Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Química e Ingeniería Química
Escuela Profesional de Química

Validación del método ISO 20179 para la determinación de Microcistina-LR en muestras de agua de consumo humano por cromatografía líquida de alta resolución con detección DAD

TESIS

Para optar el Título Profesional de Química

AUTOR

Alondra Mileni GOMEZ ARQQUE

ASESOR

Dr. Gerardo DE LAMA CARRILLO

Lima, Perú

2026



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Gomez, A. (2026). *Validación del método ISO 20179 para la determinación de Microcistina-LR en muestras de agua de consumo humano por cromatografía líquida de alta resolución con detección DAD*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Química]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Alondra Mileni Gómez Arqque
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	74415784
URL de ORCID	**https://orcid.org/0009-0002-2342-1433**
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Gerardo De Lama Carrillo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10426066
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-0539-4745
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Nelson Juvenal Tapia Huanambal
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08526342
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	María Angélica Rodríguez Best
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07358712
Datos de investigación	
Línea de investigación	Química Instrumental

Grupo de investigación	-----
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio Typsa País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima
Año o rango de años en que se realizó la investigación	De agosto a diciembre 2025
URL de disciplinas OCDE	Química Analítica **https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.04.07**

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central Telefónica: 619-7000

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los suscritos miembros del Jurado Calificador nombrados por el señor Presidente del Comité Ejecutivo del "V Programa Ciclo Taller de Titulación Profesional por la Modalidad de Tesis y Trabajo de Suficiencia Profesional para la Facultad de Química e Ingeniería Química 2025-II", bajo la Presidencia del **Dr. Nelson Juvenal Tapia Huanambal; Quím. María Angélica Rodríguez Best (Miembro)** y el **Dr. Gerardo De Lama Carrillo (Asesor);** habiendo presentado para tal efecto la **TESIS** titulada **"Validación del método ISO 20179 para la determinación de Microcistina-LR en muestras de agua de consumo humano por cromatografía líquida de alta resolución con detección DAD"** después de **SUSTENTADA Y APROBADA** la tesis elaborado por la bachiller en Química: **Gomez Arqque, Alondra Mileni;** para optar el **TÍTULO PROFESIONAL** de **QUÍMICA,** acordaron calificarla con la **NOTA** de:

Dieciocho (18).

(LETRAS) (NÚMEROS)

Ciudad Universitaria, 10 de enero del 2026.

DR. NELSON JUVENAL TAPIA HUANAMBAL
Presidente

Quím. MARÍA ANGÉLICA RODRÍGUEZ BEST
Miembro

Dr. GERARDO DE LAMA CARRILLO
Asesor

Dra. GLORIA ALEJANDRINA COSCO SALGUERO
Directora de la E.P. de Química

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS * DIRECCIÓN ACADÉMICA PROFESIONAL DE QUÍMICA * Química e Ingeniería Química

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, **Gerardo De Lama Carrillo** en mi condición de asesor acreditado con el Dictamen N° 00003-2026-EPQ-FQIQ/UNMSM de la tesis, cuyo título es **"Validación del método ISO 20179 para la determinación de Microcistina-LR en muestras de agua de consumo humano por cromatografía líquida de alta resolución con detección DAD"**, presentado por la bachiller **Gomez Arqque, Alondra Mileni** para optar el título profesional de QUÍMICA.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 12% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título profesional de Química.

Lima, 07 de abril de 2026.

Firma del Asesor _____

Nombres y Apellidos del asesor: GERARDO DE LAMA CARRILLO

DNI 10426066

Dedicatoria

A Dios por ser mi guía y bríndame salud, y a ese ángel que desde el cielo me ilumina, abuelita Obdulia Abanto Reyes

A mi madre Ysabel Arqque quien es la base de cada logro en mi vida, por sostenerme en los momentos difíciles y brindarme su amor incondicional

A mi hermano por siempre estar a mi lado sacándome sonrisas en los momentos más necesarios

Y a esa persona especial, gracias por ser mi compañía, motivación y equilibrio

Agradecimientos

A mis familiares por ser parte de mi vida y estar presentes en aquellos momentos difíciles, un especial agradecimiento a mi tío Erick Gómez y prima Ruth Arque

A mi asesor el Dr. Gerardo De Lama por su compromiso y orientación para la realización de este trabajo

A mis profesores en general, los cuales fueron parte de mi formación universitaria

Al laboratorio TYPSA, por permitirme el uso de las instalaciones e información necesaria con fines académicos

A aquellos amigos quienes fueron parte de esta etapa, gracias por cada palabra de aliento

Índice de contenido

Índice de tablas 6
Índice de figuras 8
Anexos 8
RESUMEN 9
ABSTRACT 10
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN 11
1.1 Introducción 11
1.2 Planteamiento de problema 12
1.2.1 Problema general 13
1.2.2 Problemas específicos 13
1.3 Objetivos 13
1.3.1 Objetivo general 13
1.3.2 Objetivos específicos 13
1.4 Importancia y alcance de la investigación 14
1.5 Limitaciones de la investigación 14
CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA 15
2.1 Antecedentes de estudio 15
2.2 Bases teóricas 17
2.2.1 Cianobacterias 17
2.2.2 Microcistina 17
2.2.3 Métodos de cuantificación de Microcistinas 18
2.2.3.1 Prueba de Elisa 18
2.2.3.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) 19
2.3 Definición de términos 19
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES 22
3.1 Hipótesis 22
3.1.1 Hipótesis general 22
3.1.2 Hipótesis específicos 22
3.2 Variables 22
3.2.1 Variable Independiente 22
3.2.2 Variable Dependiente 22
3.3 Operacionalización de las variables 23
CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS 24
4.1 Lugar y tiempo 24
4.2 Tipo y diseño de la investigación 24

4.3 Población y muestra 24
4.4 Procedimientos. Técnicas e instrumentos de recolección de la información 24
4.4.1 Instrumentos y materiales 24
4.4.2 Reactivos 24
4.4.2 Procedimiento Experimental 25
4.5 Análisis estadístico 26
CAPÍTULO V: RESULTADOS 27
5.1 Presentación y análisis de los resultados 27
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN 55
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 60
7.1 Conclusiones 60
7.2 Recomendaciones 60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 62
ANEXOS 67

Índice de tablas

Tabla 1 *Operacionalización de variable* 23
Tabla 2 *Respuestas obtenidas para las concentraciones de la curva de calibración de 0.1 mg/l a 1.5 mg/l* 27
Tabla 3 *Ecuación ajustada de regresión por mínimos cuadrados para curva 1* 28
Tabla 4 *Resumen del modelo de regresión para la curva 1* 29
Tabla 5 *Cálculo de residuos observado y predicho para la curva 1* 29
Tabla 6 *Ecuación ajustada de regresión por mínimos cuadrados para la curva 2* 29
Tabla 7 *Resumen del modelo de regresión para la curva 2* 29
Tabla 8 *Cálculo de residuos observado y predicho para la curva 2* 29
Tabla 9 *Ecuación ajustada de regresión por mínimos cuadrados para la curva 3* 29
Tabla 10 *Resumen del modelo de regresión para la curva 3* 30
Tabla 11 *Cálculo de residuos observado y predicho para la curva 3* 30
Tabla 12 *Evaluación de datos atípicos para el rango de trabajo en agua de consumo mediante la prueba estadística de h y k mandel, cochran y grubbs* 30
Tabla 13 *Criterio de conformidad de h mandel para las medias de los analistas (a1, a2, a3)* 31
Tabla 14 *Criterio de conformidad de k mandel para las desviaciones estándares de los analistas (a1, a2, a3)* 31
Tabla 15 *Criterio de conformidad de la prueba de cochran para las varianzas entre analistas (a1, a2, a3)* 31
Tabla 16 *Criterio de conformidad de la prueba de grubbs máximo y mínimo* 32
Tabla 17 *Prueba de homogeneidad de varianzas realizada para el rango de trabajo a los analistas a1-a2-a3 para la mc-lr* 32
Tabla 18 *Prueba de bartlett (distribución normal)* 33
Tabla 19 *Prueba de hipótesis para datos obtenidos en el rango de trabajo* 33
Tabla 20 *Prueba de homogeneidad de medias (anova de un factor) para el rango de trabajo* 33
Tabla 21 *Resumen estadístico del anova de un factor para la comparación entre los analistas a1-a2-a3* 34
Tabla 22 *Resultados obtenidos a través de la prueba estadística del anova de un solo favor para los analistas a1-a2-a3* 34
Tabla 23 *Prueba t de una muestra para a1 en agua de consumo humano en la determinación de mc-lr para verificar la homogeneidad de media* 35
Tabla 24 *Prueba de hipótesis para datos obtenidos de la t- student del a1* 35
Tabla 25 *Prueba t de una muestra para a2 en agua de consumo humano en la determinación de mc-lr para verificar la homogeneidad de media* 35
Tabla 26 *Prueba de hipótesis para datos obtenidos de la t- student del a2* 36
Tabla 27 *Prueba t de una muestra para a3 en agua de consumo humano en la determinación de mc-lr para verificar la homogeneidad de media* 36
Tabla 28 *Prueba de hipótesis para datos obtenidos de la t- student del a3* 36
Tabla 29 *Concentraciones obtenidas del ldm-lcm en mg/l para la determinación de microcistina-lr* 36
Tabla 30 P*rueba de hipótesis para datos de la figura 7* 37

Tabla 31 *Prueba de grubbs de valores atípicos para ldm/lcm* 38
Tabla 32 *Prueba de hipótesis para datos de la tabla 31* 38
Tabla 33 *Prueba de grubbs de valores atípicos para ldm/lcm* 38
Tabla 34 *Prueba de hipótesis para datos de la tabla 33* 38
Tabla 35 *Evaluación del límite de detección y cuantificación para la microcistina-lr* 39
Tabla 36 *Conjuntos de datos obtenidos a partir de la fortificación de 0.0005 mg/l a 10 muestras de agua de consumo obtenidas para cada analista (a1-a2-a3)* 39
Tabla 37 *Resultados obtenidos a partir de la tabla 36 para el análisis estadístico de h de mandel para* 40
Tabla 38 *Criterio de conformidad de h de mandel para cada analista (a1, a2, a3)* 40
Tabla 39 *Resultados estadísticos obtenidos en la prueba de k mandel* 41
Tabla 40 *Criterio de conformidad para la prueba de k mandel* 41
Tabla 41 *Resultados de la prueba de cochran para un 95 % de confianza* 41
Tabla 42 *Criterio de conformidad para la prueba de cochran* 42
Tabla 43 *Resultados de la prueba de grubbs máximo y mínimo para la identificación de valores atípicos* 42
Tabla 44 *Criterio de conformidad para la prueba de grubbs según el grubbs crítico* 42
Tabla 45 *Prueba de homogeneidad de varianzas para a1-a2-a3 en agua de consumo para la mc-lr* 43
Tabla 46 *Prueba de bartlett (distribución normal)* 43
Tabla 47 *Prueba de homogeneidad de medias (anova de un factor)* 44
Tabla 48 *Resumen estadístico del anova de un factor para la comparación entre los analistas a1-a2-a3* 44
Tabla 49 *Resultados obtenidos por la prueba estadística del anova de un solo favor para la homogeneidad de medias en los analistas a1-a2-a3* 44
Tabla 50 *Resultados obtenidos para la evaluación de la precisión intermedia, a partir de las varianzas y valores intermedios denotados como t1, t2, t3, t4 y t5* 45
Tabla 51 *Resultados obtenidos para la determinación de la desviación estándar relativa de repetibilidad (rsd_r) y reproducibilidad (rpd_r)* 47
Tabla 52 *Prueba t de una muestra para a1 en agua de consumo humano en la determinación de mc-lr* 47
Tabla 53 *Prueba de hipótesis para la t de student de una muestra para a1* 48
Tabla 54 *Prueba t de una muestra para a2 en agua de consumo humano en la determinación de mc-lr* 49
Tabla 55 *Prueba de hipótesis para la t de student de una muestra para a2* 49
Tabla 56 *Prueba t de una muestra para a3 en agua de consumo humano en la determinación de mc-lr* 50
Tabla 57 *Prueba de hipótesis para la t de student de una muestra para a3* 50
Tabla 58 *Prueba de t de student de un factor, determinación del sesgo (b), sesgo relativo porcentual (b%) y recuperación relativa porcentual (r%)* 51
Tabla 59 *Determinación de fuente de incertidumbre en muestreo* 53
Tabla 60 *Valores obtenidos para la determinación de la desviación de estándar de muestreo* 53
Tabla 61 C*álculo de incertidumbre de medición* 54

Índice de figuras

Figura 1 E*structura general de microcistinas: mc-lr, mc-rr, mc-yr y mc-la* 18
Figura 2 *Curva de calibración 1* 27
Figura 3 *Curva de calibración 2* 28
Figura 4 *Curva de calibración 3* 28
Figura 5 *Gráfico de normalidad de los datos utilizados para el rango de trabajo en la determinación de mc-lr* 32
Figura 6 *Gráfico de prueba de igualdad de varianzas: a1; a2; a3* 33
Figura 7 *Gráfico de cajas para la prueba de homogeneidad de medias en agua de consumo para la mc-lr* 34
Figura 8 *Gráfica de la prueba de normalidad de anderson- darling para ldm/lcm* 37
Figura 9 *Gráfico de normalidad de datos para la mc-lr en agua de consumo* 42
Figura 10 *Gráfico de prueba de igualdad de varianzas: a1; a2; a3* 43
Figura 11 *Gráfico de homogeneidad de medias en agua de consumo para la mc-lr* 45
Figura 12 *Gráfico de cajas de la prueba t de una muestra para a1* 48
Figura 13 *Gráfico de cajas de la prueba t de una muestra para a2* 49
Figura 14 *Gráfico de cajas de la prueba t de una muestra para a3* 50
Figura 15 *Identificación de las fuentes de incertidumbre* 52

Anexos

Anexo A. Cálculo demostrativo de la recta de regresión de mínimos cuadrados para la curva 1 67
Anexo B. Tabla de t de student 69
Anexo C. Tabla de indicadores para las estadísticas de h y k de mandel en el nivel de significancia de 5 % 70
Anexo D. Tabla de valores críticos para la prueba de cochran 71
Anexo E. Tabla de valores críticos para la prueba de grubbs 72
Anexo F. Cromatograma de mc-lr a 1.5 mg/l 73
Anexo G. Cromatograma de mc-lr a 1.0 mg/l 74
Anexo H. Cromatograma de mc-lr a 0.5 mg/l 75
Anexo I. Cromatograma de mc-lr a 0.2 mg/l 76
Anexo J. Cromatograma de mc-lr a 0.1 mg/l 77
Anexo K. Diagrama de flujo del tratamiento de la muestra 78
Anexo L. Cálculo del coeficiente de sensibilidad respecto a la lectura, volumen final y volumen de la muestra 79
Anexo M. Certificado de calibración para la micropipeta de 1000 ul 80
Anexo N. Certificado de calibración para la fiola de 500 ml 81
Anexo O. Equipo hplc agilent technologies -dad 1200 82
Anexo P. Equipo de concentrador de nitrógeno - hanon 83
Anexo Q. Equipo de extracción en fase sólida – supelco visprep 12 84

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo la validación del método ISO 20179 para la determinación de Microcistina-LR presente en agua de consumo humano. En consecuencia, se busca el cumplimiento de la regulación establecida según el DS 031-2010-SA, en donde se establece para la Microcistina -LR el límite máximo permisible de 0.001 mg/L para agua de consumo humano. La determinación se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD), como técnica instrumental donde se evaluó rango lineal y rango de trabajo, el cual se estableció de 0.1 a 1.5 mg/L, así mismo los resultados demostraron como límites de detección 0.00004 mg/L y cuantificación 0.00013 mg/L, por otra parte, la precisión en base a la repetibilidad (RSDr) se obtuvo 12.31%, 2.94% y 1.03%, mientras que para la reproducibilidad (RPDR) los valores obtenidos fueron 13.28 %, 3.13% y 0.98% y veracidad del método fue evaluada a través del cálculo del sesgo, del sesgo relativo porcentual y del porcentaje de recuperación, los valores obtenidos como sesgo fueron 0.0000002, 0.0000085 y 0.0000067 para cada uno de los niveles, la recuperación se encuentra dentro de los rangos aceptables de 98% - 99%, por otra parte se realizó la determinación de la incertidumbre de medición para la identificación de las principales fuentes de incertidumbre analítica en el que se obtuvo como incertidumbre estándar combinada 0.000019 e incertidumbre expandida 0.000038, lo que representa un aporte significativo para asegurar la confiabilidad de los resultados y fortalecer el control de calidad en el monitoreo de contaminantes en agua de consumo humano.

Palabras clave: Microcistina, Validación, muestras de agua, HPLC.

ABSTRACT

The objective in this work is to validate the ISO 20179 method for determining Microcystin-LR in water intended for human consumption. Consequently, compliance with the regulations established in DS 031 2010-SA is sought, which sets the maximum permissible limit for Microcystin-LR at 0.001 mg/L for water intended for human consumption. The determination was carried out using high-performance liquid chromatography (HPLC) with a diode array detector (DAD) as the instrumental technique, evaluating the linear range and working range, which was established at 0.1 to 1.5 mg/L. The results also showed detection limits of 0.00004 mg/L and quantification limits of 0.00013 mg/L. On the other hand, precision based on repeatability (RSDr) was obtained at 12.31%, 2.94%, and 1.03%, while reproducibility (RPDR) values were 13.28%, 3.13%, and 0.98%. The accuracy of the method was evaluated by calculating the bias, relative percentage bias, and percentage recovery. The values obtained as bias were 0.0000002, 0.0000085, and 0.0000067 for each of the levels, and the recovery was within the acceptable ranges of 98%–99%. On the other hand, the measurement uncertainty was determined to identify the main sources of analytical uncertainty, obtaining a combined standard uncertainty of 0.000019 and an expanded uncertainty of 0.000038, This represents a significant contribution to ensuring the reliability of results and strengthening quality control in the monitoring of contaminants in water for human consumption.

Keywords: Microcystin, Validation, water samples, HPLC.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

La cromatografía es una técnica analítica aplicada a diferentes ramas como bioquímica, química forense, química industrial, alimentaria, entre otras. Esta técnica fue desarrollada por primera vez en 1903 por el botánico ruso Mikhail S. Tswett, el cual es conocido como el padre de la Cromatografía, esta técnica se fundamenta en la separación y análisis de diversos componentes químicos basándose en la interacción de la mezcla con la fase estacionaria y fase móvil, por lo que actualmente es una herramienta importante en la ciencia (Suarez & Morales, 2018) (Bhati et al.,2022). En específico la cromatografía líquida en sus inicios se utilizaban columnas de vidrio que se caracterizaban por su gran diámetro de 10 a 50 mm y relleno sólido recubiertas con fase líquida adsorbida que forma parte de la fase estacionaria con tamaño de partículas de 150-220 μm lo cual ocasionaba tiempos de separación prolongados, en este sentido los científicos se vieron impulsados a aumentar la eficiencia de la columna, por lo que a finales de la década de 1960 con tecnologías mejoradas se pudo obtener empaques con tamaños de partícula de 3 a 10 μm (Douglas et al., 2008).

Entre las diversas técnicas de análisis, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es muy utilizada en el análisis de microcistinas en agua en donde se realiza su detección y cuantificación, el nivel de sensibilidad dependerá del detector usado logrando niveles requeridos con un detector UV, mientras que al acoplarse con la espectrometría de masas se fortalece la capacidad confirmatoria (Aguete et al., 2001).

Cabe mencionar que la presencia de microcistinas radican en sistemas acuáticos de agua dulce en donde existe presencia de cianobacterias, estas se caracterizan por ser algas verdeazuladas que al ser lisadas liberan la Microcistina-LR, cuya estructura está conformada por los aminoácidos de leucina y arginina, poniendo en riesgo los abastecimiento de agua potable, en efecto el control y la implementación de metodologías que detecten esta toxina resulta necesario para asegurar la inocuidad del agua potable (Melvin, 2017).

Debido a ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su directriz para la calidad de agua potable a establecido un valor provisional máximo para la Microcistina-LR que no debe superar 0.001 mg/L (1 μg/L) debido a su alta toxicidad y su presencia recurrente en agua potable siendo la principal exposición para los humanos. (OMS, 2022).

Así mismo en el Perú, por parte del Ministerio de Salud ha legislado en el Decreto Supremo

N°031-2010-SA donde se establece los límites máximos permisibles (LMP) para parámetros orgánicos como parte del reglamento de la calidad del agua para consumo humano donde existe la evidente preocupación por lo que se busca garantizar su inocuidad, por ende, proteger y promover el bienestar de la salud pública asegurando el uso del agua potable libre de contaminantes físicos, químicos y microbiológicos; en este contexto en el Anexo III como parte de los parámetros orgánicos se establece como LMP de 0.001 mg/L para la Microcistina-LR, En este sentido, en el presente trabajo se realiza la Validación de la metodología ISO 20179 para la determinación de Microcistina-LR en muestras de agua de consumo humano por cromatografía líquida de alta resolución con detección DAD en cumplimiento con el Decreto Supremo N°031-2010-SA por parte del Laboratorio TYPSA asegurando así la validez de los resultados respecto a los criterios de evaluación.

1.2 Planteamiento de problema

En los últimos años, la proliferación de floraciones algales nocivas (FAN) en cuerpos de agua dulce ha aumentado significativamente a nivel mundial, debido principalmente al cambio climático, el enriquecimiento por nutrientes (eutrofización) y otras actividades antropogénicas. Dentro de estas floraciones, las cianobacterias del género Microcystis son de particular preocupación por su capacidad de producir microcistinas, una familia de toxinas hepatotóxicas altamente resistentes a la degradación ambiental y potencialmente peligrosas para la salud humana y animal (Reid et al., 2024).

