

**APLICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA ESTANDARIZAR Y VALIDAR
LOS ENSAYOS DE As, Cr, Hg Y Na POR ESPECTROMETRÍA DE
ABSORCIÓN ATÓMICA EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA AMBIENTAL**

ANDRÉS MAURICIO CAMACHO ORREGO

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
PEREIRA
2008**

**APLICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA ESTANDARIZAR Y VALIDAR
LOS ENSAYOS DE As, Cr, Hg Y Na POR ESPECTROMETRÍA DE
ABSORCIÓN ATÓMICA EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA AMBIENTAL**

ANDRÉS MAURICIO CAMACHO ORREGO

**Trabajo de Grado para optar al título
de Tecnólogo Químico**

**Directora
Clara Inés Arango Sotelo
Especialista en Gestión de la Calidad**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
PEREIRA
2008**

Nota de aceptación:

Directora, Clara Inés Arango Sotelo

Jurado, Carlos Humberto Montoya Navarrete

Pereira, 6 de mayo de 2008

DEDICATORIA

A mis padres: Dora Elsy Orrego Sánchez y Julio Camacho Torres.

AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo de trabajo del LQA por permitirme hacer parte de ellos, especialmente a Clara Inés Arango Sotelo, directora del Trabajo, y a Lina María García Moreno, codirectora, porque siempre estuvieron ahí para ayudarme en lo que hiciera falta y que gracias a su empeño y sus consejos pude sacar este proyecto adelante; a ellas mil y mil gracias por dedicar parte de su valioso tiempo en este trabajo.

CONTENIDO

	pág.
1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	18
2 JUSTIFICACIÓN	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GENERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 MARCO DE REFERENCIA	22
4.1 CONCEPTO DE CALIDAD	22
4.2 CONCEPTO DE ESTANDARIZACIÓN	23
4.2.1 Equipos y Materiales	24
4.2.2 Sustancias Patrón y Reactivos	25
4.2.3 Curvas de Calibración	26
4.3 CONCEPTO DE VALIDACIÓN	27
4.3.1 Normas Básicas de la Validación	29
4.4 NORMATIVIDAD	29
4.5 IMPACTO LEGAL DE LOS DATOS DE ANÁLISIS	30
4.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN	32
4.6.1 La Luz	32
4.6.2 Absorción de Radiación	33
4.6.3 Absorción Atómica	33
4.6.4 Espectrometría de Absorción Atómica	33
4.6.4.1 Principio	33
4.6.4.2 Equipo de Espectrometría de Absorción Atómica	35
4.6.4.3 Aplicaciones	36
4.6.4.4 Interferencias	39
4.6.5 Generación de Hidruros	42
4.6.6 Análisis Cuantitativo	43
5 METODOLOGÍA	44
5.1 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	44
5.2 ESTANDARIZACIÓN	44
5.3 VALIDACIÓN	44
5.4 EQUIPOS, REACTIVOS Y VIDRIERÍA	46
5.4.1 Equipos	46
5.4.2 Reactivos	46

5.4.3 Vidriería	47
5.5 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	47
5.6 DIGESTIÓN DE PATRONES Y MUESTRAS	48
5.7 CONSIDERACIONES PARA ESTIMAR LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN	48
5.8 LIMPIEZA EN LA ANALÍTICA DE TRAZAS	49
6 RESULTADOS	50
6.1 DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO POR GENERACIÓN DE HIDRUROS / ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA. 3114 C.	50
6.1.1 Alcance	50
6.1.2 Principio	50
6.1.3 Precauciones de Seguridad	51
6.1.4 Preparación de Soluciones de Trabajo	51
6.1.5 Experimentos de Estandarización	52
6.1.5.1 Efecto de la digestión en los patrones	52
6.1.5.2 Efecto de la reducción con yoduro en los patrones	53
6.1.5.3 Establecimiento del rango de linealidad	56
6.1.6 Experimentos de Validación	61
6.1.6.1 Límites de detección y cuantificación	61
6.1.6.2 Exactitud (expresada como E%)	62
6.1.6.3 Precisión	63
6.1.6.4 Repetibilidad y reproducibilidad (R & R)	64
6.1.6.5 Sensibilidad de calibración del método	65
6.1.6.6 Recuperación	66
6.1.7 Estimación de la Incertidumbre de la Medición	68
6.1.7.1 Mesurando	68
6.1.7.2 Modelo matemático	68
6.1.7.3 Principio de medición	68
6.1.7.4 Identificación de fuentes de incertidumbre	68
6.1.7.5 Diagrama causa-efecto	69
6.1.7.6 Cálculos	70
6.1.8 Discusión de Resultados	74
6.1.9 Conclusiones	76
6.1.10 Recomendaciones	76
6.1.11 Control de Calidad y Seguimiento de Validación	76
6.2 DETERMINACIÓN DE MERCURIO POR GENERACIÓN DE HIDRUROS / ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.	77
6.2.1 Alcance	77
6.2.2 Principio	77
6.2.3 Precauciones de Seguridad	77
6.2.4 Preparación de Soluciones de Trabajo	78
6.2.5 Experimentos de Estandarización	78

