				
		2,16	2,20	102,50	104,50				
		2,13	2,18	101,00	103,50				

Comprobamos que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos con un tiempo de reacción de 2 minutos y de 4 minutos, viendo que las F_{cal} y t_{cal} , son menores que las F_{tab} y t_{tab} . Por tanto, podemos considerar que el tiempo de reacción de 3 minutos establecido en el procedimiento de análisis,

es un tiempo suficiente para que el reactivo reaccione con todo el analito y que la variación que éste supone en el resultado de los ensayos no es suficiente como para tenerla en cuenta en la incertidumbre expandida.

En el caso del rango alto de concentraciones, se puede observar que, aunque no haya diferencias significativas estadísticamente, los valores tomados para tiempos de reacción de 4 minutos son más altos que los tomados a los 2 minutos en todos los casos. Cabe la posibilidad de que esto suceda porque el reactivo tarda más en reaccionar completamente con todo el hierro, puesto que hay más cantidad de analito que en el rango bajo, pero no podemos confirmarlo simplemente con estos resultados.

5.6. INCERTIDUMBRE

La **Tabla 17** recoge los resultados del cálculo de las incertidumbres asociadas a cada parámetro y la incertidumbre expandida para los dos niveles estudiados, obteniendo una incertidumbre más elevada para el rango bajo, tal y como era de esperar, pues sus desviaciones han sido mayores. Podemos observar como en los dos casos se cumple con los criterios previamente establecidos de $U_{exp} < 32\%$.

Tabla 17: resultados del cálculo de la incertidumbre expandida para cada nivel.

Rango	$U_{patrón}$	$U_{método}$	U_{sesgo}	U_{total}	K	U_{exp}
0,10 - 0,50 mg/L	0,01	8,38	1,67	8,55%	2	17,09%
1,50 - 3,00 mg/L	0,04	4,66	0,63	4,70%	2	9,40%

6. CONCLUSIONES

- Selectivity, linearity, trueness, precision and robustness of the spectrophotometric method used for iron determination in cooling tower and evaporative condensates waters, within concentration range of 0,10 mg/L to 3,00 mg/L have been demonstrated.
- The method satisfies all pre-established acceptance criteria.
- Elecnor S.A. internal procedures have been followed and complied.

7. REFERENCIAS

¹ Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Guía técnica para la Prevención y Control de la Legionelosis en instalaciones, Capítulo 4; pp 1-5.

<https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/agenBiologicos/guia.htm> (última consulta 5 de junio de 2017).

² Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. Boletín Oficial del Estado nº 171; pp 28067. <http://www.boe.es/boe/dias/2003/07/18/pdfs/A28055-28069.pdf> (última consulta 5 de junio de 2017).

³ Entidad Nacional de Acreditación, ENAC. Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005, CGA-ENAC-LEV Rev. 6. <https://www.enac.es/documents/7020/b7e24234-daba-4a62-9652-76eb7e96db30> (última consulta 6 de junio de 2017).

⁴ H.H. Willard; L.L. Merrit Jr.; J.A. Dean; F.A. Settle; *Métodos Instrumentales de análisis*; Editorial Continental: México, 1992; pp 47-78, 95.

⁵ HACH company; Manual del usuario DR 6000 DOC022.92.90367, 2ª edición, pp 15. <https://www.hach.com/asset-get.download.jsa?id=12166310603> (última consulta 6 de junio de 2017).

⁶ Irwin, S. B.; The American Institute for Conservation. A comparison of the use of sodium metabisulfite and sodium dithionite for removing rust stains from paper. *BPGA* [en línea] 2011, 30, 37. <http://cool.conservation-us.org/coolaic/sg/bpg/annual/v30/bp30-05.pdf> (última consulta 5 de junio de 2017).

⁷ Douglas, B. E.; McDaniel, D.H.; Alexander J.J. *Conceptos y modelos de Química Inorgánica*, 2ª Edición, Editorial Reverté: Barcelona, 1994, pp 246.

⁸ Entidad Nacional de Acreditación; Guía para la expresión de la incertidumbre en los ensayos cuantitativos, G-ENAC-09 Rev. 1. <https://www.enac.es/documents/7020/7a74c65a-199b-463e-adbf-b23f941c2a38> (última consulta 6 de junio de 2017).

⁹ Thompson, M.; Ellison, S.L.R.; Wood, R. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. *Pure & Appl. Chem.*, **1999**, 71 (2), 337-348.

- ¹⁰ Horwitz, W.; Albert, R. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *J. AOAC Int.*, **2006**, 89, 1095-1109.
- ¹¹ Massart, D. L. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A*; Elsevier: Amsterdam, 1997, 148.
- ¹² HACH Company; Manual Iron, Total Method 8008 DOC316.53.01053, 9ª edición, pp 5. <https://www.hach.com/asset-get.download.jsa?id=7639983724> (última consulta 6 de junio de 2017).
- ¹³ Li, L.; Cao, W.; Zheng, W.; Fan, C.; Chen, T. Ruthenium complexes containing 2,6-bis(benzimidazolyl)pyridine derivatives induce cancer cell apoptosis by triggering DNA damage-mediated P53 phosphorylation. *R. Soc. Chem.* **2012**, 41 (41), 12766-12772.
- ¹⁴ Leiter, J.; Gillmor, S.; Jeremic, A.; Vert-Wong, E., Method enhancing biodistribution tissue targeting properties therapeutic cec2 particles nano-encapsulation coating, US 20140271899 A1, Setiembre 18, 2014.

AGRADECIMIENTOS

No querría finalizar este proyecto sin agradecer antes la ayuda y apoyo recibido por parte de los miembros de la Facultad de Química de la URV, de compañeros y de familiares. Entre ellos me gustaría mencionar:

- Al Dr. Antonio Rodríguez Fortea, mi tutor académico, el cual me ha prestado su total ayuda durante la realización de este proyecto siempre que lo he necesitado, con todos sus consejos.
- A la Dra. Anna Masdeu Bultó, coordinadora del TFG, quién ha respondido siempre a todas nuestras dudas, nos ha apoyado y nos ha tenido en cuenta a todos los estudiantes durante todo el proceso.
- Al Dr. Joan Ferré Baldrich, el cual perdió un buen rato conmigo de manera totalmente desinteresada, ayudándome a resolver mis dudas.
- A Víctor Sánchez, de Nalco Champion, por ayudarme a comprender mejor el funcionamiento de los intercambiadores de calor.
- A Lilian Mas Matamoros, mi tutora en Elecnor S.A., de la qual he aprendido muchísimo y a quien me gustaría hacer mención especial, con el permiso del resto. Ha sido quien ha estado en el día a día ayudándome a resolver todas mis dudas, llenándose de paciencia revisando y preocupándose por el trabajo realizado sin importar el tiempo invertido en ello.
- Y por último, pero no menos importante, me gustaría mencionar a Judit, mi pareja. Simplemente gracias por estar ahí siempre.