La determinación precisa de esta toxina requiere el uso de métodos analíticos sensibles, específicos y confiables. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD) es una de las técnicas recomendadas por su capacidad de identificar y cuantificar microcistinas de manera efectiva. La norma internacional ISO 20179 establece un método para la determinación de Microcistina-LR en aguas, proporcionando un marco técnico reconocido para garantizar resultados analíticos confiables y comparables.

No obstante, la aplicación efectiva de este método depende de su validación, lo cual es requisito fundamental para asegurar la exactitud, precisión, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del procedimiento en condiciones locales.

Por lo tanto, se hace necesario validar el método en el Laboratorio TYPSA para la determinación de Microcistina-LR en muestras de agua de consumo humano mediante HPLC-DAD basado en la norma ISO 20179, con el fin de garantizar la confiabilidad de los resultados analíticos y contribuir a la vigilancia sanitaria, afianzando el compromiso de un ambiente

seguro para resolver y garantizar ante externos la validez de resultados, así como el cumplimiento normativo requerido por el ensayo.

1.2.1 Problema general

¿Como validar el método ISO 20179 cumpliendo con los criterios de evaluación del desempeño analítico para la determinación de Microcistina-LR en muestras de agua de consumo humano mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección DAD?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Como establecer la curva de calibración además de evaluar su linealidad en el rango de concentración?
- ¿Como determinar el límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) determinado para asegurar lo establecido en el Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano?
- ¿Como establecer la precisión y veracidad del método analítico?
- ¿Como identificar las fuentes de incertidumbre que contribuyen al resultado de la determinación de Microcistina -LR?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Validar el método ISO 20179 en muestras de agua de consumo humano mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección por arreglo de diodos (HPLC-DAD) para la determinación de Microcistina-LR mediante los criterios de evaluación del desempeño analítico.

1.3.2 Objetivos específicos

- Establecer la curva de calibración del método mediante estándares de Microcistina-LR, evaluando su linealidad en el rango de concentración.
- Determinar los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) asegurando lo establecido en el Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano.
- Establecer la precisión y veracidad del método analítico.
- Identificar las fuentes de incertidumbre que contribuyen en el resultado de la determinación de Microcistina -LR.

1.3 Importancia y alcance de la investigación

La presencia de toxinas como la Microcistina-LR en fuentes de agua representan un riesgo potencial para la salud pública, especialmente cuando estas aguas son destinadas al consumo humano.

Que según el Ministerio de Salud del Perú (2010) en el Decreto Supremo 031-2010-SA define el agua de consumo humano como aquella apta para el uso doméstico diario incluyendo higiene personal, además es catalogada como adecuada para el consumo humano.

El método propuesto por la norma internacional ISO 20179 se basa en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección ultravioleta por arreglo de diodos (DAD), y está diseñado para ofrecer resultados reproducibles y técnicamente sólidos. Considerando las condiciones particulares de operación, los equipos disponibles y el personal técnico capacitado.

Validar este método analítico permite asegurar que los resultados obtenidos cumplan con criterios de calidad como Limite de detección, Limite de cuantificación, precisión, veracidad, rango linealidad e incertidumbre, los cuales son fundamentales para la toma de decisiones en el contexto del control de calidad del agua de consumo humano. Esta investigación es relevante porque proporciona una herramienta validada localmente para la vigilancia de Microcistina-LR, fortalece las capacidades técnicas del Laboratorio TYPSA y cumple con los requisitos exigidos por normas internacionales y entidades reguladoras.

1.4 Limitaciones de la investigación

El presente estudio es de carácter experimental, enfocado en la validación de un método analítico para la determinación de microcistina-LR en muestras de agua de consumo humano. Una de las principales limitaciones identificadas corresponde a la sensibilidad instrumental, dado que las concentraciones de microcistina-LR en agua potable suelen encontrarse en niveles muy bajos (mg/L). En este contexto, el sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD) presenta una sensibilidad suficientemente prometedora para cumplir con lo requerido con el DS-0310-2010.

CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes de estudio

Paéz (2024) en su estudio denominado como ¨Determinación de Microcistina-LR en dos cuerpos de agua dulce de la región andina usando Cromatografía Líquida de alta Eficiencia con Detección Ultravioleta¨ realizado en Colombia se centró en el embalse de Tominé debido a las condiciones hipereutróficas siendo afecto por la proliferación de cianobacterias; su estudio lo desarrolló por medio de la extracción en fase sólida (SPE), seguida por determinación mediante HPLC-UV, el cual empleó las siguientes condiciones cromatográficas de trabajo a un flujo de 1 mL/min con una columna de fase reversa Zorbax SB-C18, usó como fase móvil acetonitrilo y ácido trifluoroacético (TFA), y agua con TFA, en su ensayo se evidenció la detección de la Microcistina-LR a 238 nm y con un tiempo de retención de 14.6 minutos, además se obtuvo una incertidumbre menor al 10%, por lo que las recuperaciones obtenidas fueron muy satisfactorias así como la SPE que facilitó concentración y purificación de las muestras.

Otro estudio fue desarrollado por Peng et al. (2021) el cual se centró en el ¨Desarrollo y comparación de métodos UPLC-ESI-MS y RP-HPLC-VWD para la determinación de microcistina-LR¨ para el análisis de muestras de lago de Erhai ubicado en China, su análisis desarrollado en la cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS) se usó una columna de Hypersil GOLD (1.9 µm, 100 mm x 2.1 mm de diámetro interno) a 30°C, se utilizó 2 fases móvil en gradiente conformada por ácido fórmico y agua ; y metanol a un caudal de 0.4 mL/min, por otra parte la cromatografía líquida de alta resolución con detector UV de longitud de onda variable (HPLC-VWD) se empleó una columna Agilent XDB-C18 (5 µm, 250mm x 4.6mm de diámetro interno) a 35°C y el caudal programado fue de 1 mL/min, con volumen de inyección de 25 µL, los estudios de comparación demostró que para UPLC-MS un rango lineal de 0.08 a 10 µg/L, obteniendo como límite de detección entre 0.03 y 0.05 µg/L y la recuperación varía entre 88.5% - 106.7%, mientras que por HPLC-VWD se obtuvo un rango lineal de 1 a 5000 µg/L, con límite de detección de 0.6 µg/L y demostraron tener una recuperación entre 98.7% y 101,6% , en efecto se demuestra que al utilizar el UPLC-MS se logra mayor sensibilidad para la detección de la Microcistina- LR y el HPLC-VWD sería adecuado para aquellas muestras con sospecha de alta concentración de la Microcistina-LR y así poder evitar la saturación de este contaminante en el sistema cromatográfico.

Por otro lado, el estudio realizado por Shamsollahi et al. (2014) denominado ¨Medición de Microcistina-LR en muestras de agua mediante un método HPLC mejorado¨ el cual se llevó a cabo en Irán, se utilizó una columna C18 con 5 µm de tamaño de partícula y su curva de calibración se realizó con 5 puntos donde se evidenció la linealidad, en su estudio lograron resultados prometedores al reducir el tiempo de retención a 5.33 min con un límite de detección de 0.02 µg/mL evitando el uso del ácido trifluoroacético como modificador orgánico (TFA) en la fase móvil de acetonitrilo, obteniéndose así una buena separación y alta resolución.

El estudio desarrollado por Wei et al. (2011) titulado como ¨ Determinación de microcistina-LR en agua potable mediante espectrometría de masas en tándem UPLC-efectos de matriz y medición¨ en China, se evaluaron los efectos de la matriz al no concentrar previamente las muestras de agua de grifo, en donde se demostró que la fuerza iónica del agua ocasiona supresión de la señal, por otra parte al mantener la fase móvil acuosa por un tiempo más prolongado ayuda a reducir la supresión, pero no se recupera completamente, además se evaluó que a bajas concentraciones de carbono orgánico disuelto (DOC) puede ayudar a que las moléculas de MC-LR se ionicen eficientemente dando lugar a una mejor señal eléctrica, sin embargo al aumentar la concentración del DOC de 1 a 5 mg/L, no se manifiesta cambio significativo en la señal de detección, el estudio logró alcanzar un bajo límite detección (LOD) el cual fue 0.04 µg/L y el de cuantificación (LOQ) fue de 0.1 µg/L, otro de los efectos que se evaluó fue la influencia del pH el cual demostró que al aumentar, se mejora levemente la señal de la Microcistina, finalmente en el estudio se concluye que al agregar MeOH al 4% a las muestras de agua de grifo mejoró la señal de detección, obteniéndose señales al nivel de las soluciones estándar, logrando recuperaciones en el rango de 84.4% y 112.9%.

Sijia et al. (2022) en su investigación denominada ¨Tendencia de variación mensual de los niveles de Microcistina-LR en el río Huangpu (China) mediante aplicaciones de ELISA y HPLC¨ demostraron la correlación en ambas pruebas realizadas con (R^2>0.99), demostrándose así la confiabilidad de la prueba ELISA como metodología sencilla rutinaria y reproducible al obtener un coeficiente de variación menor al 25%, por otra parte la prueba por HPLC permitió al estudio obtener alta precisión y especificidad, sin embargo se recomienda este como análisis confirmatorio, además se investigó el efecto de la temperatura la cual influye significativamente a la proliferación de cianobacterias cuando superan los 30°C.

El estudio desarrollado por Rodríguez et al. (2024) titulado ¨Nuevo reporte de cianobacterias y cianotoxinas en el embalse El Pañe; una amenaza para la calidad del agua en fuentes altoandinas del Perú¨ tuvo como objetivo la determinación de la presencia de cianobacterias en la Arequipa,

el análisis químico se desarrolló mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) donde se confirmó la presencia de la Microcistina-LR en la biomasa de fitoplancton al filtrar el agua, por otra parte en el agua filtrada no se encontró MC-LR, el análisis se fundamente en el detección del pico del ion molecular ($[M+H]^+$ *m/z* 995,54) correspondiente a la Microcistina, además se identificó microcistinas desmetiladas (m/z 981.53) correspondientes a [$Dasp^3$]MC-LR y [Dha^7]MC-LR.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Cianobacterias

El desarrollo global de las floraciones de cianobacterias nocivas (CyanoHABs) se ha convertido en una amenaza que aqueja a la salud humana, en el que las cianobacterias son responsables de la generación de cianotoxinas la cual puede ser transportada por un proceso de aerosolización de toxinas de las floraciones de algas nocivas en cuerpos de agua (Plass & Paerl, 2020).

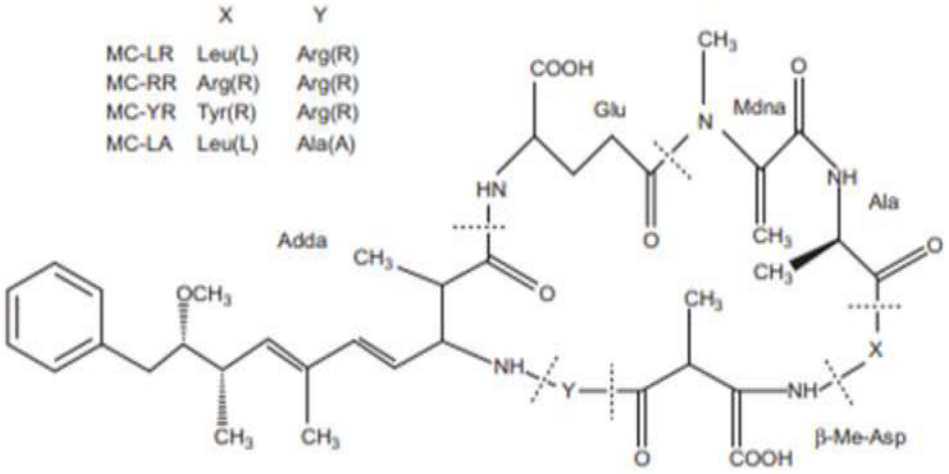
Así mismo, la organización mundial de la salud (OMS) cataloga a las cianobacterias como algas azul verdosas, las podemos encontrar como espumas sobre la superficie del cuerpo de agua, las cianobacterias producen toxinas que se producen de forma natural y se encuentran presentes en los cuerpos de agua por lo que resultan ser toxicas y peligrosas para la salud humana (OMS, 1998).

2.2.2 Microcistina

Las microcistinas son conocidas por ser toxinas provenientes de las cianobacterias que se encuentran principalmente en los lagos y ríos, su estructura se basa por la presencia del heptapéptido monocíclico compuestas por 2 aminoácidos proteicos y 5 no proteicos; la variación en la estructura es por la posición de los aminoácidos proteicos lo cual ha dado lugar a más de 100 variantes de las microcistinas, siendo las más comunes la MC-LR, MC-RR, MC-YR y MC-LA, que se identifican por la posición de los aminoácidos, por ejemplo para la Microcistina-LR contiene leucina (L) en la posición 2 y arginina (R) en la 4, mientras que la MC-RR tiene arginina (R) en la posición 2 y 4, por otra parte la MC-YR contiene tirosina (Y) en la posición 2 y arginina en la 4; en el caso de la MC-LA la leucina (L) se encuentra en la posición 2 y la alanina (A) en la 1 (Xiaoping et al., 2019).

Figura 1

Estructura general de microcistinas: MC-LR, MC-RR, MC-YR y MC-LA



Fuente: Xiaoping et al. (2019)

La Microcistina – LR que entre otros términos también es conocida como Cianoginosina. LR es una cianobacteria que es considerada la más tóxica entre las microcistinas, su estructura está compuesta por un macrociclo de 25 miembros, se caracteriza por ser estables ante variaciones de temperaturas y pH, esto se le atribuye a su estructura cíclica (National Center for Biotechnology Information, s.f.).

Su estructura de la Microcistina- LR se caracteriza por su carácter hidrofílico debido a la presencia de ácidos carboxílicos en su posición 3 y 6 lo cual confiere polaridad a la molécula y se intensifica por la presencia del aminoácido arginina en la posición 4, lo cual le confiere una mayor interacción con el entorno acuoso al tener carga positiva (Arnaud et al., 2016).

En específico la hepatotoxina conocida como Microcistina-LR que es producida por cianobacterias implica una amenaza contra la salud de los humanos como de los animales, principalmente del hígado, a través de diferentes medios de exposición como la ingestión de agua y el contacto directo con alimentos contaminados (Rajpoot et al.,2025).

2.2.3 Métodos de cuantificación de Microcistinas

2.2.3.1 Prueba de Elisa

El método EPA DES 701.0 indica la metodología utilizada para la determinación de Microcistina totales en aguas superficiales, subterráneas y potable, la prueba se basa en la recolección de la muestra, adición de tiosulfato de sodio para neutralizar el cloro en caso se

haya añadido algún oxidante, posteriormente se debe ajustar el pH con hidróxido de sodio (NaOH) o (HCl) entre 5-11, luego se somete a 3 ciclos de lisis de congelación y descongelación cuyo fin es romper las células de cianobacterias y así poder liberar las toxinas intracelulares, al culminar con ese proceso se sigue con el ensayo inmunoenzimático más conocido como la prueba de ELISA el cual se basa en la adición de la muestra así como el estándar en los micropocillos, luego se le agrega el anticuerpo contra el grupo ADDA y se incuban, finalmente se introduce el sustrato el cual será el responsable del color azul al reaccionar con los anticuerpos y se lee los resultados con un lector a 450nm. (Ohio EPA, 2018) (Liangfan et al.,2022).

2.2.3.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La técnica de análisis por cromatografía líquida de alta resolución permite obtener sensibilidad para realizar determinaciones cuantitativas, es de gran utilidad para la determinación de diversas sustancias como aminoácidos, fármaco y otros; para el desarrollo de esta técnica se basa en el uso de una fase móvil que es impulsada por el sistema de bombeo, fase estacionaria que es conocida como la columna donde ocurre la separación cromatográfica, también es necesario el sistema de inyección de la muestra donde se utilizan inyectores automáticos, su importancia radica en la reproducibilidad, por otra parte los detectores permiten al instrumento tener la capacidad de percibir la presencia del compuesto de interés, este responde emitiendo una señal eléctrica, los detectores tienen un rol fundamental en la sensibilidad, respuesta lineal y reproducibilidad (Alfonso, 2009).

2.3 Definición de términos

- **Validación**

  Es el proceso mediante el cual se determinan los parámetros analíticos que permiten demostrar que un método de ensayo, bajo condiciones definidas, presenta un desempeño fiable y acorde con el propósito específico para el que ha sido diseñad (EURACHEM, 2014).

- **Agua de consumo humano**

  Agua segura para beber y adecuada para todos los usos domésticos comunes, incluyendo la higiene personal (Decreto Supremo N.º 031-2010-SA, 2010).

- **Rango lineal**

  Se define como el intervalo de concentraciones dentro del cual un procedimiento de medición produce resultados directamente proporcionales a la cantidad del analito presente,

manteniendo una adecuada relación entre la respuesta del método y la concentración, así como niveles aceptables de precisión y exactitud (Eurachem et al., 2024).

- **Límite de cuantificación (LOQ)**

  Se define como la menor concentración del analito que puede medirse de manera cuantitativa con una precisión y veracidad aceptables, considerando todas las etapas del procedimiento de medición, incluido el muestreo. Este límite representa el punto a partir del cual los resultados obtenidos pueden expresarse con una incertidumbre conocida y aceptable dentro de los criterios de desempeño del método (Eurachem et al., 2024).

- **Límite de detección (LOD)**

  Se define como la menor cantidad o concentración del analito que puede distinguirse razonablemente de una señal en blanco, pero que no necesariamente puede cuantificarse con exactitud. Este límite representa el nivel más bajo en el que se puede afirmar con un nivel de confianza aceptable que el analito está presente en la muestra (Eurachem et al., 2024).

- **Rango de trabajo**

  Es el intervalo de concentraciones del analito dentro del cual el procedimiento de medición puede aplicarse con una precisión, veracidad y linealidad aceptables. Este rango incluye todos los valores en los que el método mantiene un desempeño adecuado, desde el límite inferior de cuantificación hasta la concentración más alta en la que se ha comprobado que la respuesta analítica sigue siendo válida. (Eurachem et al., 2024).

- **Precisión**

  La precisión se define como aquella medida que indica el nivel de concordancia o proximidad entre los resultados obtenidos a partir de mediciones replicadas y se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa (ISO 5721, 2023) (Eurachem, 2025).

- **Veracidad**

  La veracidad es una expresión para producir resultados cuyo valor medio sea cercano al valor de referencia, cuantitativamente se expresa en términos del sesgo, la cual se interpreta como un sesgo pequeño representa una veracidad adecuada (ISO 5721, 2023) (Eurachem, 2025).

- **Incertidumbre**

Es un parámetro que acompaña al resultado de una medición y que indica el rango de valores dentro del cual es razonable que se encuentre el mensurando, considerando la variabilidad inherente al proceso de medición (EURACHEM, 2014).

- **Prueba de Grubbs**

  Método estadístico utilizado para identificar y evaluar la presencia de valores atípicos dentro de un conjunto de datos obtenidos en mediciones repetidas. Esta prueba se aplica cuando se desea determinar si un resultado individual difiere significativamente del resto de los valores, bajo el supuesto de que los datos siguen una distribución normal (Instituto Nacional de Calidad [INACAL], 2017).

- **Prueba de Cochran**

  Es un procedimiento estadístico empleado para detectar la presencia de una varianza anormalmente grande dentro de un conjunto de resultados obtenidos bajo condiciones de repetibilidad o reproducibilidad. Esta prueba permite identificar si uno de los laboratorios o series de mediciones presenta una dispersión significativamente mayor que las demás, lo que podría indicar problemas de consistencia o errores sistemáticos en los datos. (Instituto Nacional de Calidad [INACAL], 2017).

- **Pruebas de h y k Mandel**

  Son métodos estadísticos utilizados para evaluar la coherencia y homogeneidad de los resultados obtenidos en estudios de repetibilidad y reproducibilidad entre laboratorios. La prueba de h Mandel se aplica para examinar si existen diferencias sistemáticas entre las medias de los laboratorios participantes, mientras que la prueba de k Mandel evalúa la consistencia de las dispersiones o desviaciones estándar dentro de cada laboratorio (Instituto Nacional de Calidad [INACAL], 2017).

CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis general

El método basado en la norma ISO 20179 para la determinación de Microcistina-LR por HPLC con detección DAD cumplirá con los parámetros de validación (Limite de detección, Limite de cuantificación, precisión, veracidad, rango linealidad e incertidumbre), y, por tanto, es aplicable de manera confiable en el análisis de muestras de agua de consumo humano

3.1.2 Hipótesis específicos

- El método validado mostrará linealidad en el rango de concentración evaluado.
- Los límites recomendados para la Microcistina-LR estarán dentro de lo recomendado por el Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano (DS 031-2010-SA)
- El método validado presentará alta precisión Establecer la precisión y veracidad del método analítico.
- Se podrán identificar las fuentes de incertidumbre que contribuyen en el resultado de la determinación de Microcistina -LR.