6.2.5.1 Establecimiento del rango de linealidad	78
6.2.6 Experimentos de Validación	80
6.2.6.1 Límites de detección y cuantificación	81
6.2.6.2 Exactitud y precisión	82
6.2.6.3 Repetibilidad intermedia	83
6.2.6.4 Sensibilidad de calibración del método	83
6.2.6.5 Recuperación	83
6.2.7 Estimación de la Incertidumbre de la Medición	85
6.2.7.1 Mesurando	85
6.2.7.2 Modelo matemático	85
6.2.7.3 Principio de medición	85
6.2.7.4 Identificación de fuentes de incertidumbre	85
6.2.7.5 Diagrama causa-efecto	85
6.2.7.6 Cálculos	86
6.2.8 Discusión de Resultados	89
6.2.9 Conclusiones	90
6.2.10 Recomendaciones	90
6.2.11 Control de Calidad y Seguimiento de Validación	90
6.3 DETERMINACIÓN DE SODIO POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA. 3111 B.	91
6.3.1 Alcance	91
6.3.2 Principio	91
6.3.3 Precauciones de Seguridad	91
6.3.4 Preparación de Soluciones de Trabajo	92
6.3.5 Experimentos de Estandarización	92
6.3.5.1 Efecto de la digestión en los patrones	92
6.3.5.2 Efecto del buffer de ionización en los patrones	94
6.3.5.3 Establecimiento del rango de linealidad	95
6.3.6 Experimentos de Validación	97
6.3.6.1 Límites de detección y cuantificación	98
6.3.6.2 Exactitud (expresada como E%)	98
6.3.6.3 Precisión	99
6.3.6.4 Sensibilidad de calibración del método	100
6.3.6.5 Recuperación	100
6.3.7 Estimación de la Incertidumbre de la Medición	102
6.3.7.1 Mesurando	102
6.3.7.2 Modelo matemático	102
6.3.7.3 Principio de medición	102
6.3.7.4 Identificación de fuentes de incertidumbre	102
6.3.7.5 Diagrama causa-efecto	102
6.3.7.6 Cálculos	102
6.3.8 Discusión de Resultados	105
6.3.9 Conclusiones	106

6.3.10 Recomendaciones	107
6.3.11 Control de Calidad y Seguimiento de Validación	107
6.4 DETERMINACIÓN DE CROMO POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA. 3111 D.	108
6.4.1 Alcance	108
6.4.2 Principio	108
6.4.3 Precauciones de Seguridad	108
6.4.4 Preparación de Soluciones de Trabajo	108
6.4.5 Experimentos de Estandarización	108
6.4.5.1 Efecto de la digestión en los patrones	108
6.4.5.2 Efecto del buffer de ionización en los patrones	109
6.4.5.3 Establecimiento del rango de linealidad	112
6.4.6 Experimentos de Validación	113
6.4.6.1 Límites de detección y cuantificación	113
6.4.6.2 Exactitud (expresada como E%)	114
6.4.6.3 Precisión	115
6.4.6.4. R & R	116
6.4.6.5 Sensibilidad de calibración del método	116
6.4.6.6 Recuperación	117
6.4.7 Estimación de la Incertidumbre de la Medición	118
6.4.7.1 Mesurando	118
6.4.7.2 Modelo matemático	118
6.4.7.3 Principio de medición	118
6.4.7.4 Identificación de fuentes de incertidumbre	118
6.4.7.5 Diagrama causa-efecto	118
6.4.7.6 Cálculos	118
6.4.8 Discusión de Resultados	121
6.4.9 Conclusiones	121
6.4.10 Control de Calidad y Seguimiento de Validación	122
BIBLIOGRAFÍA	123
ANEXOS	125