3.2 Variables

3.2.1 Variable Independiente

Validación del método basado en la ISO 20179 por cromatografía líquida de alta resolución con detector DAD

3.2.2 Variable Dependiente

Determinación de la Microcistina-LR en agua de consumo humano

3.3 Operacionalización de las variables

Tabla 1

Operacionalización de variable

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores
Variable Independiente: Validación del método ISO 20179 por HPLC - DAD	Conjunto de procedimientos normalizados que establece la ISO 20179 para la determinación de microcistina mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (DAD).	Aplicación experimental del método ISO 20179 en la determinación de microcistina-LR en muestras de agua de consumo humano, evaluando los parámetros de validación establecidos por la norma.	- Curva de calibración. - Límite de detección (LDM) y límite de cuantificación (LCM). - Precisión y veracidad. - Incertidumbre	- Rango de Trabajo - Coeficiente de correlación (R^2) - LDM - LCM - Precisión - Veracidad
Variable Dependiente: Determinación de Microcistina-LR en muestras de agua de consumo humano	Cantidad de microcistina-LR (toxina hepática producida por cianobacterias) presente en el agua destinada al consumo humano.	Resultado obtenido por el método validado (HPLC-DAD) expresado en miligramos por litro (mg/L)	Resultado	mg/L

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Lugar y tiempo

Laboratorio de TYPSA Perú. De agosto a diciembre de 2025.

4.2 Tipo y diseño de la investigación

- Según su tipo, la investigación es aplicada, ya que se basa en la utilización de conocimientos previamente establecidos con el fin de generar soluciones mediante la implementación.
- Según su diseño, la investigación es experimental, ya que implica la manipulación intencionada de la variable independiente con el fin de analizar su efecto sobre la variable dependiente.

4.3 Población y muestra

La población está constituida por las muestras de agua de consumo humano en Perú y la muestra son muestras de agua de consumo humado que llegan al laboratorio TYPSA Perú.

4.4 Procedimientos. Técnicas e instrumentos de recolección de la información

4.4.1 Instrumentos y materiales

- Cromatógrafo Liquido HPLC – Agilent Technologies 1200
- Columna cromatográfica C-18 30 x 0.25 mm x 0.25 um
- Precolumna
- Ultrasonido (ultrasonic cleaner)
- Bomba de vacío Milipore
- Equipo Visiprep 12 de Supelco
- Cartucho Supelco (Discovery DSC-18)
- Concentrador Hanon
- Viales de vidrio ámbar de 2mL
- Kitasato

4.4.2 Reactivos

- Metanol, grado HPLC
- Acetonitrilo, grado HPLC
- Ácido Trifluoroacetico

- Solución de dilución estándar, solvente de enjuague SPE y solvente de redisolución: Metanol/ Agua (20/80)
- Solución de elución SPE: Metanol/Agua (90/10) con 0.1% de TFA
- Solución de tiosulfato de sodio: Disolver 1g de Na2S2O3 (anhidro o pentahidratado) en 100 mL de agua
- Solución de hidróxido de amonio 1M
- Fase móvil (A): Solución estable a temperatura ambiente por 3 semanas
  En una fiola de 1L, añadir 800 mL de ACN y 500 µl de TFA, enrasar con ACN.
- Fase móvil (B): Solución estable a temperatura ambiente por 2 semanas
  En una fiola de 1 L, añadir 800 mL de agua y 500 µl de TFA, enrasar con agua.
- Estándar de Microcistina 10 ug/mL de la marca CIFGA S.A
- Solución stock de Microcistina: En una fiola de 1 mL, añadir 0.5 mL de metanol y 250 uL de solución stock de microcistina, llevar a volumen con metanol, grado HPLC. (2,5 µg/ml)
- Solución intermedia de Microcistina: En una fiola de 5 mL, añadir 2 mL de metanol y 200 uL de la solución stock, llevar a volumen con metanol, grado HPLC. (0.1 µg/ml)

4.4.2 Procedimiento Experimental

El procedimiento experimental se basa en la metodología descrita en la ISO 20179 para la matriz de estudio, la cual se basó en la extracción de fase sólida mediante el Cartucho de Supelco (Discovery DSC-18), siguiendo lo siguiente:

- La recolección de muestra se hará en un frasco ámbar, al llegar las muestras al laboratorio tienen un tiempo máximo de almacenamiento de 48 hrs, debe estar refrigerado entre 4-8 °C.
- En los cartuchos SPE de Merck se pasará 4 mL de MeOH, posteriormente se agregará 4 mL de agua procurando una velocidad de 10 mL/min.
- Para las aguas de grifo se concentrará las muestras a través de la extracción en fase sólida (SPE)
- Medir el pH de la muestra de agua, este debe estar entre 5 – 8. Si el pH se encuentra por debajo de 5, regular con la solución de hidróxido de amonio; caso contario, regular con ácido trifluoacético.
- Añadir 500 µL de solución de tiosulfato de sodio a 500 mL de muestra de agua y agitar durante 5 minutos.
- Añadir 5 mL de metanol y agitar, posteriormente impulsar el contenido sobre el cartucho a un caudal de 10 mL/min como máximo.

- Al finalizar el paso de la muestra por el cartucho, enjuagar con 4 mL de solución de dilución estándar (metanol/agua) (20/80).
- Desorber o eluir la microcistina con 2 mL de solución de SPE (Metanol/agua) (90/10) y recibirlo en un vial de vidrio de 4 mL
- Concentrar el extracto eluido a 40°C hasta sequedad
- Redisolver con 500 µL de solución de dilución estándar (metanol/agua) (20/80)
- Pasar lo redisuelto a un vial ámbar de 2 mL, tapar y sonicar durante 5 minutos.
- Analizar el extracto directamente al equipo Agilent Technologies 1200 HPLC en donde se empleará como fase móvil (A) la cual consiste en lo siguiente: Fiola de 1L, añadir 800 mL de ACN y 500 µl de TFA, enrasar con ACN, fase móvil (B) En una fiola de 1 L, añadir 800 mL de agua y 500 µl de TFA, enrasar con agua.

4.5 Análisis estadístico

Para el estudio estadístico de los datos, las herramientas utilizadas fueron la hoja de cálculo Excel y el software Minitab.

CAPÍTULO V: RESULTADOS

5.1 Presentación y análisis de los resultados

5.1.1 Curva de calibración, linealidad y rango de trabajo

Los resultados de las curvas de calibración para la evaluación de la linealidad se muestran en la Tabla 1, 2, 3,4,5,6,7,8,9 y 10.

Tabla 2

Respuestas obtenidas para las concentraciones de la curva de calibración de 0.1 mg/L a 1.5 mg/L

Concentración (mg/L)	Curva 1 Área [mAU*s]	Curva 2 Área [mAU*s]	Curva 3 Área [mAU*s]	Área [mAU*s]	Datos de Curva
0.10	3.17	3.47	3.57	3.41	Pendiente:
0.20	6.95	6.78	6.85	6.86	36.13362
0.50	17.94	17.67	17.99	17.86	
1.00	34.73	34.95	34.55	34.74	R^2:
1.50	54.73	54.48	53.95	54.39	0.99922

Nota. La Tabla 2, muestra las respuestas obtenidas para las 3 curvas realizadas por cada analista (A1, A2, A3), en donde se obtuvo como coeficiente de correlación 0.99922.

Figura 2

Curva de calibración 1

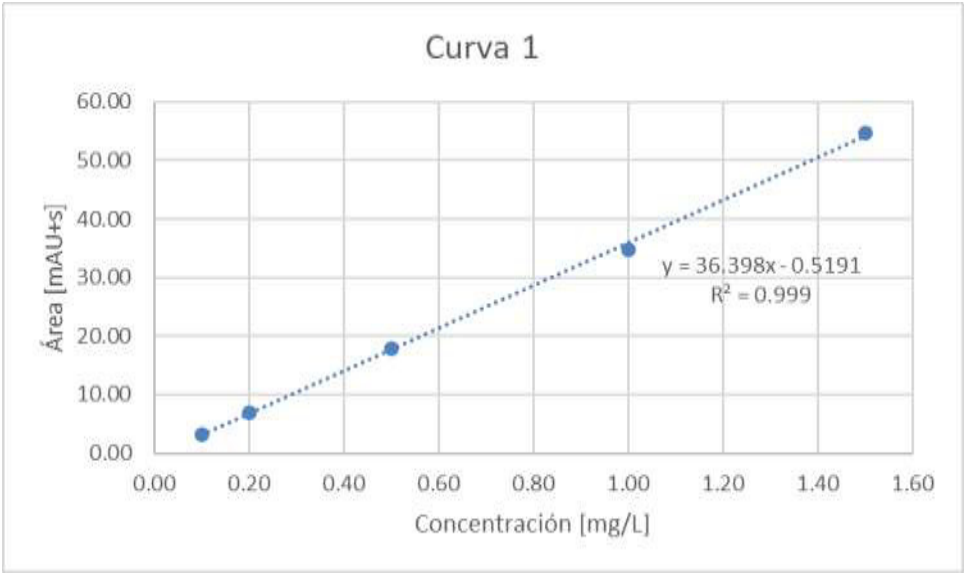


Figura 3

Curva de calibración 2

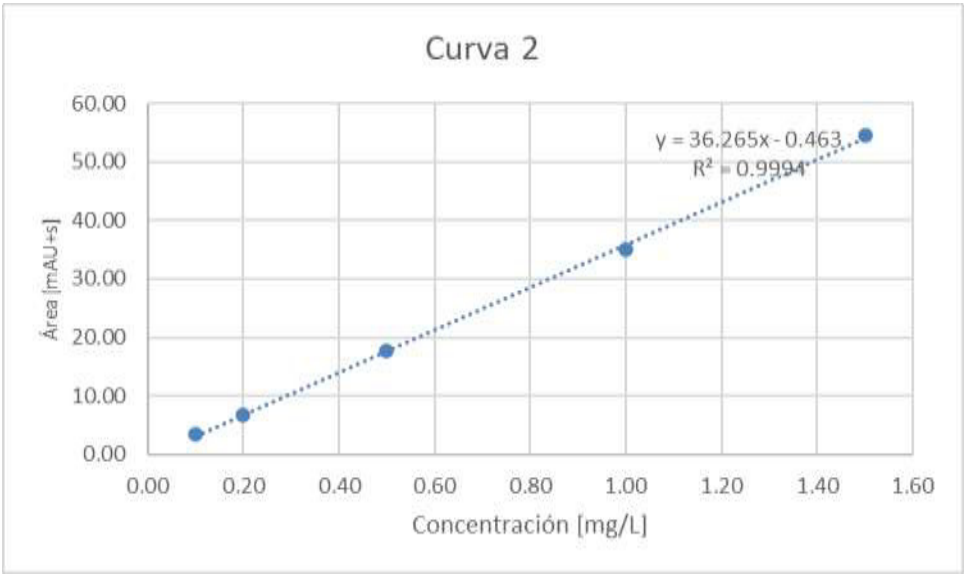


Figura 4

Curva de calibración 3

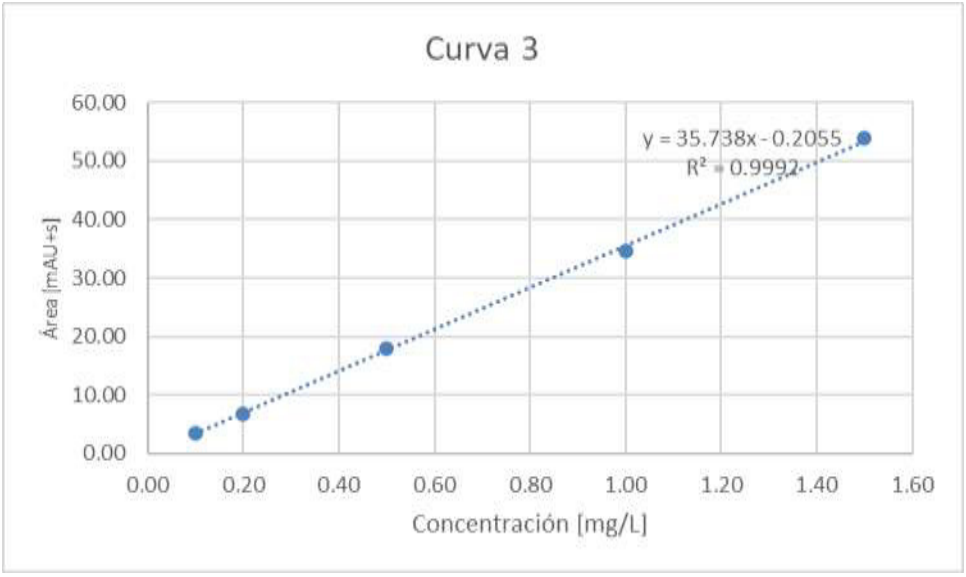


Tabla 3

Ecuación ajustada de regresión por mínimos cuadrados para Curva 1

RESPUESTA	=	-0.519 + 36.398 CONCENTRACIÓN

En la Tabla 3 se muestra la recta obtenida por regresión lineal de mínimos cuadrados para la Curva 1, en cual se mejora el ajuste de los datos, para las Tablas 6 y 9 de la ecuación de ajuste de regresión

se tiene el mismo criterio.

Tabla 4

Resumen del modelo de regresión para la Curva 1

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado(pred)
0.788578	99.90%	99.86%	99.56%

Tabla 5

Cálculo de residuos observado y predicho para la Curva 1

x (mg/L)	Observado	Predicho	Residuo
0.10	3.17	3.1208	+0.0492
0.20	6.95	6.7607	+0.1893
0.50	17.94	17.6802	+0.2598
1.00	34.73	35.8795	–1.1495
1.50	54.73	54.078	+0.6512

Tabla 6

Ecuación ajustada de regresión por mínimos cuadrados para la Curva 2

RESPUESTA	=	-0.466 + 36.266 CONCENTRACIÓN

Tabla 7

Resumen del modelo de regresión para la Curva 2

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado(pred)
0.610327	99.94%	99.92%	99.70%

Tabla 8

Cálculo de residuos observado y predicho para la Curva 2

x (mg/L)	Observado	Predicho	Residuo
0.10	3.47	3.1610	+0.3090
0.20	6.78	6.7879	–0.0076
0.50	17.67	17.6674	+0.0026
1.00	34.95	35.8005	–0.8505
1.50	54.48	53.9335	+0.5465

Tabla 9

Ecuación ajustada de regresión por mínimos cuadrados para la Curva 3

RESPUESTA	=	-0.207 + 35.741 CONCENTRACIÓN

Tabla 10

Resumen del modelo de regresión para la Curva 3

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado(pred)
0.688456	99.92%	99.89%	99.67%

Tabla 11

Cálculo de residuos observado y predicho para la Curva 3

x (mg/L)	Observado	Predicho	Residuo
0.10	3.57	3.3671	+0.2029
0.20	6.85	6.9412	–0.0912
0.50	17.99	17.6635	+0.3265
1.00	34.55	35.5339	–0.9839
1.50	53.95	53.4043	+0.5457

Tabla 12

Evaluación de datos atípicos para el rango de trabajo en agua de consumo mediante la prueba estadística de h y k Mandel, Cochran y Grubbs

NIVEL	**0.0015**	**0.0015**	**0.0015**
Muestra	**Concentración (mg/L)**	**Concentración (mg/L)**	**Concentración (mg/L)**
	A1	**A2**	**A3**
M1- 0-5	0.001470	0.001518	0.001519
M2- 0-5	0.001511	0.001507	0.001479
M3- 0-5	0.001490	0.001499	0.001504
M4- 0-5	0.001498	0.001488	0.001481
M5- 0-5	0.001481	0.001504	0.001478
M6- 0-5	0.001510	0.001491	0.001486
M7- 0-5	0.001476	0.001498	0.001498
M8- 0-5	0.001512	0.001522	0.001521
M9- 0-6	0.001480	0.001504	0.001512
M10- 0-5	0.001479	0.001496	0.001489
PROMEDIO	0.001491	0.001503	0.001496
DES.ESTANDAR	0.000016	0.000011	0.000017
VARIANZA	0.000000	0.000000	0.000000
MEDIA DEL PROMEDIO		0.001	

DES.ESTANDAR PROMEDIO		0.0000145	
h Mandel	-0.412	0.419	-0.007
ABS (h Mandel)	0.412127867	0.419206285	0.007078418
h Mandel Teórico (95%)		1.15	
k Mandel	1.087179226	0.731149263	1.132899857
k Mandel Teórico (95%)		1.29	
Cochran Exp		0.178193082	
Cochran Teórico (95%)		0.4450000	
Grubbs Exp	0.412127867	0.419206285	
Grubbs Teórico (95%)		1.155	

Tabla 13

Criterio de conformidad de h Mandel para las medias de los analistas (A1, A2, A3)

Prueba de h Mandel			
	h Mandel calculado	h Mandel teórico	Conformidad
A1	0.412127867	1.15	C
A2	0.419206285	1.15	C
A3	0.007078418	1.15	C

En la Tabla 13 se muestra el criterio de conformidad (C) respecto al valor crítico de h Mandel obtenido

Tabla 14

Criterio de conformidad de k Mandel para las desviaciones estándares de los analistas (A1, A2, A3)

Prueba de k Mandel			
	k Mandel calculado	k Mandel teórico	Conformidad
A1	1.087179226	1.29	C
A2	0.731149263	1.29	C
A3	1.132899857	1.29	C

El valor de k Mandel obtenido es conforme (C) según el criterio mostrado en el Tabla 14.

Tabla 15

Criterio de conformidad de la prueba de Cochran para las varianzas entre analistas (A1, A2, A3)

Prueba de Cochran		
Cochran calculado	Cochran teórico	Conformidad

0.178193082	0.445	C

El valor de Cochran obtenido es conforme (C) según el criterio mostrado en la Tabla 15

Tabla 16

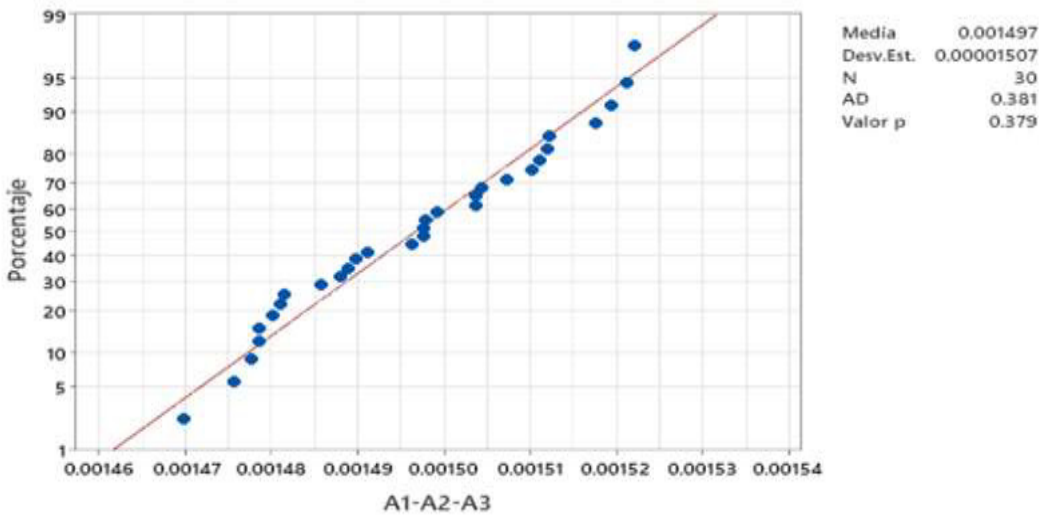
Criterio de conformidad de la prueba de Grubbs máximo y mínimo

Prueba de Grubbs			
Grubbs calculado		Grubbs teórico	Conformidad
A1	0.4121	1.155	C
A2	0.4192	1.155	C

El valor de Grubbs obtenido es conforme (C) según el criterio mostrado en la Tabla 15

Figura 5

Gráfico de normalidad de los datos utilizados para el rango de trabajo en la determinación de MC-LR



En la Figura 5, se muestra la evaluación de normalidad mediante la prueba de Anderson Darling.

Tabla 17

Prueba de homogeneidad de varianzas realizada para el rango de trabajo a los analistas A1-A2-A3 para la MC-LR

Muestra	N	Desv.Est.	IC
A1	10	0.0000160	(0.0000102; 0.0000341)
A2	10	0.0000108	(0.0000069; 0.0000229)
A3	10	0.0000167	(0.0000106; 0.0000355)

En la Tabla 17 se muestra el intervalo de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándar

Tabla 18

Prueba de Bartlett (distribución normal)

Método	Estadística de prueba	Valor p
Bartlett	1.80	0.407

En la Tabla 18 nos indica la prueba de Bartlett donde se obtiene el p-valor de 0.407

Tabla 19

Prueba de Hipótesis para datos obtenidos en el rango de trabajo

Hipótesis Nula H_0	H_0: Los datos son normales
Hipótesis Alternativa H_1	H_1: Los datos no son normales
Conclusión	Rechaza hipótesis alternativa y se acepta hipótesis nula

Figura 6

Gráfico de prueba de igualdad de varianzas: A1; A2; A3

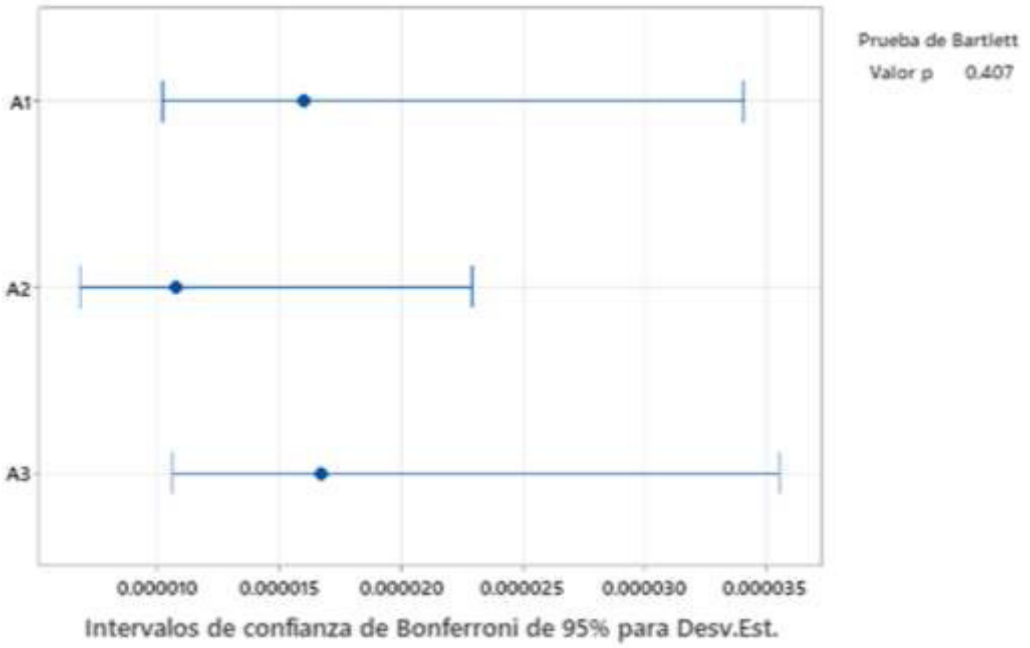


Tabla 20

Prueba de homogeneidad de medias (ANOVA de un factor) para el rango de trabajo

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0.000000	0.000000	1.67	0.207
Error	27	0.000000	0.000000		
Total	29	0.000000			

La Tabla 20, nos indica la prueba de homogeneidad de medias para los tres analistas

Tabla 21

Resumen estadístico del ANOVA de un factor para la comparación entre los analistas A1-A2-A3

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado (pred)
0.0000147	11.02%	4.43%	0.00%

La Tabla 21, nos indica la S (desviación estándar), R^2 (R-cuadrado), R^2 ajustado ajustado y R-cuadrado predicho.