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Parámetros de calidad de un método.	29
Tabla 2. Actividades propuestas para la estandarización.	44
Tabla 3. Parámetros de calidad a evaluar para cada método.	45
Tabla 4. Precauciones de seguridad en la determinación de arsénico.	51
Tabla 5. Efecto de la digestión en los patrones de arsénico.	52
Tabla 6. Efecto de la reducción con yoduro en los patrones de arsénico.	54
Tabla 7. Curva 1 para establecer rango de linealidad en el análisis de arsénico.	56
Tabla 8. Test de residuales para linealidad en el análisis de arsénico. Curva 1.	57
Tabla 9. Curva 2 para establecer rango de linealidad en el análisis de arsénico.	57
Tabla 10. Test de residuales para linealidad en el análisis de arsénico. Curva 2.	58
Tabla 11. Curva 3 para establecer rango de linealidad en el análisis de arsénico.	59
Tabla 12. Test de residuales para linealidad en el análisis de arsénico. Curva 3.	59
Tabla 13. Datos obtenidos para el E. b en la validación del ensayo de arsénico.	61
Tabla 14. Ensayo adicional para confirmar el LD y el LC.	62
Tabla 15. Datos obtenidos para el E. m en la validación del ensayo de arsénico.	63
Tabla 16. Datos obtenidos para el E. a en la validación del ensayo de arsénico.	63
Tabla 17. Datos obtenidos para la repetibilidad intermedia en la validación del ensayo de arsénico.	64
Tabla 18. Datos obtenidos para la R & R en la validación del ensayo de arsénico.	65
Tabla 19. Datos de cada curva de calibración construida en la validación del ensayo de arsénico.	66
Tabla 20. Datos obtenidos para la recuperación en la validación del análisis de arsénico.	67
Tabla 21. Fuentes de incertidumbre para el análisis de arsénico.	68
Tabla 22. Datos para construir una curva de calibración para análisis de arsénico.	71

Tabla 23. Conclusiones acerca de los parámetros de calidad analítica para el método de determinación de arsénico.	76
Tabla 24. Precauciones de seguridad en la determinación de mercurio.	78
Tabla 25. Datos para construir la curva de calibración para establecer el rango de linealidad en el análisis de mercurio.	78
Tabla 26. Test de residuales para linealidad en el análisis de mercurio.	79
Tabla 27. Datos obtenidos para el E. b en la validación del ensayo de mercurio.	81
Tabla 28. Ensayo adicional para confirmar el LD y el LC en la validación del análisis de mercurio.	81
Tabla 29. Datos obtenidos para el E. m en la validación del ensayo de mercurio.	82
Tabla 30. Datos obtenidos para el E. a en la validación del ensayo de mercurio.	82
Tabla 31. Datos obtenidos para la repetibilidad intermedia en la validación del ensayo de mercurio.	83
Tabla 32. Datos de cada curva de calibración construida en la validación del ensayo de mercurio.	83
Tabla 33. Datos obtenidos para la recuperación en la validación del análisis de mercurio.	84
Tabla 34. Fuentes de incertidumbre para el análisis de mercurio.	85
Tabla 35. Datos para construir una curva de calibración para análisis de mercurio.	87
Tabla 36. Conclusiones acerca de los parámetros de calidad analítica para el método de determinación de mercurio.	90
Tabla 37. Precauciones de seguridad en la determinación de sodio.	91
Tabla 38. Efecto de la digestión en los patrones de sodio.	92
Tabla 39. Efecto del buffer de ionización en los patrones de sodio.	94
Tabla 40. Datos para establecer rango de linealidad en el análisis de sodio.	96
Tabla 41. Test de residuales para linealidad en el análisis de sodio.	96
Tabla 42. Datos obtenidos para el E. b en la validación del ensayo de sodio.	98
Tabla 43. Datos obtenidos para el E. m en la validación del ensayo de sodio.	98
Tabla 44. Datos obtenidos para el E. a en la validación del ensayo de sodio.	99
Tabla 45. Datos obtenidos para la repetibilidad intermedia en la validación del ensayo de sodio.	99
Tabla 46. Datos de cada curva de calibración construida en la validación del ensayo de sodio.	100
Tabla 47. Datos obtenidos para la recuperación en la validación del análisis de sodio.	101
Tabla 48. Fuentes de incertidumbre para el análisis de sodio.	102
Tabla 49. Conclusiones acerca de los parámetros de calidad analítica para el método de determinación de sodio.	106
Tabla 50. Efecto de la digestión en los patrones de cromo.	109

Tabla 51. Efecto del buffer de ionización en los patrones de cromo.	110
Tabla 52. Datos para establecer rango de linealidad en el análisis de cromo.	112
Tabla 53. Datos obtenidos para el E. b en la validación del ensayo de cromo.	113
Tabla 54. Ensayo adicional para confirmar el LD y el LC.	114
Tabla 55. Datos obtenidos para el E. m en la validación del ensayo de cromo.	114
Tabla 56. Datos obtenidos para el E. a en la validación del ensayo de cromo.	115
Tabla 57. Datos obtenidos para la repetibilidad intermedia en la validación del ensayo de cromo.	115
Tabla 58. R & R para el análisis de cromo.	116
Tabla 59. Datos de cada curva de calibración construida en la validación del ensayo de cromo.	116
Tabla 60. Datos obtenidos para la recuperación en la validación del análisis de cromo.	117
Tabla 61. Fuentes de incertidumbre para el análisis de cromo.	118
Tabla 62. Conclusiones acerca de los parámetros de calidad analítica para el método de determinación de cromo.	122

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Impacto Legal de los datos de análisis.	31
Figura 2. Diagrama del proceso de atomización en una llama.	37
Figura 3. Efecto de la digestión en los patrones de arsénico.	52
Figura 4. Comparación de absorbancias entre los patrones de arsénico con y sin digestión.	53
Figura 5. Efecto de la reducción con yoduro de los patrones de arsénico.	55
Figura 6. Comparación de absorbancias entre los patrones de arsénico con y sin reducción.	55
Figura 7. Curva 1 para establecer rango de linealidad en el análisis de arsénico.	56
Figura 8. Curva 2 para establecer rango de linealidad en el análisis de arsénico.	58
Figura 9. Residuales para linealidad en el análisis de arsénico. Curva 2.	59
Figura 10. Curva 3 para establecer rango de linealidad en el análisis de arsénico.	60
Figura 11. Residuales para linealidad en el análisis de arsénico. Curva 3.	60
Figura 12. Primer diagrama causa-efecto en la estimación de la incertidumbre de la medición en el análisis de arsénico.	69
Figura 13. Segundo diagrama causa-efecto en la estimación de la incertidumbre de la medición en el análisis de arsénico.	69
Figura 14. Curva de calibración para análisis de arsénico.	72
Figura 15. Contribuciones a la incertidumbre del análisis de arsénico.	74
Figura 16. Curva de calibración para establecer el rango de linealidad en el análisis de mercurio.	79
Figura 17. Residuales para linealidad en el análisis de mercurio.	80
Figura 18. Diagrama causa-efecto en la estimación de la incertidumbre de la medición en el análisis de mercurio.	86
Figura 19. Curva de calibración para análisis de mercurio.	87
Figura 20. Contribuciones a la incertidumbre del análisis de mercurio.	89
Figura 21. Efecto de la digestión en los patrones de sodio.	93
Figura 22. Comparación de absorbancias entre los patrones de sodio con y sin digestión.	93
Figura 23. Efecto del buffer de ionización en los patrones de sodio.	94
Figura 24. Comparación de absorbancias entre los patrones de sodio con y sin buffer de ionización.	95
Figura 25. Curva de calibración para establecer rango de linealidad en el análisis de sodio.	96