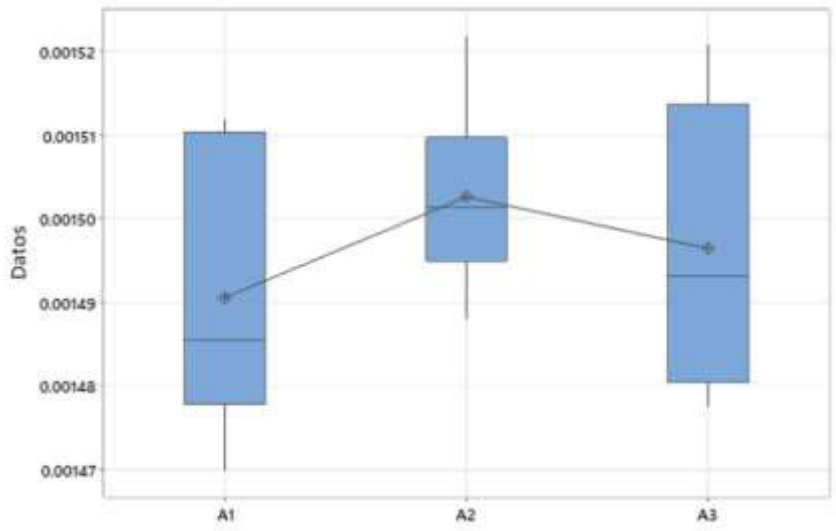
Tabla 22

Resultados obtenidos a través de la prueba estadística del ANOVA de un solo favor para los analistas A1-A2-A3

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
A1	10	0.001491	0.000016	(0.001481; 0.001500)
A2	10	0.001503	0.000011	(0.001493; 0.001512)
A3	10	0.001496	0.000017	(0.001487; 0.001506)

Figura 7

Gráfico de cajas para la prueba de homogeneidad de medias en agua de consumo para la MC-LR



En la Figura 7 de cajas se representa la prueba de homogeneidad de medias desarrollado para el agua de consumo.

Tabla 23

Prueba t de una muestra para A1 en agua de consumo humano en la determinación de MC-LR para verificar la homogeneidad de media

N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para μ	Valor T	Valor p
10	0.001491	0.000016	0.000005	(0.001479; 0.00150205)	-1.86	0.096

Tabla 24

Prueba de Hipótesis para datos obtenidos de la t- student del A1

Hipótesis Nula H_0	H_0: La media experimental no difiere significativamente del valor teórico de 0.0015 mg/L
Hipótesis Alternativa H_1	H_1: La media experimental difiere significativamente del valor teórico de 0.0015 mg/L
Conclusión	Rechaza hipótesis alternativa y se acepta hipótesis nula

Tabla 25

Prueba t de una muestra para A2 en agua de consumo humano en la determinación de MC-LR para verificar la homogeneidad de media

N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para μ	Valor T	Valor p
10	0.001503	0.00011	0.00000341	(0.001495; 0.001510)	0.78	0.457

Tabla 26

Prueba de Hipótesis para datos obtenidos de la t- student del A2

Hipótesis Nula H_0	H_0: La media experimental no difiere significativamente del valor teórico de 0.0015 mg/L
Hipótesis Alternativa H_1	H_1: La media experimental difiere significativamente del valor teórico de 0.0015 mg/L
Conclusión	Rechaza hipótesis alternativa y se acepta hipótesis nula

Tabla 27

Prueba t de una muestra para A3 en agua de consumo humano en la determinación de MC-LR para verificar la homogeneidad de media

N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para μ	Valor T	Valor p
10	0.001496	0.000017	0.000005	(0.001485; 0.0001508)	-0.67	0.520

Tabla 28

Prueba de Hipótesis para datos obtenidos de la t- student del A3

Hipótesis Nula H_0	H_0: La media experimental no difiere significativamente del valor teórico de 0.0015 mg/L
Hipótesis Alternativa H_1	H_1: La media experimental difiere significativamente del valor teórico de 0.0015 mg/L
Conclusión	Rechaza hipótesis alternativa y se acepta hipótesis nula

5.1.2 Límite de Detección y Cuantificación

Los resultados de las pruebas del límite de detección y cuantificación se presentan en las Tablas 29 a la 35 y la Figuras 8.

Tabla 29

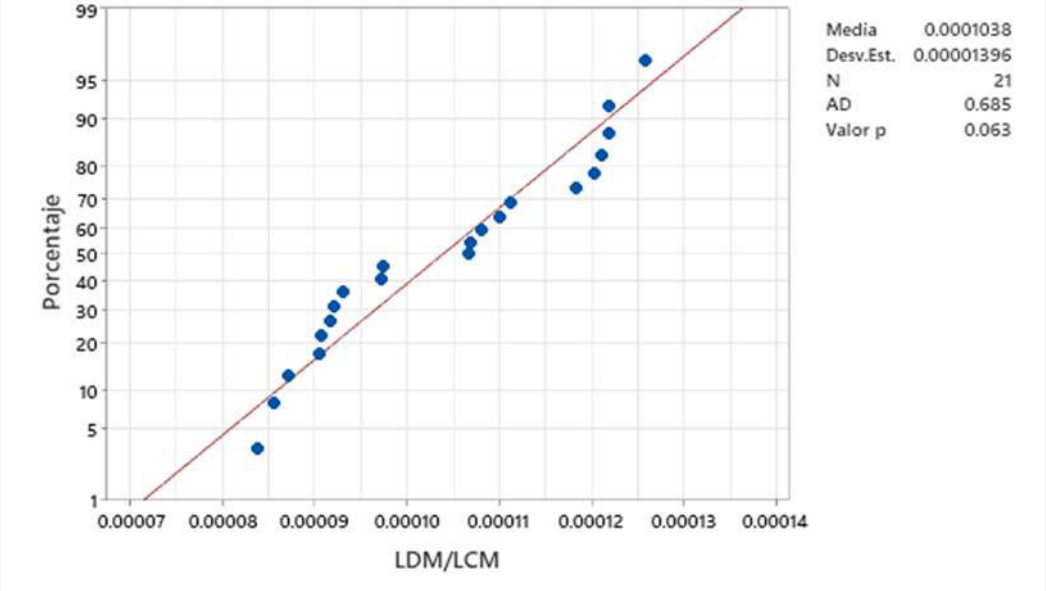
Concentraciones obtenidas del LDM-LCM en mg/L para la determinación de Microcistina-LR

MUESTRA	FECHAS		
	28/10/2025 – A1	29/10/2025 – A2	30/10/2025 – A3
	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)
BK-M	0.00000	0.00000	0.00000
0-1 MC-LR	0.00009	0.00011	0.00008
0-1 MC-LR	0.00012	0.00012	0.00009
0-1 MC-LR	0.00011	0.00010	0.00012
0-1 MC-LR	0.00012	0.00011	0.00011
0-1 MC-LR	0.00009	0.00010	0.00013
0-1 MC-LR	0.00009	0.00009	0.00009
0-1 MC-LR	0.00011	0.00012	0.00009

La Tabla 29, muestra las concentraciones obtenidas por los 3 analistas (A1, A2 y A3) para la cual se realizó la fortificación de 0.0001 mg/L a 7 muestras de agua tipo II.

Figura 8

Gráfica de la prueba de normalidad de Anderson- Darling para LDM/LCM



La Figura 8, muestra un p-valor de la prueba de normalidad de Anderson Darling el cual resultó ser de 0,063 siguiendo una distribución normal al ser mayor al nivel de significancia de 0.05.

Tabla 30

Prueba de Hipótesis para datos de la Figura 7

Hipótesis Nula H_0	H_0: Los datos son normales
Hipótesis Alternativa H_1	H_1: Los datos no son normales
Conclusión	Rechaza hipótesis alternativa y se acepta hipótesis nula

Tabla 31

Prueba de Grubbs de valores atípicos para LDM/LCM

Variable	N	Media	Desv.Est.	Mín.	Máx.	G	P
LDM/LCM	21	0.000104	0.000014	0.000084	0.000126	1.44	1.000

La Tabla 31, nos muestra la prueba de valores atípicos de Grubbs mínimo para un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 32

Prueba de Hipótesis para datos de la Tabla 31

Hipótesis Nula H_0	H_0: Todos los valores de los datos provienen de la misma población normal
Hipótesis Alternativa H_1	H_1: El valor más pequeño de los datos es un valor atípico
Conclusión	Rechaza hipótesis alternativa y se acepta hipótesis nula

Tabla 33

Prueba de Grubbs de valores atípicos para LDM/LCM

Variable	N	Media	Desv.Est.	Mín.	Máx.	G	P
LDM/LCM	21	0.000104	0.000014	0.000084	0.000126	1.57	1.000

La Tabla 33, nos muestra la prueba de valores atípicos de Grubbs máximo para un nivel de significancia de 0.05

Tabla 34

Prueba de Hipótesis para datos de la Tabla 33

Hipótesis Nula H_0	H_0: Todos los valores de los datos provienen de la misma población normal
Hipótesis Alternativa H_1	H_1: El valor más grande de los datos es un valor atípico

Conclusión	Rechaza hipótesis alternativa y se acepta hipótesis nula

Tabla 35

Evaluación del límite de detección y cuantificación para la Microcistina-LR

Nº Datos	Blanco (mg/L)	Blanco Fortificado (mg/L)
1	0.00000	0.00009
2	0.00000	0.00012
3	0.00000	0.00011
4	0.00000	0.00012
5	0.00001	0.00009
6	0.00000	0.00009
7	0.00000	0.00011
8	0.00000	0.00011
9	0.00001	0.00012
10	0.00000	0.00010
11	0.00000	0.00011
12	0.00000	0.00010
13	0.00001	0.00009
14	0.00000	0.00012
15	0.00000	0.00008
16	0.00000	0.00009
17	0.00001	0.00012
18	0.00000	0.00011
19	0.00000	0.00013
20	0.00000	0.00009
21	0.00000	0.00009
Media = x	0.00000	0.00010
s = Desviación Estándar	0.00000	0.000014
Límite de Detección Instrumental (LDI) mg/L	0.00001	
Límite de Detección del Método (LDM): mg/L	0.00004	
Límite de Cuantificación (LCM): mg/L	0.00013	

5.1.3 Precisión evaluado para los 3 niveles de fortificación

Tabla 36

Conjuntos de datos obtenidos a partir de la fortificación de 0.0005 mg/L a 10 muestras de agua de consumo obtenidas para cada analista (A1-A2-A3)

NIVEL	**0.5**	**0.5**	**0.5**

Muestra	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)
	A1	A2	A3
M1- 0-5	0.000489	0.000478	0.000467
M2- 0-5	0.000502	0.000508	0.000482
M3- 0-5	0.000477	0.000477	0.000507
M4- 0-5	0.000491	0.000508	0.000498
M5- 0-5	0.000504	0.000459	0.000505
M6- 0-5	0.000496	0.000498	0.000472
M7- 0-5	0.000502	0.000504	0.000495
M8- 0-5	0.000487	0.000503	0.000510
M9- 0-5	0.000492	0.000490	0.000494
M10- 0-5	0.000503	0.000481	0.000466

La Tabla 36 nos muestra las concentraciones obtenidas de las muestras de agua de consumo después del proceso de extracción

Tabla 37

Resultados obtenidos a partir de la Tabla 36 para el análisis estadístico de h de Mandel para los 3 analistas (A1-A2-A3)

	PROMEDIO	DES. ESTANDAR	VARIANZA	h Mandel	ABS (h Mandel)
A1	0.000494	0.0000087	0.00000	0.201	0.201
A2	0.000491	0.0000164	0.00000	-0.064	0.064
A3	0.00049	0.0000167	0.00000	-0.136	0.136
MEDIA	0.000492	0.0000140			

La Tabla 37 nos muestra la prueba estadística de h de Mandel para la detección de valores atípicos, donde se realizó previamente la determinación del promedio de los 10 datos por analista, la desviación estándar y varianza.

Tabla 38

Criterio de conformidad de h de Mandel para cada analista (A1, A2, A3)

CONFORMIDAD DE PRUEBA h Mandel			
	h Mandel	h Mandel teórico (95%)	Criterio
A1	0.201		C
A2	0.064	1.15	C
A3	0.136		C

La Tabla 38 nos muestra el valor experimental obtenido estadísticamente del h Mandel y el teórico.

Tabla 39

Resultados estadísticos obtenidos en la prueba de k Mandel

	DES.ESTANDAR	VARIANZA	k Mandel
		A1	
PRUEBA DE k Mandel	0.000009	0.00000	0.6054
		A2	
	0.000016	0.00000	1.1372
		A3	
	0.000017	0.00000	1.1576

En la Tabla 39 nos muestra la desviación estándar y varianza utilizadas para el cálculo de K Mandel experimental.

Tabla 40

Criterio de conformidad para la prueba de k Mandel

CONFORMIDAD DE PRUEBA k Mandel			
	k Mandel	k Mandel teórico (95%)	Criterio
A1	0.6054		C
A2	1.1372	1.29	C
A3	1.1576		C

En la Tabla 40 nos detalla el criterio de conformidad el cual está establecido para un nivel de significancia del 5 % donde el Mandel teórico es de 1.29

Tabla 41

Resultados de la prueba de Cochran para un 95 % de confianza

	VARIANZA	k Cochran
	A1	
	0.00000	
PRUEBA DE Cochran	A2	0.431
	0.00000	
	A3	
	0.00000	

En la Tabla 41 se detalle la prueba de Cochran para las varianzas entre analistas

Tabla 42

Criterio de conformidad para la prueba de Cochran

CONFORMIDAD DE PRUEBA Cochran		
Cochran	Cochran teórico (95%)	Criterio
0.431	0.445	C

Tabla 43

Resultados de la prueba de Grubbs máximo y mínimo para la identificación de valores atípicos

	ANALISTA	PROMEDIO	MEDIA DEL PROMEDIO	DES. ESTANDAR	DES.ESTANDAR PROMEDIO	GRUBBS
PRUEBA DE GRUBBS	A1	0.0004943		0.0000087		0.2005
	A2	0.0004906	0.491	0.0000164	0.0000140	-
	A3	0.0004896		0.0000167		0.1361

En la Tabla 43 se muestra la prueba de Grubbs desarrolladas para A1-A2-A3

Tabla 44

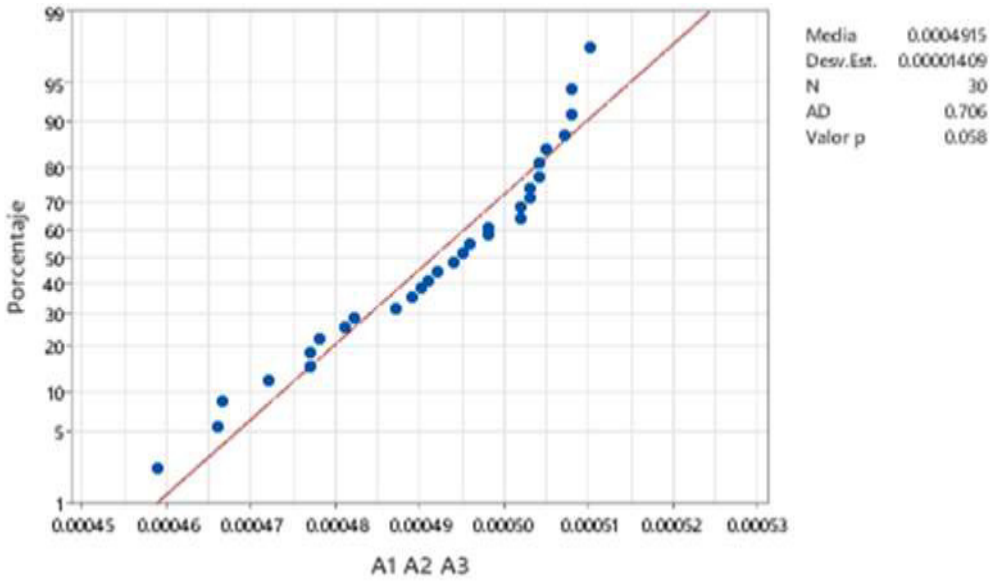
Criterio de conformidad para la prueba de Grubbs según el Grubbs crítico

CONFORMIDAD DE PRUEBA DE GRUBBS		
GRUBBS MAX	Grubbs teórico (95%)	Criterio
0.2005	1.155	C
GRUBBS MIN		-
0.1361		C

La Tabla 44 nos detalla el Grubbs crítico de 1.155 para un nivel de confianza de 95%

Figura 9

Gráfico de Normalidad de datos para la MC-LR en agua de consumo



La Figura 9 nos muestra la prueba de normalidad de Anderson Darling para A1-A2-A3

Tabla 45

Prueba de homogeneidad de varianzas para A1-A2-A3 en agua de consumo para la MC-LR

Muestra	N	Desv.Est.	IC
A1	10	0.0000087	(0.0000056; 0.0000186)
A2	10	0.0000164	(0.0000105; 0.0000350)
A3	10	0.0000167	(0.0000107; 0.0000356)

En la Tabla 45 nos indica los intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándar

Tabla 46

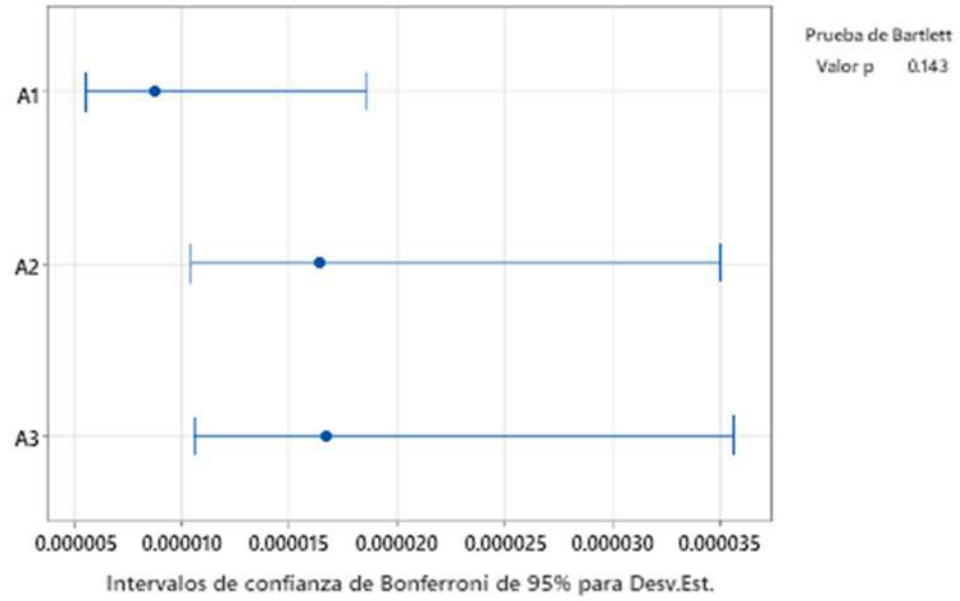
Prueba de Bartlett (distribución normal)

Método	Estadística de prueba	Valor p
Bartlett	3.98	0.143

En la Tabla 46 nos indica la prueba de Bartlett donde se obtiene el p-valor de 0.143

Figura 10

Gráfico de prueba de igualdad de varianzas: A1; A2; A3



El grafico 10 nos muestra la prueba de homogeneidad de varianzas realiza para la MC-LR en agua de consumo.

Tabla 47

Prueba de homogeneidad de medias (ANOVA de un factor)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0.000000	0.000000	0.29	0.748
Error	27	0.000000	0.000000		
Total	29	0.000000			

La Tabla 47 nos indica la prueba de homogeneidad de medias para los tres analistas.

Tabla 48

Resumen estadístico del ANOVA de un factor para la comparación entre los analistas A1-A2-A3

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado (pred)
0.0000144	2.13%	0.00%	0.00%

La Tabla 48 nos indica la S (desviación estándar), R^2 (R-cuadrado), R^2 ajustado ajustado y R-cuadrado predicho.

Tabla 49

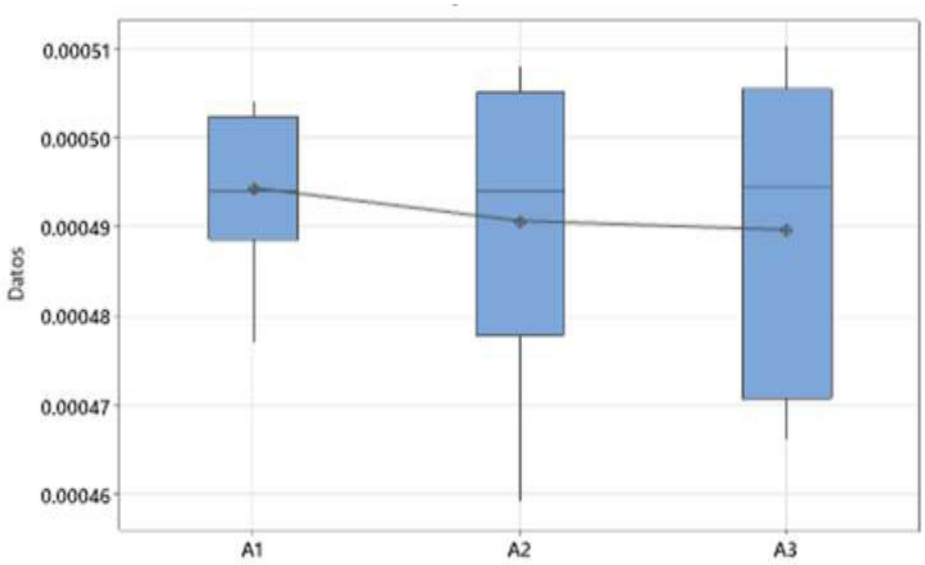
Resultados obtenidos por la prueba estadística del ANOVA de un solo favor para la homogeneidad de medias en los analistas A1-A2-A3

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
A1	10	0.000494	0.000009	(0.000485; 0.000504)
A2	10	0.000491	0.000016	(0.000481; 0.000500)
A3	10	0.000490	0.000017	(0.000480; 0.000499)

En la Tabla 49 nos muestra la cantidad de números de mediciones por analistas los cuales fueron 10, la media, desviación estándar y el intervalo de confianza de 95% (IC).

Figura 11

Gráfico de homogeneidad de medias en agua de consumo para la MC-LR



En la Figura 11 de cajas se representa la prueba de homogeneidad de medias desarrollado para el agua de consumo.

Posteriormente a realizar las pruebas estadísticas previamente, se realiza la evaluación de la precisión la cual se basa en la NTP- ISO 5725 en donde se determinará la varianza de repetibilidad S^2r y reproducibilidad S^2R mostrados en la Tabla 51.

Tabla 50

Resultados obtenidos para la evaluación de la precisión intermedia, a partir de las varianzas y valores intermedios denotados como T1, T2, T3, T4 y T5

MC-LR				
Nivel		**0.100**	**0.500**	**1.500**
Analista		**Conc. [mg/L]**	**Conc. [mg/L]**	**Conc. [mg/L]**
A1		0.000090	0.000489	0.001470
		0.000120	0.000502	0.001511
		0.000110	0.000477	0.001490
		0.000120	0.000491	0.001498
		0.000090	0.000504	0.001481
		0.000090	0.000496	0.001510
		0.000110	0.000502	0.001476
		0.000094	0.000487	0.001512
		0.000098	0.000492	0.001480
		0.000098	0.000503	0.001479
A2		0.000110	0.000478	0.001518
		0.000120	0.000508	0.001507
		0.000100	0.000477	0.001499
		0.000110	0.000508	0.001488
		0.000100	0.000459	0.001504
		0.000090	0.000498	0.001491
		0.000120	0.000504	0.001498
		0.000102	0.000503	0.001522
		0.000099	0.000490	0.001504
		0.000096	0.000481	0.001496
A3		0.000080	0.000467	0.001519
		0.000090	0.000482	0.001479
		0.000105	0.000507	0.001504
		0.000110	0.000498	0.001481
		0.000110	0.000505	0.001478
		0.000090	0.000472	0.001486
		0.000090	0.000495	0.001498
		0.000096	0.000510	0.001521
		0.000101	0.000494	0.001512
		0.000105	0.000466	0.001489
Promedio	A1	0.0001019	0.0004943	0.0014907
	A2	0.0001048	0.0004906	0.0015027
	A3	0.0001018	0.0004896	0.0014967
DESVEST	A1	0.0000121	0.0000087	0.0000159
	A2	0.0000084	0.0000164	0.0000109
	A3	0.0000104	0.0000167	0.0000165
Varianza	A1	0.000000000146	0.000000000076	0.000000000254
	A2	0.000000000099	0.000000000270	0.000000000118
	A3	0.000000000236	0.000000000279	0.000000000273
p	A1/A2/A3	3.0000000	3.0000000	3.0000000
n	A1	10.0000000	10.0000000	10.0000000
	A2	10.0000000	10.0000000	10.0000000
	A3	10.0000000	10.0000000	10.0000000
T3		30.0000000	30.0000000	30.0000000

	A1	100.0000000	100.0000000	100.0000000
n2	A2	100.0000000	100.0000000	100.0000000
	A3	100.0000000	100.0000000	100.0000000
T4		300.0000000	300.0000000	300.0000000
n-1	A1/A2/A3	9.0000000	9.0000000	9.0000000
	A1	0.00000000132	0.00000000069	0.00000000228
(n-1)*si2	A2	0.00000000089	0.00000000243	0.00000000106
	A3	0.00000000212	0.00000000251	0.00000000246
T5		0.00000000433	0.00000000563	0.00000000580
	A1	0.0010189	0.0049430	0.0149070
n*y	A2	0.0010480	0.0049060	0.0150270
	A3	0.0010179	0.0048960	0.0149670
T1		0.0030849	0.0147450	0.0449010
	A1	0.0000001	0.0000024	0.0000222
n*y2	A2	0.0000001	0.0000024	0.0000226
	A3	0.0000001	0.0000024	0.0000224
T2		0.0000003	0.0000072	0.0000672
Sr^2		0.000000000160	0.000000000208	0.000000000215
SL^2		0.0000000	0.0000000	0.0000000
S^2R		0.0000000	0.0000000	0.0000000
m		0.0001028	0.0004915	0.0014967
$\mathbf{S_r}$		0.0000127	0.0000144	0.0000147
$\mathbf{S_R}$		0.0000137	0.0000154	0.0000147

Tabla 51

Resultados obtenidos para la determinación de la desviación estándar relativa de repetibilidad (RSDr) y reproducibilidad (RPDR)

m	Sr	SR	RSDr	RSDR	%RSDr	%RSDR
0.0001028	0.0000127	0.0000137	0.1231266	0.1328176	12.31	13.28
0.0004915	0.0000144	0.0000154	0.0293717	0.0313765	2.94	3.13
0.0014967	0.0000154	0.0000147	0.0103037	0.0097962	1.03	0.98

5.1.4 Veracidad para muestras de agua

Tabla 52

Prueba t de una muestra para A1 en agua de consumo humano en la determinación de MC-LR

N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para μ
10	0.000494	0.000009	0.000003	(0.000488; 0.000501)

Tabla 53

Prueba de hipótesis para la t de student de una muestra para A1

Hipótesis nula	Hipótesis alterna
H_0: $\mu = 0.0005$	H_1: $\mu \neq 0.0005$
Valor T	**Valor p**
-2.06	0.069

Figura 12

Gráfico de cajas de la prueba t de una muestra para A1

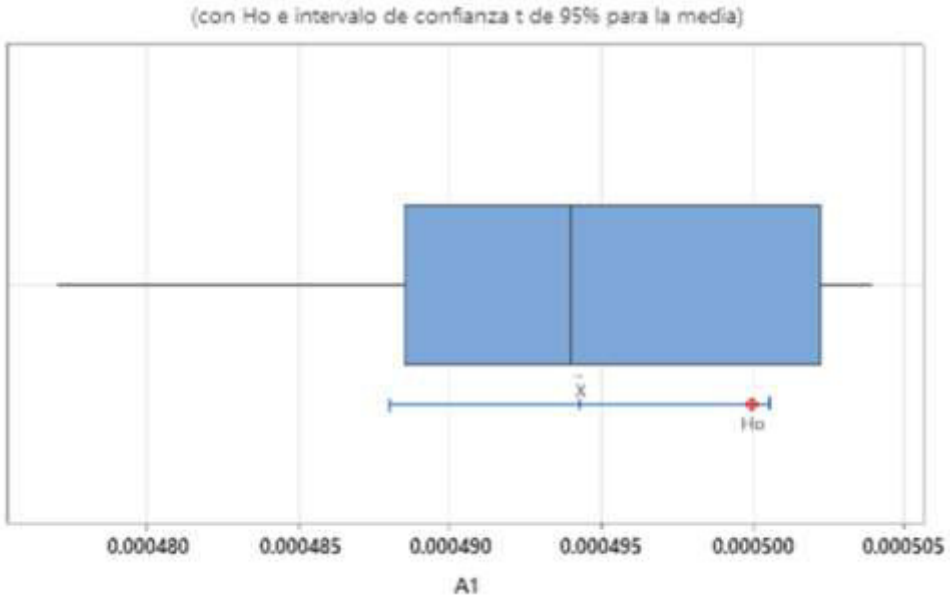


Tabla 54

Prueba t de una muestra para A2 en agua de consumo humano en la determinación de MC-LR

N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para μ
10	0.000491	0.000016	0.000005	(0.000479; 0.000502)

Tabla 55

Prueba de hipótesis para la t de student de una muestra para A2

Hipótesis nula	Hipótesis alterna
H_0: $\mu = 0.0005$	H_1: $\mu \neq 0.0005$
Valor T	**Valor p**
-1.81	0.104

Figura 13

Gráfico de cajas de la prueba t de una muestra para A2

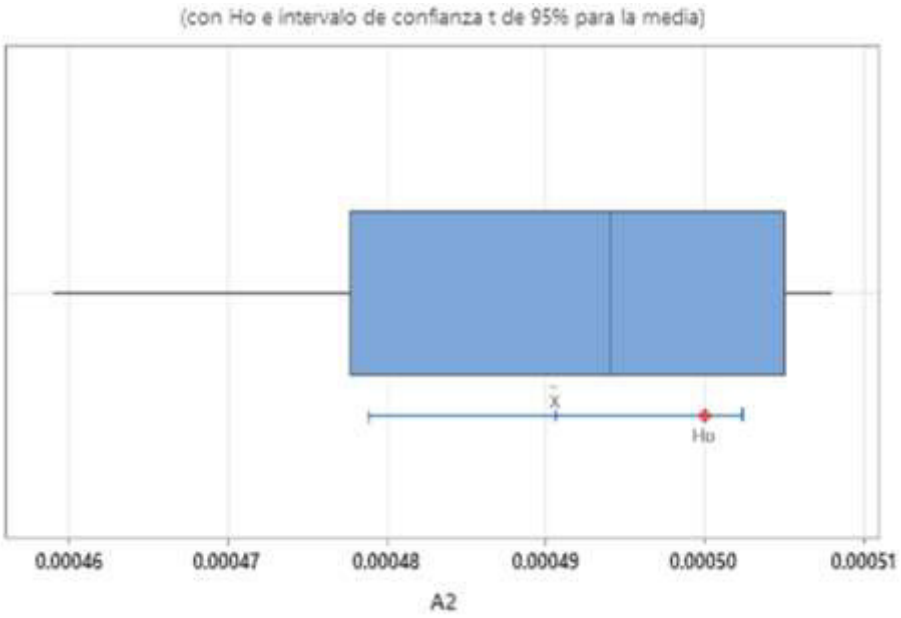


Tabla 56

Prueba t de una muestra para A3 en agua de consumo humano en la determinación de MC-LR

N	*Media*	*Desv.Est.*	*Error estándar de la media*	*IC de 95% para μ*
10	*0.000490*	*0.000017*	*0.000005*	*(0.000478; 0.000502)*

Tabla 57

Prueba de hipótesis para la t de student de una muestra para A3

Hipótesis nula	**Hipótesis alterna**
H_0: $\mu = 0.00005$	H_1: $\mu \neq 0.00005$
Valor T	**Valor p**
-1.97	0.081

Figura 14

Gráfico de cajas de la prueba t de una muestra para A3

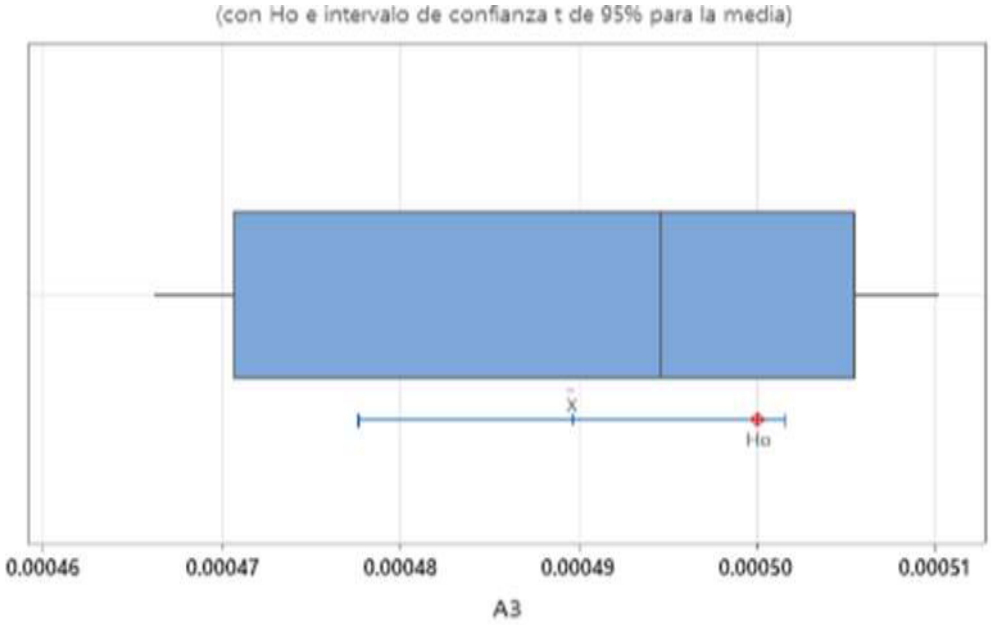


Tabla 58

Prueba de t de student de un factor, determinación del sesgo (b), sesgo relativo porcentual (b%) y recuperación relativa porcentual (R%)

Analista	0.0001 Conc. [mg/L]	0.0005 Conc. [mg/L]	0.0015 Conc.[mg/L]
A1	0.00009	0.00049	0.00147
	0.00012	0.00050	0.00151
	0.00011	0.00048	0.00149
	0.00012	0.00049	0.00150
	0.00009	0.00050	0.00148
	0.00009	0.00050	0.00151
	0.00011	0.00050	0.00147
	0.00009	0.00049	0.00151
	0.00010	0.00049	0.00148
A2	0.00010	0.00050	0.00148
	0.00011	0.00048	0.00152
	0.00010	0.00051	0.00151
	0.00010	0.00048	0.00150
	0.00011	0.00051	0.00148
	0.00010	0.00046	0.00150
	0.00009	0.00050	0.00149
	0.00011	0.00050	0.00150
	0.00010	0.00050	0.00152
	0.00010	0.00049	0.00150
	0.00009	0.00048	0.00150
A3	0.000080	0.00047	0.00152
	0.000090	0.00048	0.00148
	0.000105	0.00051	0.00150

		0.000110	0.00050	0.00148
		0.000110	0.00051	0.00147
		0.000090	0.00047	0.00148
		0.000090	0.00050	0.00150
		0.000096	0.00051	0.00152
		0.000101	0.00049	0.00151
		0.000105	0.00047	0.00148
Valor Teórico		0.00010	0.00050	0.00150
	A1	0.00010	0.00049	0.00149
Promedio	A2	0.00010	0.00049	0.00150
	A3	0.00010	0.00049	0.00149
Promedio de Promedios		0.000100	0.000492	0.001493
	A1	0.000012	0.000009	0.000016
DESVEST	A2	0.000008	0.000016	0.000012
	A3	0.000010	0.000017	0.000019
DESVEST		0.0000101	0.0000141	0.0000162
	t calculado	0.05	1.91	1.32
t- student	t critico	4.30	4.30	4.30
	C/NC	C	C	C
Sesgo (b)		0.0000002	0.0000085	0.0000067
Sesgo relativo porcentual (%b)		-0.17	-1.70	-0.45
Recuperación relativa porcentual (%R)		99.829105	98.300000	99.551111

5.1.5 Estimación de la incertidumbre de medición

Figura 15

Identificación de las fuentes de incertidumbre

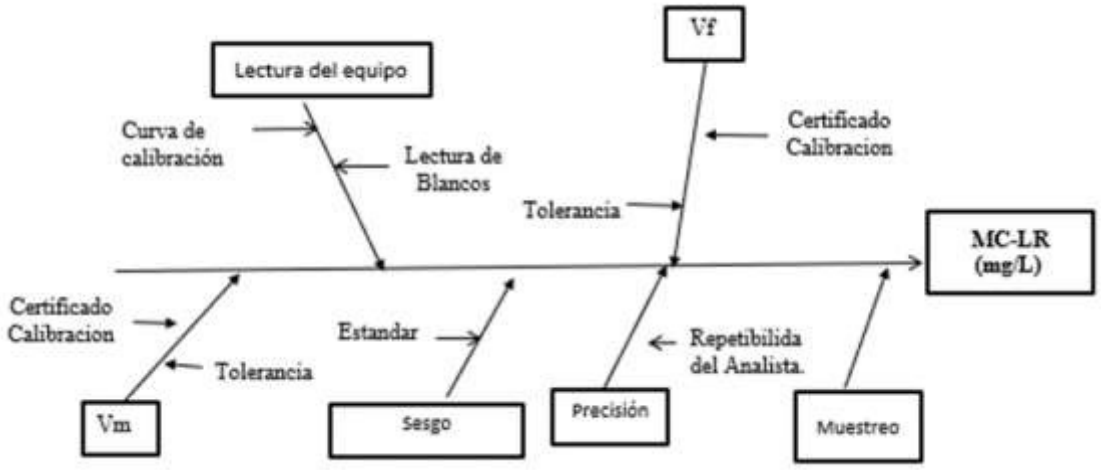


Tabla 59

Determinación de fuente de incertidumbre en muestreo

AGUA DE CONSUMO									
	Muestreo 1		Promedio	D = /X1-X2/	Muestreo 2		Promedio	D = /X1-X2/	D = /Promedio1 - Promedio2/
	Analista de campo 1				Analista de campo 2				
Replica 1	0.00050	0.00049	0.00049	0.00001	0.00050	0.00050	0.00050	0.00001	0.00001
Replica 2	0.00049	0.00049	0.00049	0.00000	0.00050	0.00051	0.00050	0.00000	0.00002
Replica 3	0.00048	0.00050	0.00049	0.00002	0.00050	0.00047	0.00048	0.00004	0.00001
Replica 4	0.00049	0.00048	0.00048	0.00001	0.00049	0.00050	0.00050	0.00001	0.00002
Replica 5	0.00050	0.00051	0.00051	0.00001	0.00048	0.00051	0.00049	0.00002	0.00001
Replica 6	0.00050	0.00048	0.00049	0.00002	0.00047	0.00049	0.00048	0.00001	0.00001
Replica 7	0.00050	0.00051	0.00051	0.00001	0.00048	0.00047	0.00047	0.00001	0.00004
Promedio			0.00049	0.00001			0.00049	0.00001	0.00002

Tabla 60

Valores obtenidos para la determinación de la desviación de estándar de muestreo

D análisis	Media de rango de análisis 0.000013
S análisis	Desviación Estándar de análisis 0.000012
D medición	Media de rango de medición 0.00002
S medición	Desviación Estándar de medición 0.000016
S sampling	0.000014

Tabla 61

Cálculo de incertidumbre de medición

Magnitud de Entrada	Valor	Incertidumbre Original	Unidades	Distribución	Incertidumbre Estándar $u(x_i)$	Coeficiente de Sensibilidad	Contribución $u_i(y)$
Lectura del equipo	0.5	---	mg/L	---	0.01	0.0010	7.66E-11
Concentración de la muestra a partir de la curva (Cl)	---	0.0087	mg/L	Normal, K=1	0.01	---	---
Concentración del blanco a partir de la Curva	---	0.0000	mg/L	Normal, K=1	0.00	---	---
Vf	0.5	---	mL	---	0.0001	0.00	4.58E-13
Certificado de Calibración	---	0.00067	mL	Normal, K=2	0.0003	---	---
Tolerancia	---	0.00288	mL	Triangular	0.001	---	---
Vm	500	---	mL	---	0.04	0.00	1.76E-15
Certificado de Calibración	---	0.021	mL	Normal, K=2	0.01	---	---
Tolerancia	---	-0.199	mL	Triangular	-0.04	---	---
Precisión	---	1.54E-05		Normal, K=1	0.00	1.0	7.91E-12
Sesgo	---	8.50000E-06		Normal, K=1	0.00	1.0	7.23E-11
Muestreo	---	1.41E-05		Normal, K=1	0.00	1.0	2.01E-10
Incertidumbre Estándar Combinada						0.000019	
Incertidumbre Expandida						0.000038	

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

Los resultados expuestos para la linealidad evaluada a partir de la curva de calibración por regresión de mínimos cuadrados se muestran en la Tabla 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, en donde se desarrolló 5 puntos calibración y 3 réplicas por concentración de forma independiente, obteniéndose para la curva 1, 2 y 3 un coeficiente de correlación de 0.999, 0.994, 0.9992, respectivamente por lo que se cumple con el desempeño analítico de linealidad, que conforme a lo que indica la guía para la realización de la validación de métodos de ensayo (2015) el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0.99, además se realizó la inspección visual del tipo de curva que conforme a los resultados se alinea a una curva lineal al plotear la concentración (eje x) en función de la respuesta (eje y) como se muestra en la Figura 2, 3 y 4 los cuales corresponden a las curvas de calibración para los analistas (A1, A2 y A3), así mismo se muestra los coeficientes del modelo de regresión lineal para cada curva de los analistas (A1,A2,A3) en el que el intercepto resulta -0.519, -0.466 y -0.207, respetivamente encontrándose cerca a cero lo cual es aceptable, además se comprobó visualmente la ausencia de valores atípicos conforme la Guía de laboratorio para la validación de métodos de la Eurachem (2025), así mismo al determinar las trazas de residuo entre en valor observado y predicho que se muestra en la Tabla 5, 8 y 11 se cumple con la Eurachem en el rango evaluado ya que nos establece como criterio de linealidad que el residuo se debe encontrar alrededor de cero. Queda establecido para el análisis estadístico del rango de trabajo que se muestra en la Tabla 20 correspondiente al análisis de varianza (ANOVA) mostró un valor de F de 1.67 la cual se obtuvo a partir de la media cuadrática de la regresión (MC regresión) entre la media cuadrática del error (MC error), el p-valor obtenido fue de 0.207 el cual es mayor al nivel de significancia de 0.05, se demuestra en el modelo de regresión que es estadísticamente significativo confirmando así la equivalencia entre las medias de los analistas, esto quiere decir que los 3 analistas trabajan con la misma media.