Figura 26. Residuales para linealidad en el análisis de sodio.	97
Figura 27. Diagrama causa-efecto en la estimación de la incertidumbre de la medición en el análisis de sodio.	103
Figura 28. Contribuciones a la incertidumbre del análisis de sodio.	105
Figura 29. Efecto de la digestión en los patrones de cromo.	109
Figura 30. Comparación de absorbancias de los patrones de cromo con y sin digestión.	110
Figura 31. Efecto del buffer de ionización en los patrones de cromo.	111
Figura 32. Comparación de absorbancias entre los patrones de Cromo con y sin buffer de ionización.	111
Figura 33. Curva de calibración para establecer rango de linealidad en el análisis de cromo.	112
Figura 34. Diagrama causa-efecto en la estimación de la incertidumbre de la medición en el análisis de cromo.	119
Figura 35. Contribuciones a la incertidumbre del análisis de cromo.	121

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Contraste estadístico de los datos del E. b para la validación del ensayo de arsénico usando el programa ProControl®.	125
Anexo B. Contraste estadístico de los datos del E. m para la validación del ensayo de arsénico usando el programa ProControl®.	126
Anexo C. Contraste estadístico de los datos del E. a para la validación del ensayo de arsénico usando el programa ProControl®.	127
Anexo D. Contraste estadístico de los datos de la repetibilidad intermedia (R I) y la repetibilidad y reproducibilidad (R & R) para la validación del ensayo de arsénico usando el programa ProControl®.	128
Anexo E. Tolerancias de pipetas y balones clase A. A 20 °C.	129
Anexo F. Concentraciones y tolerancias de los patrones CertiPur® de Merck trazables a NIST.	129
Anexo G. Contraste estadístico de los datos del E. b para la validación del ensayo de mercurio usando el programa ProControl®.	130

GLOSARIO¹

Análisis: Proceso que provee de información química o física a cerca de los constituyentes de una muestra o de la muestra en sí.

Analito: El constituyente de interés en una muestra.

Blanco del método (BK): Muestra que sin contener analito pasa a través de todos los pasos del método.

Calibración: Proceso para asegurar que la señal de la medición dada por un equipo o instrumento es correcta.

Curva de calibración: Resultado de la estandarización que muestra gráficamente como la señal del método cambia respecto a la cantidad de analito.

Determinación: Análisis de una muestra que busca la identidad, la concentración o las propiedades del analito.

Estandarización: Proceso para establecer la relación entre la cantidad de analito y la señal del método.

Exactitud: Diferencia entre el resultado obtenido y el resultado esperado, usualmente dividido entre el resultado esperado y reportado como porcentaje de error relativo, E%.

Incertidumbre: Rango de posibles valores para una medición.

Límite de cuantificación: Mínima cantidad de analito que puede ser cuantificada con un alto grado de confianza.

Límite de detección: Cantidad más pequeña de analito que puede ser detectada con confianza, pero no cuantificada.

Linealidad: Capacidad del método para producir resultados proporcionales, directamente o mediante una transformación matemática, a la concentración del analito en las muestras, dentro de un determinado rango.

Matriz: Todos los constituyentes de una muestra a excepción del analito.

¹ HARVEY, David. Modern Analytical Chemistry. USA: McGraw-Hill Higher Education, 2000. p. 35 – 47. ISBN 0-07-237547-7.

Medición: Determinación experimental de una propiedad química o física del analito, usualmente producto de la comparación con un patrón trazable a un estándar definido y aceptado.

Método: Forma de analizar una muestra para un analito específico en una matriz específica.

Muestra: Parte del sistema que se somete a análisis.

Precisión: Indicación de la reproducibilidad de la medida o resultado.

Procedimiento: Directriz escrita que resume cómo analizar una muestra.