A partir de las concentraciones obtenidas del LDM y LCM en mg/L para la determinación de Microcistina-LR que se muestra en la Tabla 29, se realizó en análisis de normalidad como se muestra en la Figura 7 la prueba de normalidad de Anderson Darling para nuestros datos del LDM/LCM, se obtuvo un p-valor de 0.063 siendo este mayor al nivel de significancia de 0.05 (p-valor > 0.05), por lo que la hipótesis nula es aceptada y se rechaza la hipótesis nula; en ese sentido queda demostrado que los datos siguen una distribución

normal lo cual se interpreta que al 95 % de confianza se sigue una distribución normal, siendo el límite homogéneo. Así mismo se realizó la prueba estadística de Grubbs para la identificación de valores atípicos, donde se obtuvo como Grubbs máximo 1.57 y el mínimo fue de 1.44, por lo tanto, la prueba es menor al valor crítico de Grubbs al 5% quedando aceptado el ítem probado según lo indica la ISO 5725.

De los datos mostrados en la Tabla 36 la cual representan los resultados de la concentración de 0.0005 mg/L a las muestras fortificadas de agua de consumo a partir de ellos se evaluó la prueba estadística de h Mandel que se muestra en la Tabla 37, donde previamente se realizó la desviación estándar muestral conforme a la Eurachem por lo que la estimación se realiza a partir de una muestra, el h Mandel obtenido fueron para A1, A2 y A3 de 0.201, 0.064 y 0.136, respectivamente. Conforme a lo mencionado se demuestra la ausencia de valores atípicos por medio de la prueba de h de Mandel ya que al comparar lo obtenido se demuestra que no superan al valor crítico demostrándose que la media de cada analista no es significativamente diferente siendo la precisión intermedia aceptable. Por otra parte en la Tabla 40 se muestra el estadístico k Mandel en donde se determinó a partir de la desviación estándar y desviación estándar combinada, el cual nos permitió describir la variabilidad entre analistas, donde se obtuvo para A1, A2 y A3 un valor estadístico de 0.605, 1.137 y 1.157, respectivamente que al compararlo con el indicador k Mandel de la ISO 5725-2010 la cual indica un valor critico de 1.29 para un nivel de significancia del 5%, entonces queda demostrado que los valores obtenidos fueron menos al valor crítico, por lo que se concluye que hay ausencia de diferencias significativas entre analistas demostrándose la homogeneidad del método desarrollado. En la prueba de normalidad de Anderson Darling queda demostrado en los resultados de la Figura 9 que los datos siguen una distribución normal al presentar un p-value de 0.058 siendo aceptable para un nivel de significancia del 5%. La prueba estadística descrito en la Tabla 45 nos indica el resultado del intervalo de confianza (IC) aplicando el ajuste de Bonferroni al 95 % de confianza, donde se demuestra que las desviaciones estándares obtenidas para cada analista se encuentra dentro de ese rango además se evidencia que los intervalos de confianza de cada analista se solapan entre si demostrándonos que no hay diferencias significativas, confirmándose la homogeneidad entre analistas, reforzando esto con los datos de la Tabla 46 que muestra el análisis de homogeneidad de varianzas mediante el Test de Bartlett la cual se utilizó para comprobar si las varianzas de A1, A2 y A3 son iguales que conforme al valor de p-valor obtenido de 0.143 se demuestra que existe homogeneidad de varianzas

entre analistas al 95 % de confianza ya que es mayor a 0.05 de significancia. La prueba de análisis de ANOVA de un factor evaluado se desarrolló tomando en consideración la variación del analista (A1, A2, A3) para 10 repeticiones por analista donde se obtuvo un p-valor de 0.748 que comparando con el nivel de significancia de 0.05, confirma que al ser mayor no hay diferencias sistemáticas entre los analistas (A1, A2, A3) el cual cumple con la reproducibilidad intermedia. La precisión intermedia y repetibilidad que se detalle en la Tabla 50 y 51 se realizó a través de lo descrito en la ISO 5725-3 y la EURACHEM/CITAC, en donde se obtuvo la desviación estándar de repetibilidad para el nivel 1 Sr= 0.0001028, nivel 2 Sr= 0.0004915 y para el nivel 3 se obtuvo Sr= 0.0014967, estos valores se obtuvieron a partir de la raíz de varianza dentro de analistas (S2r), y este valor según lo descrito por la ISO 5725 proviene de la (T5/(T3-p)), donde p representa el número de analistas el cual es 3, así mismo se empleó la media de las mediciones (m), por otra parte la desviación estándar de reproducibilidad obtenido para el nivel 1, 2 y 3 fueron de 0.0000137, 0.0000154, 0.0000147, respectivamente. De los datos de la Tabla 53 que muestra el RSD % el cual fue de 12.31%, 2.94 % y 1.03% para los niveles 1, 2 y 3 los valores obtenidos son menores al 20% siguiente el criterio adoptado por la SANTE, demostrándose la precisión del método.

Los resultados obtenidos para la t de student de una muestra de cada analista se detalla en la Tabla 52 a la Tabla 58 para la evaluación de la veracidad del método conforme a la ISO 5725-6 y Eurachem, el promedio para el analista A1 fue de 0.000494 mg/L para el nivel 2, además se observó una desviación estándar de 0.000009 mg/L y un error estándar de 0.000003 mg/L. El intervalo de confianza que se obtuvieron al 95 % de confianza para la media fue de 0.000488–0.000501 mg/L, que conforme al valor teórico está dentro del rango, demostrándose que el método desarrollado no presenta sesgo significativo así mismo los valores de p-valor de A1, A2 y A3 fueron 0.069, 0.104, 0.081, respectivamente siendo estos valores aceptados al estar por encima de 0.05 del nivel de significancia asegurándose que no hay diferencia significativa entre la media del analista (A1,A2,A3) y el valor teórico. Por otra parte, según la Guía técnica para la realización de validación de métodos de ensayo (2015) la cual indica que la veracidad se debe evaluar para 3 niveles y por triplicado, se realizó conforme ello para los niveles 0.00010 mg/L, 0.00050 mg/L y 0.00150 mg/L donde se evaluó la veracidad conforme los a lineamientos de la Eurachem el cual indica la determinación del sesgo cuya finalidad es comparar la media obtenida respecto al valor de referencia fortificada (teórico) en este sentido la veracidad del método

se evaluó calculando el sesgo para los niveles, en donde el sesgo obtenido fue de 0.0000002; 0.0000085 y 0.0000067 para el nivel 1, 2 y 3, respectivamente. Además, se evaluó el sesgo relativo porcentual (%b), los valores obtenidos fueron -0.17%, -1.70 % y -0.45%, estos resultados evidencian que el método desarrollado mantiene su exactitud en todos los niveles al presentar un sesgo mínimo. La recuperación relativa porcentual (R%) se obtuvo según lo especificado en la Eurachem conforme a la media de los resultados y el valor de referencia, los resultados sugieren recuperaciones de 99.82% 98.30% y 99.55%, cumpliendo los rangos normalmente aceptados, la t de student de una muestra obtenida para todo el rango de concentraciones no evidencio diferencias significativas al compararse los valores obtenidos 0.05, 1.91 y 1.32 con el t crítico que es 4.30 resulta ser considerablemente menor.

Los resultados obtenidos para la determinación de la incertidumbre de medición se muestran desde la Tabla 59 a la 61, en donde se estimó para el presente método tomando en consideración el mesurando ($C_m = C_{lectura} \times V_{final} / V_{muestra}$) además en la Figura 15 se muestra el Diagrama de Ishikawa realizado para las fuentes de incertidumbre asociadas al mesurando los cuales son el volumen de muestra, lectura del equipo, volumen final, sesgo, precisión y el muestreo, como aquellas fuentes que pueden afectar en el resultado final. Así mismo se realizó la determinación de la incertidumbre combinada que conforme a lo mencionado por la Guía CG 4 EURACHEM / CITAC (2012) la cual sostiene que para estimar la incertidumbre global es necesario la evaluación de cada fuente de incertidumbre de tal forma se obtiene la contribución de cada una expresándose como la incertidumbre estándar, en tal sentido se obtuvo como incertidumbre estándar u(xi) para la lectura del equipo, volumen final, volumen de muestra, precisión, sesgo y muestreo 0.01, 0.001, 0.04, 0.000003, 0.000009 y 0.000014, respectivamente. Por otra parte, se determinó el coeficiente de sensibilidad (ci) que respecto a la Eurachem se utiliza para la determinación de la incertidumbre estándar combinada, en el que el coeficiente de sensibilidad es evaluado como la deriva parcial del modelo, el uso de ello permite expresar el efecto de cada magnitud de entrada considerada respecto a la incertidumbre del resultado, los resultados obtenidos para la lectura del equipo, volumen final y volumen de muestra, fueron 0.0010, 0.001 y -0.000001, por consiguiente la contribución se logró obtener en función de la incertidumbre estándar y el coeficiente de sensibilidad expresándose como $((ci)u(xi))^2$. A continuación, se pudo obtener la incertidumbre estándar combinada en donde la Eurachem sostiene que se expresa como la raíz cuadrada de una suma de términos,

en donde se obtuvo en el presente estudio a partir de las contribuciones resultando 0.000019, además como incertidumbre expandida se calculó multiplicando la incertidumbre estándar combinada con el factor de cobertura el cual se asume como 2 para un nivel de confianza del 95% considerando distribución normal, respecto a la sugerido por la Guía CG 4 EURACHEM / CITAC. Cabe señalar que en el presente estudio la determinación de la incertidumbre analítica y de muestreo se realizó por separado en el que la variabilidad entre replicas presenta la incertidumbre aportada por muestreo que en matrices ambientales suele generarse un mayor aporte proveniente del muestreo y el proceso analítico según lo indicado por la Eurachem “Measurement uncertainty arising from sampling” (2019), quedando demostrado que este comportamiento concuerda con la incertidumbre obtenida por el aporte de muestreo.

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

- En el presente trabajo se desarrolló la validación del método ISO 20179 en muestras de agua de consumo humano por cromatografía líquida de alta resolución con detección por arreglo de diodos (HPLC-DAD) para la determinación de Microcistina-LR, el cumple con los criterios de evaluación del desempeño analítico, según el DS 031-2010.
- Se estableció la curva de calibración del método para la Microcistina-LR, en el rango de 0.1 mg/L a 1.5 mg/L, demostrando linealidad en el rango de concentración, con un valor de R2 mayor a 0,99.
- Se determino el Límite de Detección en 0.00004 mg/L y el Límite de Cuantificación en 0.00013 mg/L, lo que asegura que con este método se llega al límite máximo permitido de 0,001 mg/L, según la normativa
- Se estableció la precisión del método en términos de la reproducibilidad y repetibilidad con un RSDr de 12.31%, 2.94% y 1.03% y RSDR de 13.28%, 3.13% y 0.98%. La veracidad del método se evaluó a través con un valor de 0.0000002, 0.0000085, 0.0000067, también queda demostrado en términos de recuperación habiéndose obtenido de 98.30 – 99.83 %.
- Al determinar la incertidumbre de expandida de 0.00004 se identificaron previamente las fuentes de incertidumbre de contribución siendo el de mayor aporte el muestreo

7.2 Recomendaciones

- Se recomienda verificar periódicamente la linealidad mediante la lectura de la curva de calibración, así mismo se debe asegurar que el almacenamiento del estándar de Microcistina-LR se encuentre a - 20° que es la temperatura recomendada en el certificado y al realizar la curva se debe hacer una manipulación rápida a la solución stock de microcistina ya que al ser termosensible provoca la ruptura del anillo peptídico de su estructura, además se desencadena la oxidación de los residuos de aminoácidos generando la alternación de su concentración inicial, por otra parte es importante establecer controles de calidad a través del establecimiento de gráficas de control en donde nos permita verificar la curva a través de un control de curva de calibración, así como la lectura de blancos y duplicados en donde se garantice que se mantiene la estabilidad en el rango.

- Es fundamental realizar evaluaciones periódicas en donde se verifique y garantice la conservación de los límites declarados, en este sentido se recomienda poder optimizar las condiciones del método en caso sea necesario.
- Se recomienda estandarizar las condiciones operativas como por ejemplo al realizar la extracción en fase sólida establecer un control en el tiempo mediante el flujo, cuyo fin es poder minimizar la contribución de fuentes externas y así la precisión se le atribuye únicamente al método, además se sugiere poder incrementar el número de replicas por analistas ya que permite obtener intervalo de confianza más estrechos y así mejorar la estimación de variabilidad entre analistas.
- Es importante que para el desarrollo de la implementación de determinación de la Microcistina-LR para otras matrices se recomienda realizar el estudio de la incertidumbre, además es fundamental poder evaluar la incertidumbre periódicamente con el fin de garantizar la confiabilidad del método, así como la actualización de ella en caso se realicen cambios en el procedimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguete, E. C., Gago-Martínez, A., Rodríguez-Vázquez, J. A., O'Connell, S., Moroney, C., & James, K. J. (2001). Application of HPLC and HPCE to the analysis of cyanobacterial toxins. Chromatographia, 53*(S1), S254–S259.* https://doi.org/10.1007/BF02490338

Alfonso Méndez, M. del C. (2009). Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura. Universidade de Santiago de Compostela, Servizo de Publicacións e Intercambio Científico. https://www.google.com.pe/books/edition/Desarrollo_de_m%C3%A9todos_para_el_aislamien/x1Eg_Cc_jXoC

Bhati, C., Minocha, N., Purohit, D., Kumar, S., Makhija, M., Saini, S., Kaushik, D., & Pandey, P. (2022). High performance liquid chromatography: Recent patents and advancement. Biomedical & Pharmacology Journal, 15*(2).* https://doi.org/10.13005/bpj/2411

Eaton, A. D., Clesceri, L. S., & Greenberg, A. E. (Eds.). (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater (20th ed.). American Public Health Association. https://www.abpsoil.com/images/Books/Standard-Methods-for-the-Examination-of-Water-and-Wastewater-20.pdf

Eurachem. (2012). Quantifying uncertainty in analytical measurement (3.ª ed. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1_ES.pdf

Eurachem. (2014). Guía para la validación de métodos analíticos (2.ª ed.) [versión en español].https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf

Eurachem. (2019). Measurement uncertainty arising from sampling: A guide to methods and approaches. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/UfS_2019_EN_P2.pdf

Eurachem. (2025). Guide: The fitness-for-purpose of analytical methods and validation procedures (3rd ed.). https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_3rd_ed_V1_EN.pdf

Fan, L., Huang, J. J., Lo, C. Y., Zhou, B., & Fu, X. (2021). Simplified validation of the ELISA kit determination of Microcystins in surface water. Water Science & Technology, 85(3), 900-913. https://doi.org/10.2166/wst.2021.640

Hua, S., Chen, J., Wu, L., Yu, X., Ye, J., Li, Y., Zhu, Y., & Tian, F. (2022). The monthly variation tendency of microcystin-LR levels in the Huangpu River (China) by applications of ELISA and HPLC. Environmental Science And Pollution Research, 29(37), 56876-56884. https://doi.org/10.1007/s11356-022-19791-x

Instituto de Salud Pública de Chile. (2015). Guía técnica para realización de la validación de métodos de ensayo (Resolución Exenta N° 201). https://www.ispch.cl/sites/default/files/Gu%C3%ADa%20Realizaci%C3%B3n%20Validaci%C3%B3n%20M%C3%A9todos%20de%20Ensayo%20Res.%20Ex.%20201.pdf

Jin, P., Yang, K., Bai, R., Chen, M., Yang, S., Fu, K., & He, J. (2021). Development and comparison of UPLC-ESI-MS and RP-HPLC-VWD methods for determining microcystin-LR. RSC Advances, 11(37), 23002-23009. https://doi.org/10.1039/d1ra03521e

Li, W., Duan, J., Niu, C., Qiang, N., & Mulcahy, D. (2011). Determination of Microcystin-LR in Drinking Water Using UPLC Tandem Mass Spectrometry-Matrix Effects and Measurement. Journal Of Chromatographic Science, 49(9), 665-670. https://doi.org/10.1093/chrsci/49.9.665

Lipson A, Lipson SG, Lipson H. Optical Physics. 4th ed. Cambridge University Press;

2010. https://doi.org/10.1017/CBO9780511763120.

Melvin, [Inicial(es).] (año). Título del trabajo (Ponencia presentada en la National Conference on Undergraduate Research, NCUR). NCUR. Recuperado de https://libjournals.unca.edu/ncur/wp-content/uploads/2021/03/2362-Melvin-FINAL.pdf

Ministerio de Salud del Perú. (2011). Reglamento de la calidad del agua para consumo humano (Decreto Supremo N.°031-2010-SA). https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/273650/reglamento-de-la-calidad-del-agua-para-consumo-humano.pdf?v=1561937448

Moloney J, Newell A. Nonlinear Optics. 1st ed. CRC Press; 2018.

Ohio Environmental Protection Agency. (2018). Total (extracellular and intracellular) microcystins – ADDA by ELISA analytical methodology (DES 701.0, Version 2.3).https://www.goldstandarddiagnostics.us/media/4690/microcystins_nodularins-adda-oh-elisa-sop-520011oh.pdf

Organización Mundial de la Salud. (1999). Guías para la calidad del agua potable: Segunda edición. Addendum al volumen 1: Recomendaciones. Ginebra: OMS. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/42187/9243545140-spa.pdf?sequence=1

Plaas, H. E., & Paerl, H. W. (2020) Toxic Cyanobacteria: A Growing Threat to Water and Air Quality. Environmental Science & Technology, 55, 44-64. https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06653

PubChem. (s. f.). Microcystin-Lr. PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/microcystin-LR#section=Information-Sources

Rajpoot, R., Rajput, S., & Koiri, R. K. (2025). Microcystin-LR and its health impacts: chemistry, transmission routes, mechanisms of toxicity and target organs. Toxicology Reports, 14, 101996. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2025.101996

Reid, N., Reyne, M., O'Neill, W., Greer, B., He, O., Burdekin, John, W., & McGrath (2024). Unprecedented Harmful algal bloom in the UK and Ireland's largest lake associated with gastrointestinal bacteria, microcystins and anabaenopeptins presenting an environmental and public health risk. Environmental International https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108934

Rodríguez Uro, V. H., Azevedo, J., Araújo, M. J., Silva, R., Bedoya, J., Paredes, B., Ranilla, C., Vasconcelos, V., & Campos, A. (2024). New report of cyanobacteria and cyanotoxins in El Pañe reservoir: A threat for water quality in high-Andean sources from Peru. Toxins, 16(9), 378. https://doi.org/10.3390/toxins16090378

Shamsollahi, H. R., Alimohammadi, M., Nabizadeh, R., Nazmara, S., & Mahvi, A. H. (2014). Measurement of Microcystin -LR in Water Samples Using Improved HPLC Method. Global Journal Of Health Science, 7(2). https://doi.org/10.5539/gjhs.v7n2p66

Sofía, P. C. E. (2024, 2 julio). Determinación de Microcistina-LR en dos cuerpos de agua dulce de la región Andina usando Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con Detección Ultravioleta. Repositorio Institucional Séneca. https://hdl.handle.net/1992/74553

Suarez Ospina, D., & Morales Hernández, Y. (2018, diciembre). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. Ediciones Universidad de América. Repositorio Universidad de América. https://repository.uamerica.edu.co/items/6d2a6005-11c9-4978-ad1f-1852555cbcd4

World Health Organization. (2017). *Cyanobacterial toxins: Chemical fact sheet*. World Health Organization. https://www.who.int/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/cyanobacterial-toxins-chemical-fact-sheet.pdf?sfvrsn=ac637576_4

Wu, X., Hou, L., Lin, X., & Xie, Z. (2019). Application of Novel Nanomaterials for Chemo- and Biosensing of Algal Toxins in Shellfish and Water. En Elsevier eBooks (pp. 353-414). https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814497-8.00012-6

ANEXOS

Anexo A. Cálculo demostrativo de la recta de regresión de mínimos cuadrados para la Curva 1

Cálculo de la pendiente a partir de las concentraciones y respuesta de la Tabla 1

$$m = \frac{n\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

x: 0.10; 0.20; 0.50; 1.00; 1.50

y: 3.17;6.95; 17.94; 34.73; 54.73

Entonces con los datos de la Tabla 1, se tiene lo siguiente:

n=5

$$\sum x = 3.3$$
$$\sum y = 117.52$$
$$\sum x^2 = 3.55$$
$$\sum xy = 143.038$$

Entonces aplicando la fórmula, tenemos:

$$m = \frac{5(143.038) - 3.3(117.52)}{5\ (3.55) - (3.3)^2}$$
$$m = \frac{715.19 - 387.816}{17.75 - 10.89}$$
$$m = \frac{327.374}{6.86} = 36.3985$$

Se obtiene que la pendiente es 36.3985

Para el intercepto de calculó de la siguiente forma:

$$b = \frac{\sum y - m\sum x}{n}$$
$$b = \frac{117.52 - (36.3985)(3.3)}{5}$$
$$b = \frac{117.52 - 120.115}{5}$$
$$b = \frac{-2.595}{5} = -0.519$$

Se obtiene que el intercepto calculo es -0.519

Ahora con la pendiente y el intercepto calculado, tenemos la ecuación de la recta resultante de la regresión de mínimos cuadrados

$$\hat{y} = 36.3985\ (\mathrm{x}) - 0.519$$

Tomamos como ejemplo de cálculo del valor predicho para el punto de x = 1.00 mg/L

$$\hat{y} = 36.3985\ (1.00) - 0.519 = 35.8795$$

Para el cálculo del residuo considerando del valor observado y el valor predicho, tendremos:

Valor observado (y) = 34.73

Valor predicho $\widehat{(y)}$ = 35.8795

Residuo = Valor observado (y) - Valor predicho $\widehat{(y)}$

Residuo = 34.73 – 35.8795 = -1.1495

Anexo B. Tabla de t de student

Grados de libertad ν	*t*
1	12,7
2	4,3
3	3,2
4	2,8
5	2,6
6	2,4
8	2,3
10	2,2
14	2,1
28	2,0

Eurachem/CITAC Guide (2012). Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement

Anexo C. Tabla de indicadores para las estadísticas de h y k de Mandel en el nivel de significancia de 5 %

p	*h*	*k*								
		n								
		2	3	4	5	6	7	8	9	10
3	1,15	1,65	1,53	1,45	1,40	1,37	1,34	1,32	1,30	1,29
4	1,42	1,76	1,59	1,50	1,44	1,40	1,37	1,35	1,33	1,31
5	1,57	1,81	1,62	1,53	1,46	1,42	1,39	1,,36	1,34	1,32
6	1,66	1,85	1,64	1,54	1,48	1,43	1,40	1,37	1,35	1,33
7	1,71	1,87	1,66	1,55	1,49	1,44	1,41	1,38	1,36	1,34
8	1,75	1,88	1,67	1,56	1,50	1,45	1,41	1,38	1,36	1,34
9	1,78	1,90	1,68	1,57	1,50	1,45	1,42	1,39	1,36	1,35
10	1,80	1,90	1,68	1,57	1,50	1,46	1,42	1,39	1,37	1,35
11	1,82	1,91	1,69	1,58	1,51	1,46	1,42	1,39	1,37	1,35
12	1,83	1,92	1,69	1,58	1,51	1,46	1,42	1,40	1,37	1,35
13	1,84	1,92	1,69	1,58	1,51	1,46	1,43	1,40	1,37	1,35
14	1,85	1,92	1,70	1,59	1,52	1,47	1,43	1,40	1,37	1,35
15	1,86	1,93	1,70	1,59	1,52	1,47	1,43	1,40	1,38	1,36
16	1,86	1,93	1,70	1,59	1,52	1,47	1,43	1,40	1,38	1,36
17	1,87	1,93	1,70	1,59	1,52	1,47	1,43	1,40	1,38	1,36
18	1,88	1,93	1,71	1,59	1,52	1,47	1,43	1,40	1,38	1,36
19	1,88	1,93	1,71	1,59	1,52	1,47	1,43	1,40	1,38	1,36
20	1,89	1,94	1,71	1,59	1,52	1,47	1,43	1,40	1,38	1,36
21	1,89	1,94	1,71	1,60	1,52	1,47	1,44	1,41	1,38	1,36
22	1,89	1,94	1,71	1,60	1,52	1,47	1,44	1,41	1,38	1,36
23	1,90	1,94	1,71	1,60	1,53	1,47	1,44	1,41	1,38	1,36
24	1,90	1,94	1,71	1,60	1,53	1,48	1,44	1,41	1,38	1,38
25	1,90	1,94	1,71	1,60	1,53	1,48	1,44	1,41	1,38	1,36
26	1,90	1,94	1,71	1,60	1,53	1,48	1,44	1,41	1,38	1,36
27	1,91	1,94	1,71	1,60	1,53	1,48	1,44	1,41	1,38	1,36
28	1,91	1,94	1,71	1,60	1,53	1,48	1,44	1,41	1,38	1,36
29	1,91	1,94	1,72	1,60	1,53	1,48	1,44	1,41	1,38	1,36
30	1,91	1,94	1,72	1,60	1,53	1,48	1,44	1,41	1,38	1,36

p = número de laboratorios a un dado nivel

n = número de réplicas intralaboratorio a dicho nivel

NOTA Suministrada y publicada con el permiso del Dr. J. Mandel

Norma Técnica Peruana NTP-ISO 5725-2 (2021). Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos y resultados de medición

Anexo D. Tabla de valores críticos para la prueba de Cochran

P	*n* = 2		*n* = 3		*n* = 4		*n* = 5		*n* = 6	
	1 %	5 %	1 %	5 %	1 %	5 %	1 %	5 %	1 %	5 %
2	-	-	0,995	0,975	0,979	0,939	0,959	0,906	0,937	0,877
3	0,993	0,967	0,942	0,871	0,883	0,798	0,834	0,746	0,793	0,707
4	0,968	0,906	0,864	0,768	0,781	0,684	0,721	0,629	0,676	0,590
5	0,928	0,841	0,788	0,684	0,696	0,598	0,633	0,544	0,588	0,506
6	0,883	0,781	0,722	0,616	0,626	0,532	0,564	0,480	0,520	0,445
7	0,838	0,727	0,664	0,561	0,568	0,480	0,508	0,431	0,466	0,397
8	0,794	0,680	0,615	0,516	0,521	0,438	0,463	0,391	0,423	0,360
9	0,754	0,638	0,573	0,475	0,481	0,403	0,425	0,358	0,387	0,329
10	0,718	0,602	0,536	0,445	0,447	0,373	0,393	0,331	0,357	0,303
11	0,684	0,570	0,504	0,417	0,418	0,348	0,366	0,308	0,332	0,281
12	0,653	0,541	0,475	0,392	0,392	0,326	0,343	0,288	0,310	0,262
13	0,624	0,515	0,456	0,371	0,369	0,307	0,322	0,271	0,291	0,243
14	0,599	0,492	0,427	0,352	0,349	0,291	0,304	0,255	0,274	0,232
15	0,575	0,471	0,407	0,335	0,332	0,276	0,288	0,242	0,259	0,220
16	0,553	0,452	0,388	0,319	0,316	0,262	0,274	0,230	0,246	0,208
17	0,532	0,434	0,372	0,305	0,301	0,250	0,261	0,219	0,234	0,198
18	0,514	0,418	0,356	0,293	0,288	0,240	0,249	0,209	0,223	0,189
19	0,496	0,403	0,343	0,281	0,276	0,230	0,238	0,200	0,214	0,181
20	0,480	0,389	0,330	0,270	0,265	0,220	0,229	0,192	0,205	0,174
21	0,465	0,377	0,318	0,261	0,255	0,212	0,220	0,185	0,197	0,167
22	0,450	0,365	0,307	0,252	0,246	0,204	0,212	0,178	0,189	0,160
23	0,437	0,354	0,297	0,243	0,238	0,197	0,204	0,172	0,182	0,155
24	0,425	0,343	0,287	0,235	0,230	0,191	0,197	0,166	0,176	0,149
25	0,413	0,334	0,278	0,228	0,222	0,185	0,190	0,160	0,170	0,144
26	0,402	0,325	0,270	0,221	0,215	0,179	0,184	0,155	0,164	0,140
27	0,391	0,316	0,262	0,215	0,209	0,173	0,179	0,150	0,159	0,135
28	0,382	0,308	0,255	0,209	0,202	0,168	0,173	0,146	0,154	0,131
29	0,372	0,300	0,248	0,203	0,196	0,164	0,168	0,142	0,150	0,127
30	0,363	0,293	0,241	0,198	0,191	0,159	0,164	0,138	0,145	0,124
31	0,355	0,286	0,235	0,193	0,186	0,155	0,159	0,134	0,141	0,120

Norma Técnica Peruana NTP-ISO 5725-2 (2021). Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos y resultados de medición

Anexo E. Tabla de valores críticos para la prueba de Grubbs

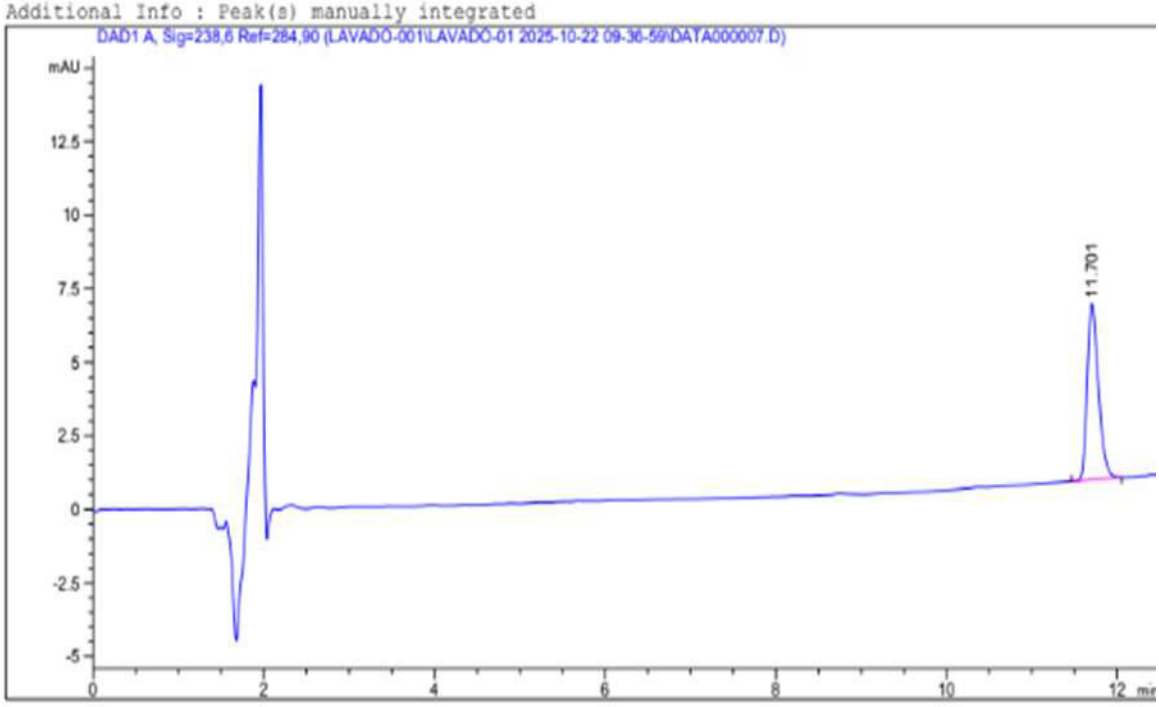
P	Uno más grande o uno más pequeño		Dos más grandes o dos más pequeños	
	Superior 1 %	Superior 5 %	Inferior 1 %	Inferior 5 %
3	1,155	1,155	-	-
4	1,496	1,481	0,000 0	0,000 2
5	1,764	1,715	0,001 8	0,009 0
6	1,973	1,887	0,011 6	0,034 9
7	2,139	2,020	0,030 8	0,070 8
8	2,274	2,126	0,056 3	0,110 1
9	2,387	2,215	0,085 1	0,149 2
10	2,482	2,290	0,115 0	0,186 4
11	2,564	2,355	0,144 8	0,221 3
12	2,636	2,412	0,173 8	0,253 7
13	2,699	2,462	0,201 6	0,283 6
14	2,755	2,507	0,228 0	0,311 2
15	2,806	2,549	0,253 0	0,336 7
16	2,852	2,585	0,276 7	0,360 3
17	2,894	2,620	0,299 0	0,382 2
18	2,932	2,651	0,320 0	0,402 5
19	2,968	2,681	0,339 8	0,421 4
20	3,001	2,709	0,358 5	0,439 1
21	3,031	2,733	0,376 1	0,455 6
22	3,060	2,758	0,392 7	0,471 1
23	3,087	2,781	0,408 5	0,485 7
24	3,112	2,802	0,423 4	0,499 4
25	3,135	2,822	0,437 6	0,512 3

Norma Técnica Peruana NTP-ISO 5725-2 (2021). Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos y resultados de medición

Anexo F. Cromatograma de MC-LR a 1.5 mg/L

```
Data File C:\CHEM32\1\DATA\LAVADO-001\LAVADO-01 2025-10-22 09-36-59\DATA000007.D
Sample Name: CAL-05 1.5

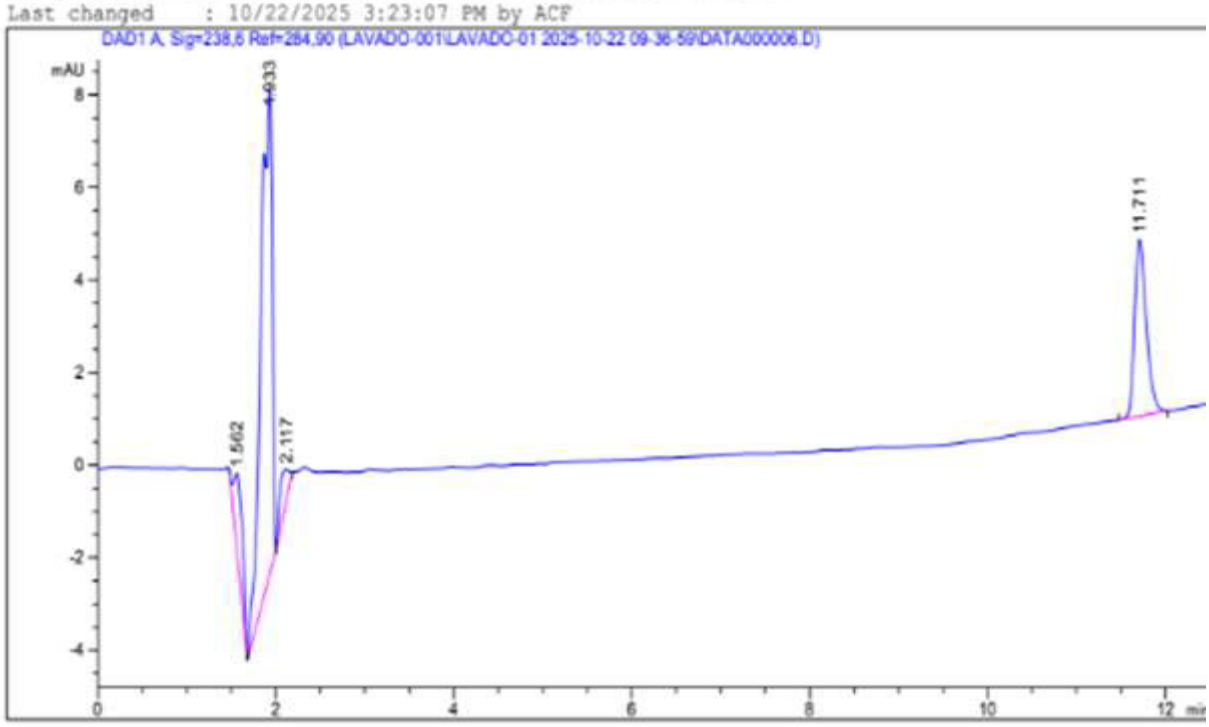
    ======================================================================
    Acq. Operator    : ACF                          Seq. Line :   2
    Acq. Instrument : HPLC 1200 TYPSA                Location : Vial 6
    Injection Date   : 10/22/2025 2:13:36 PM              Inj :   1
                                                   Inj Volume : 20.0 µl
    Acq. Method      : C:\CHEM32\1\DATA\LAVADO-001\LAVADO-01 2025-10-22 13-32-16\MC-LR -XI.M
    Last changed     : 10/18/2025 9:20:08 AM by ACF
    Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CUANTIFICACION II MC-LR.M
    Last changed     : 10/22/2025 3:23:07 PM by ACF
    Additional Info : Peak(s) manually integrated
```



Anexo G. Cromatograma de MC-LR a 1.0 mg/L

```
Data File C:\CHEM32\1\DATA\LAVADO-001\LAVADO-01 2025-10-22 09-36-59\DATA000006.D
Sample Name: CAL-04 1.0

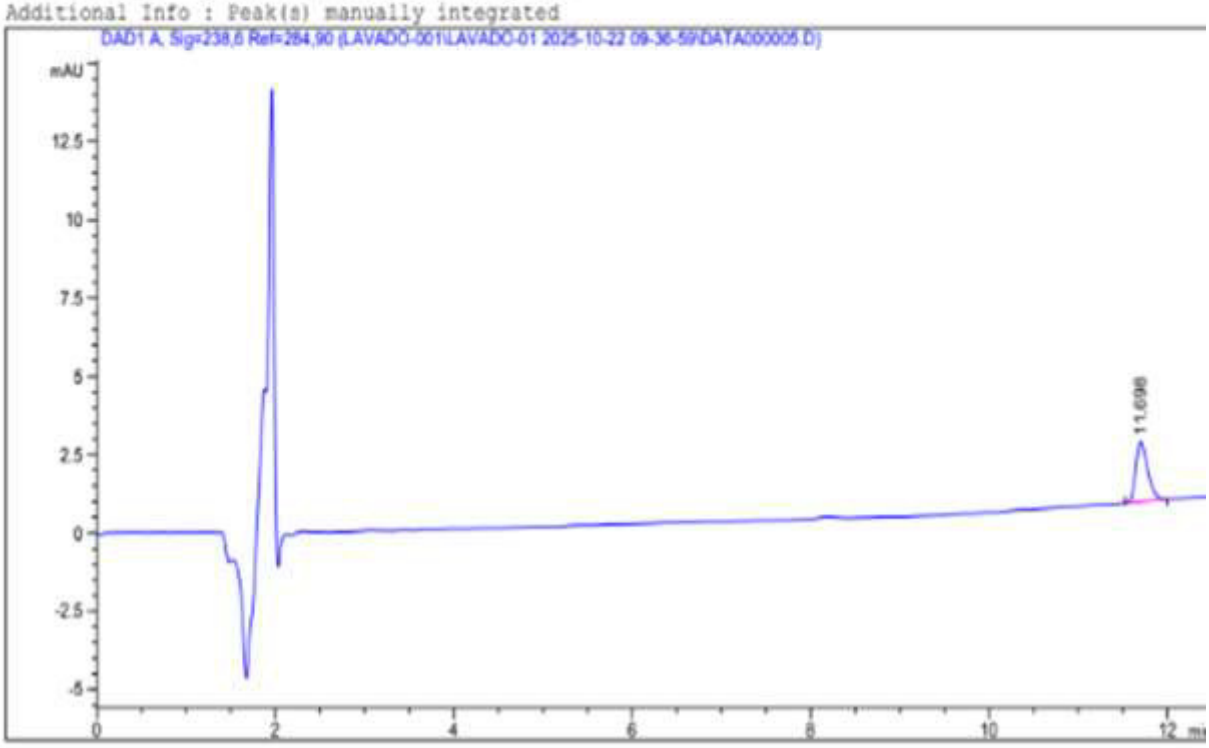
======================================================================
Acq. Operator   : ACF                          Seq. Line :   1
Acq. Instrument : HPLC 1200 TYPSA               Location : Vial 5
Injection Date  : 10/22/2025 1:32:32 PM             Inj :   1
                                               Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\LAVADO-001\LAVADO-01 2025-10-22 13-32-16\MC-LR -XI.M
Last changed    : 10/18/2025 9:20:08 AM by ACF
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CUANTIFICACION II MC-LR.M
Last changed    : 10/22/2025 3:23:07 PM by ACF
```