Protocolo: Directriz escrita para analizar una muestra, especificada por una agencia.

Prueba t: Prueba estadística para comparar dos medias y ver si su diferencia es suficientemente grande para explicar errores indeterminados.

Prueba f: Prueba estadística para comparar dos varianzas y ver si su diferencia es suficientemente grande para explicar errores indeterminados.

Regresión lineal: Técnica matemática para ajustar una ecuación, a una tendencia lineal, obtenida experimentalmente.

Residual: Diferencia entre un valor experimental y el obtenido por la ecuación de regresión lineal.

Sensibilidad: Medida de la habilidad del método para distinguir entre dos muestras con diferente concentración de analito, reportada como el cambio de la señal por unidad de cambio en la cantidad de analito.

Técnica: Principio químico o físico que puede ser usado para analizar una muestra.

Validación: Es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto².

² INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Requisitos Generales Para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración. Geneva: ISO, 2005, 29 p. (NTC/ISO/IEC 17025:2005).

1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El Laboratorio de Química Ambiental, de la Universidad Tecnológica de Pereira, es un laboratorio que presta servicios de análisis de aguas, atendiendo la demanda de los sectores académico, industrial y de la comunidad en general.

Se encuentra acreditado bajo la norma NTC/ISO/IEC 17025:2005 “Requisitos Generales Para la Competencia de Laboratorios de Ensayo y de Calibración”, pero esta sólo cubre algunos de los ensayos que se efectúan en el Laboratorio. Como decisión estratégica, el Laboratorio ha decidido incluir en la acreditación los ensayos para la determinación de metales, pero debe primero validarlos como requisito de la norma antes mencionada.

2 JUSTIFICACIÓN

Se parte de la definición de **validación** como “la prueba documentada de que un proceso produce, de forma consistente, un resultado que cumple con unas especificaciones predeterminadas; se llega a cuatro razones para validar: para cumplir las normativas, optimizar procesos, asegurar la calidad – mejorar productividad y reducir costos”³. Además, es importante determinar el resultado correcto y ser capaz de demostrarlo.

Teniendo en cuenta que el análisis se considera un proceso mediante el cual se obtiene información dada por los resultados que genera, los cuales deben ser tan confiables como comparables con los obtenidos en otros laboratorios, y que dicha confianza es aportada por la validación, junto con otras actividades englobadas en el aseguramiento de la calidad, se hace necesario validar⁴.

Todo método tiene una finalidad, el papel de la validación es verificar que dicho método es el adecuado, por lo tanto, una correcta validación debe detectar la presencia de errores en él y permitir corregirlos, con lo que se asegura unos resultados de mayor confiabilidad y técnicamente válidos que es lo que el cliente requiere y que el Laboratorio de Química Ambiental (LQA) quiere ofrecer, además de ser un requerimiento indispensable para la acreditación.

El LQA se encuentra acreditado por la Superintendencia de Industria y Comercio bajo la norma NTC/ISO/IEC 17025:2005 “Requisitos Generales Para la Competencia de Laboratorios de Ensayo y de Calibración”. La acreditación cubre los ensayos de: Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅), Oxígeno Disuelto, pH, Conductividad, Sólidos Suspendidos Totales (SST), Fósforo Total y Demanda Química de Oxígeno (DQO).

En coherencia con la filosofía del mejoramiento continuo adoptada por el LQA y atendiendo la demanda de los usuarios se desea ampliar el alcance de la acreditación cubriendo los ensayos de As, Hg, Na y Cr. Para tal fin, deben validarse los métodos de determinación de estos metales de acuerdo con los requerimientos de la norma antes mencionada. Uno de los mecanismos para monitorear la eficiencia de estos métodos analíticos es la estandarización, etapa previa a la validación⁵.

³ La Importancia de la Validación. En: Técnicas de Laboratorio. No 269 (2002); p. 110 – 111.

⁴ RIUS, F. Xavier. MAROTO, Alicia. BOQUÉ, Ricard. RIU, Jordi. La Validación de Métodos Analíticos. En: Técnicas de Laboratorio. No 252 (2000); p. 382 – 385.