Anexo H. Cromatograma de MC-LR a 0.5 mg/L

```
Data File C:\CHEM32\1\DATA\LAVADO-001\LAVADO-01 2025-10-22 09-36-59\DATA000005.D
Sample Name: CAL-03 0.5

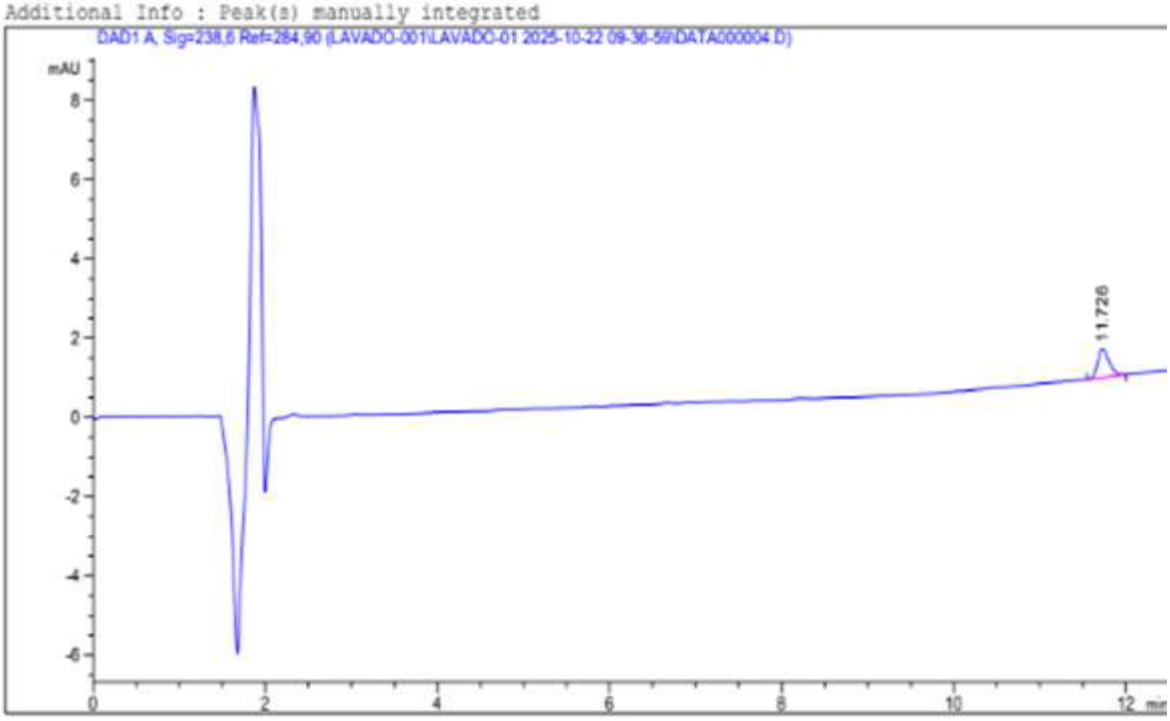
=====================================================================
Acq. Operator   : ACF                          Seq. Line :   5
Acq. Instrument : HPLC 1200 TYPSA               Location : Vial 4
Injection Date  : 10/22/2025 12:22:20 PM             Inj :   1
                                               Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\LAVADO-001\LAVADO-01 2025-10-22 09-36-59\MC-LR -XI.M
Last changed    : 10/18/2025 9:20:08 AM by ACF
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CUANTIFICACION II MC-LR.M
Last changed    : 10/22/2025 3:23:07 PM by ACF
Additional Info : Peak(s) manually integrated
```



Anexo I. Cromatograma de MC-LR a 0.2 mg/L

```
Data File C:\CHEM32\1\DATA\LAVADO-001\LAVADO-01 2025-10-22 09-36-59\DATA000004.D
Sample Name: CAL-02 0.2

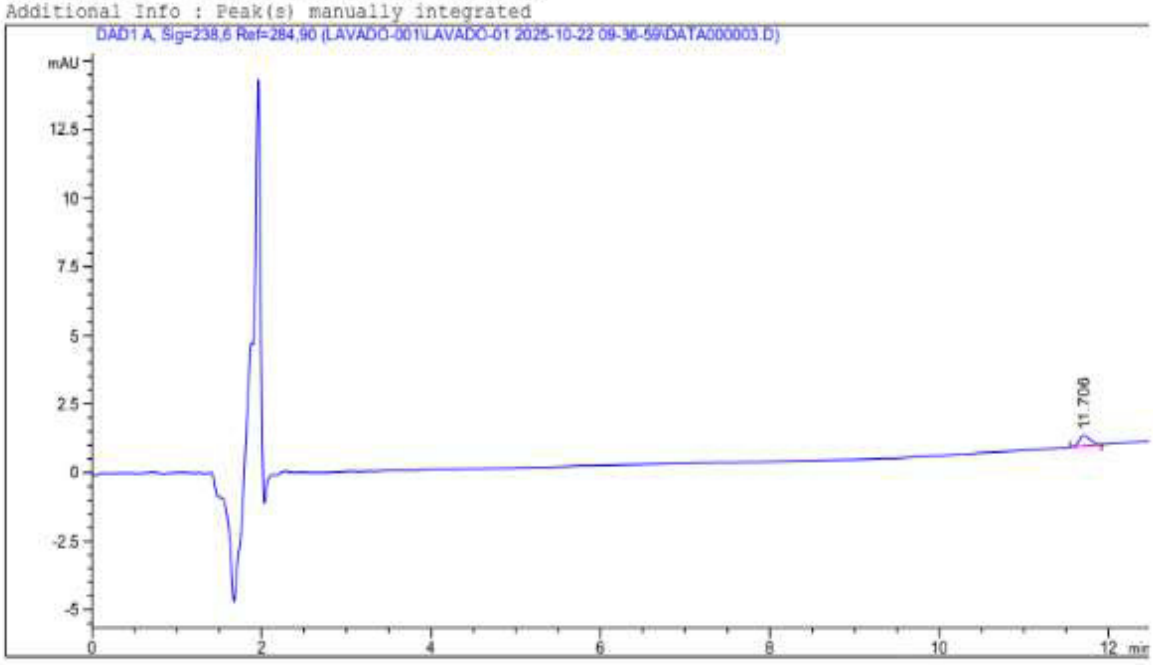
======================================================================
Acq. Operator   : ACF                          Seq. Line :   4
Acq. Instrument : HPLC 1200 TYPSA               Location : Vial 3
Injection Date  : 10/22/2025 11:41:04 AM             Inj :   1
                                               Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\LAVADO-001\LAVADO-01 2025-10-22 09-36-59\MC-LR -XI.M
Last changed    : 10/18/2025 9:20:08 AM by ACF
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CUANTIFICACION II MC-LR.M
Last changed    : 10/22/2025 3:23:07 PM by ACF
Additional Info : Peak(s) manually integrated
```



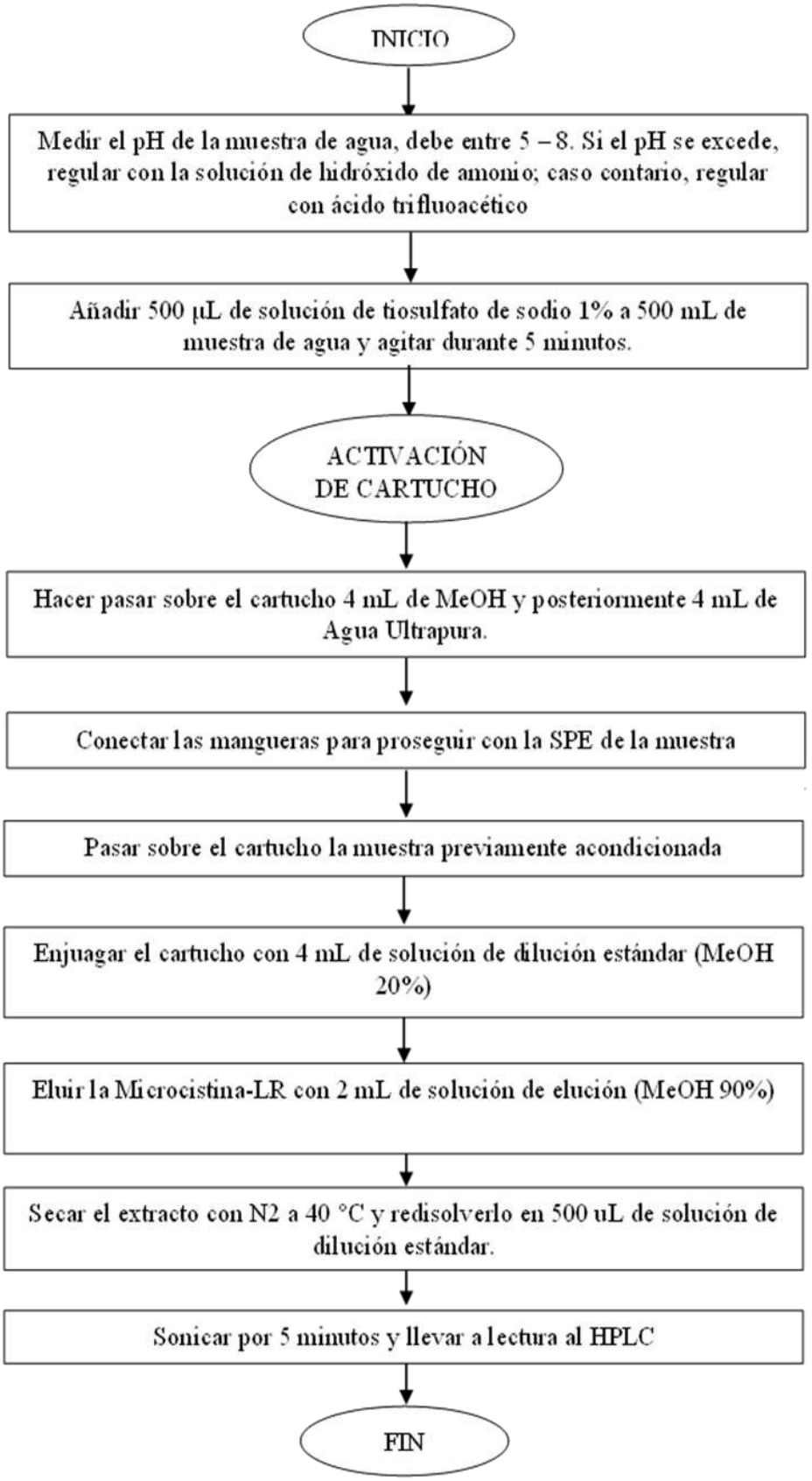
Anexo J. Cromatograma de MC-LR a 0.1 mg/L

```
Data File C:\CHEM32\1\DATA\LAVADO-001\LAVADO-01 2025-10-22 09-36-59\DATA000003.D
Sample Name: CAL-01 0.1

========================================================================
Acq. Operator   : ACF                          Seq. Line :   3
Acq. Instrument : HPLC 1200 TYPSA               Location : Vial 2
Injection Date  : 10/22/2025 10:59:47 AM             Inj :   1
                                               Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\LAVADO-001\LAVADO-01 2025-10-22 09-36-59\MC-LR -XI.M
Last changed    : 10/18/2025 9:20:08 AM by ACF
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\CUANTIFICACION II MC-LR.M
Last changed    : 10/22/2025 3:23:07 PM by ACF
Additional Info : Peak(s) manually integrated
```



Anexo K. Diagrama de flujo del tratamiento de la muestra



Anexo L. Cálculo del coeficiente de sensibilidad respecto a la lectura, volumen final y volumen de la muestra

- Determinación del coeficiente de sensibilidad respecto a la concentración de la lectura

  Se define como según el mesurando:

$$\frac{\partial C_m}{\partial C_{lectura}} = \frac{V_{final}}{V_{muestra}}$$

- Determinación del coeficiente de sensibilidad respecto al volumen final

  Se define como según el mesurando:

$$\frac{\partial C_m}{\partial V_{final}} = \frac{C_{lectura}}{V_{muestra}}$$

- Determinación del coeficiente de sensibilidad respecto al volumen muestra

  Se define como según el mesurando:

$$\frac{\partial C_m}{\partial V_{muestra}} = -\frac{C_{lectura}\, x\, V_{final}}{V^2_{muestra}}$$

- Reemplazando los valores, tendremos lo siguiente para el coeficiente de sensibilidad para la lectura del equipo:

$$C_{C\ lectura} = \frac{V_{final}}{V_{muestra}} = \frac{0.5}{500} = 0.001$$

- Reemplazando los valores, tendremos lo siguiente para el coeficiente de sensibilidad para el volumen final:

$$C_{C\ volumen\ final} = \frac{C_{lectura}}{V_{muestra}} = \frac{0.5}{500} = 0.001$$

- Reemplazando los valores, tendremos lo siguiente para el coeficiente de sensibilidad para el volumen muestra:

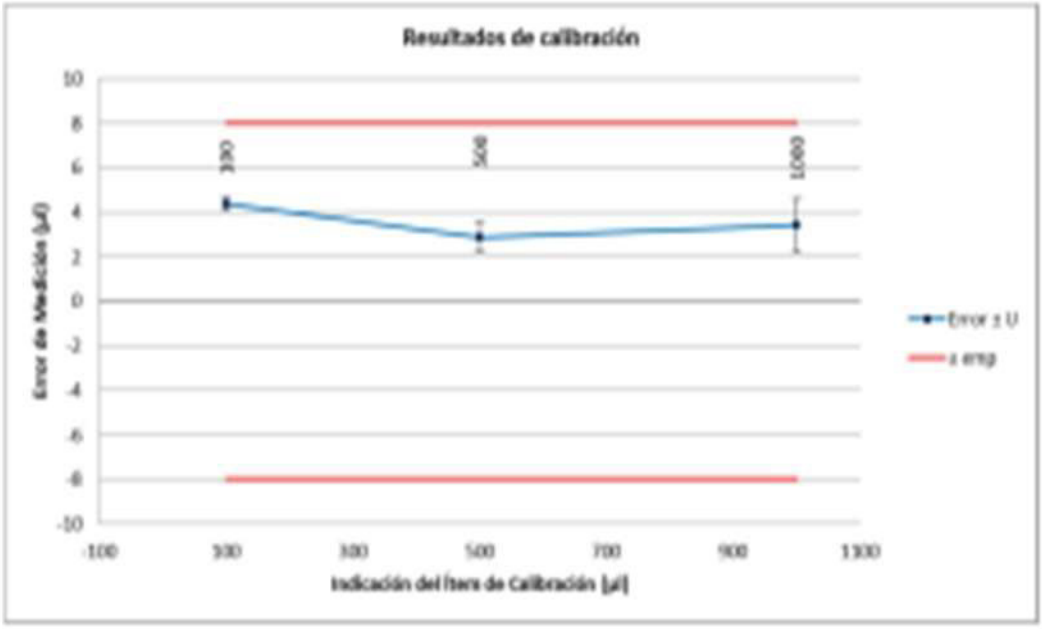
$$C_{C\ volumen\ muestra} = -\frac{C_{lectura}\, x\, V_{final}}{V^2_{muestra}} = -\frac{0.5\, x\, 0.5}{500^2} = -1.0\, x\, 10^{-6}$$

Anexo M. Certificado de calibración para la micropipeta de 1000 Ul

Resultados de la Calibración

Calibration Results

Valor de Prueba *Test Value*	Volumen Medido *Measured Volume*	Error de Medición (e) *Measurement Error (e)*	Incertidumbre (U) *Uncertainty (U)*	Factor de Cobertura (k) *Coverage factor*	Temperatura/° *Temperature*	E.M.P. *M.P.E.*	Cumplimiento *Compliance*
µl	µl	µl	µl		°C	µl	
100	104.35	4.35	0.29	2.00	21.8	8	Cumple
500	502.88	2.88	0.67	2.00	21.7	8	Cumple
1000	1003.4	3.4	1.2	2.00	21.8	8	Cumple



Notas

Notes

- Temperatura de Referencia: 20 °C
- El error de medición (mejor estimación del valor verdadero) se muestran con la misma cantidad de decimales que la incertidumbre reportada (véase 7.2.6 de la GUM).
- Se ha realizado diez mediciones por cada valor de prueba.

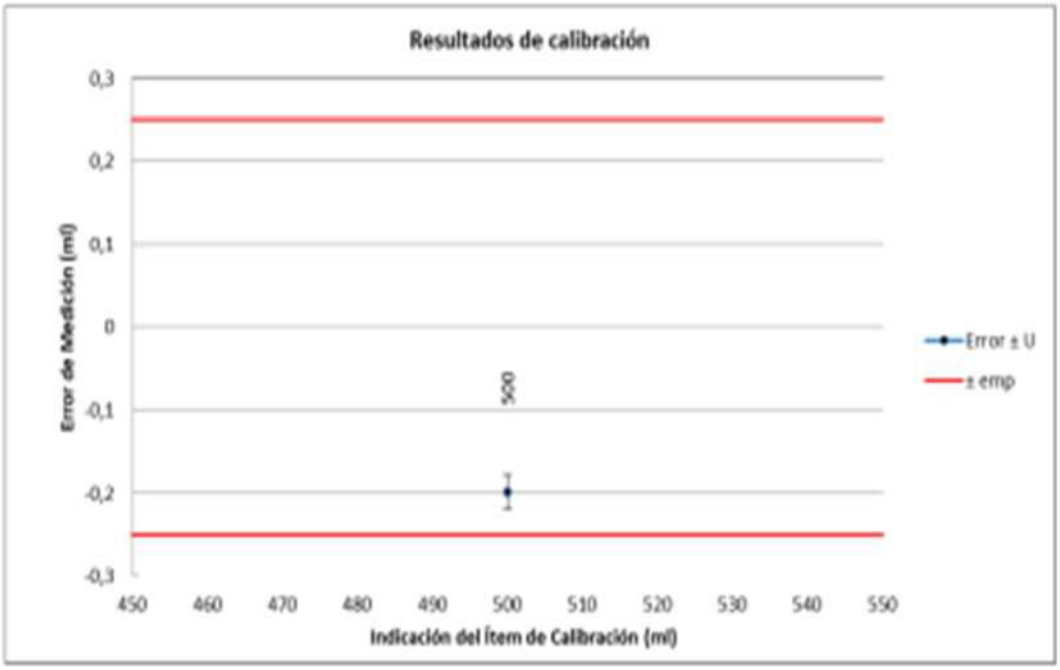
- *Reference Temperature: 20 °C*
- *The measurement error (best estimate of the true value) are shown to the same number of digits as the reported uncertainty (see GUM 7.2.6).*
- *Ten measurements have been performed for each test value.*

Anexo N. Certificado de calibración para la fiola de 500 Ml

Resultados de la Calibración

Calibration Results

Valor de Prueba *Test Value*	Volumen Medido *Measured Volume*	Error de Medición (e) *Measurement Error (e)*	Incertidumbre (U) *Uncertainty (U)*	Factor de Cobertura (k) *Coverage factor*	Temperatura[a] *Temperature*	E.M.P. *M.P.E.*	Cumplimiento *Compliance*
ml	ml	ml	ml		°C	ml	
500	499,801	-0,199	0,021	2,00	21,8	0,25	Cumple



Notas

Notes

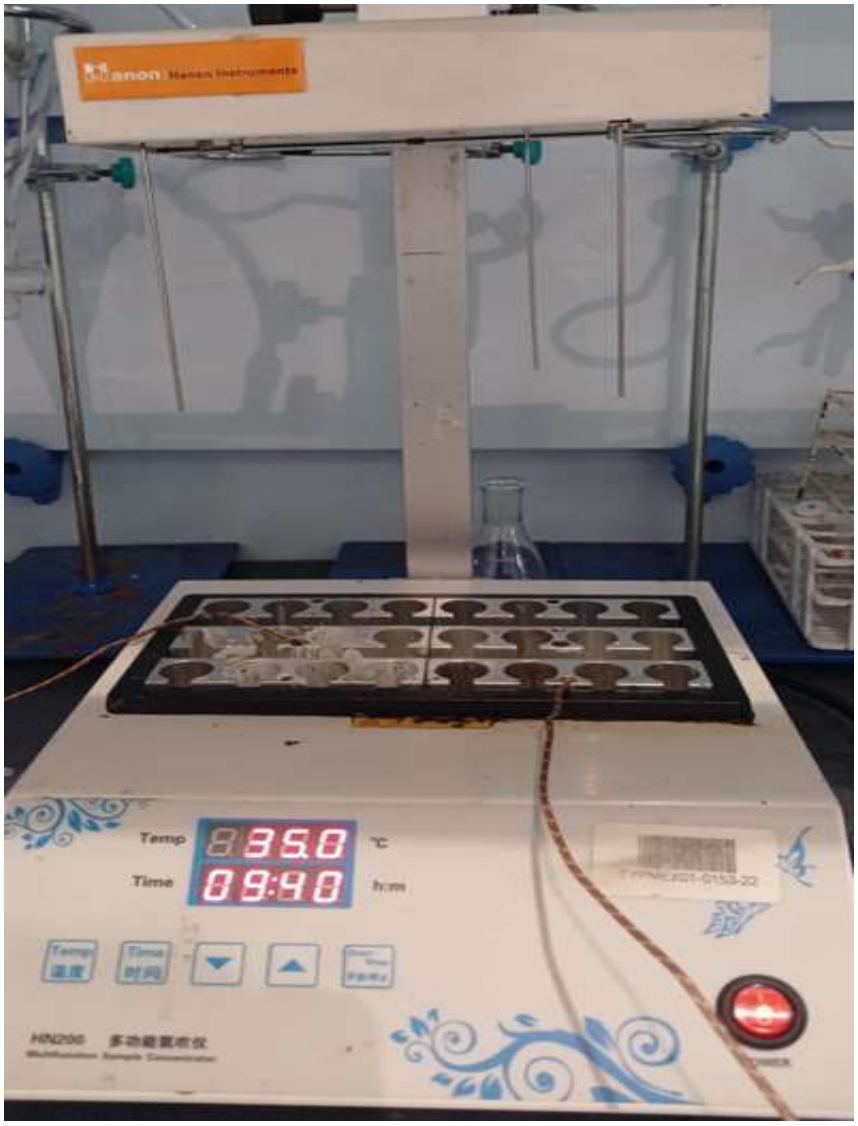
- Temperatura de Referencia: 20 °C
- El error de medición (mejor estimación del valor verdadero) se muestran con la misma cantidad de decimales que la incertidumbre reportada (véase 7.2.6 de la GUM).
- Se ha realizado diez mediciones por cada valor de prueba.

- *Reference Temperature: 20 °C*
- *The measurement error (best estimate of the true value) are shown to the same number of digits as the reported uncertainty (see GUM 7.2.6).*
- *Ten measurements have been performed for each test value.*

Anexo O. Equipo HPLC Agilent Technologies -DAD 1200



Anexo P. Equipo de concentrador de nitrógeno - Hanon



Anexo Q. Equipo de extracción en fase sólida – Supelco Visprep 12