⁵ SECRETARÍA DE SALUD DE BOGOTÁ. Estandarización de Metodologías Analíticas en el Laboratorio de Salud Pública. Bogotá: Secretaría de Salud de Bogotá, 2002. 10 p.

Lo que se quiere lograr es un método de calidad dado por unos parámetros (llamados de calidad) calculables mediante herramientas matemático – estadísticas, tales como: exactitud, precisión, sensibilidad, selectividad, límites de detección y cuantificación, entre otros. La representatividad aunque es otro parámetro de calidad, está ligada fundamentalmente a la toma de muestras. Por lo tanto, la validación de un método consiste en una etapa de evaluación, donde algunos de estos parámetros escogidos son evaluados bajo las condiciones del mismo.

Un método siempre debe validarse cuando es necesario verificar que sus parámetros de calidad se adecuan al problema analítico particular que se debe resolver en el laboratorio⁶.

⁶ RIUS, Op. cit., p. 382 – 385.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Aplicar una metodología para estandarizar y validar los ensayos de As, Cr, Hg y Na por Espectrometría de Absorción Atómica en el Laboratorio de Química Ambiental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar y validar los métodos para determinar As y Hg aplicando la Técnica de Generación de Hidruros.
- Estandarizar y validar el método para determinar Na aplicando la Técnica de Llama usando mezcla Aire/Acetileno.
- Estandarizar y validar el método para determinar Cr aplicando la Técnica de Llama usando mezcla Óxido Nitroso/Acetileno.

4 MARCO DE REFERENCIA

4.1 CONCEPTO DE CALIDAD⁷

“Como ciudadanos de un mundo moderno y como consumidores en una sociedad confortable, esperamos obtener los más altos estándares de calidad en todos los aspectos de nuestras vidas. Cuando compramos un carro, esperamos poder conducirlo miles de millas libre de defectos por mano de obra. Cuando elegimos nuestros gobernantes y pagamos nuestros impuestos, esperamos un gobierno que muestre interés en escuelas con altos estándares académicos, aire y agua libre de contaminación, y una infraestructura sólida y en buen estado. Cuando pagamos las facturas de los servicios esperamos siempre tener electricidad, calor, agua y un sistema de alcantarillado en buen estado para nuestras casas. Un estilo de vida con calidad significa excelencia en productos de consumo, en medio ambiente, salud y seguridad, servicios gubernamentales y la lista continúa.”

“Cada agencia gubernamental y cada compañía privada describe el término calidad según sus propios intereses. Una constructora puede especificar un grado particular de madera en su construcción de casas. Una tienda de ropa puede ofrecer y vender productos que reflejen la reputación que deseen sostener con el público en relación a la calidad y el precio. Una agencia de salud gubernamental busca proveer de políticas y servicios de salud a sus ciudadanos que así lo requieran. Una compañía farmacéutica adquiere materia prima, mantiene un área de manufactura, empleados, y asegura la calidad de sus productos para continuar funcionando indefinidamente como productora de drogas y medicinas que el público desee comprar.”

“Algunas de estas agencias y compañías gubernamentales o privadas, por la naturaleza de sus negocios utilizan los servicios de un laboratorio de química analítica como parte de su necesidad de asegurar la calidad requerida. Por ejemplo, las administraciones municipales emplean un laboratorio de química para analizar el abastecimiento de agua a los ciudadanos según bases regulares para asegurar que está libre de agentes tóxicos. La compañía farmacéutica tiene su propio laboratorio de química analítica que rutinariamente prueba los productos que producen, así como la materia prima para asegurarse que cumplen con los requisitos necesarios. Una planta de fertilizantes utiliza un laboratorio químico para confirmar que las composiciones de sus productos cumplen las especificaciones indicadas para cada tipo de fertilizante. Las compañías que procesan productos alimenticios, tales como frituras, quesos, cereales, o productos cárnicos, deben

⁷ KENKEL, John. A Primer on Quality in the Analytical Laboratory. USA: National Science Foundation, 2000. p. 1-3. ISBN 1-566-70516-9.

tener un laboratorio de química analítica como parte de su operación porque quieren asegurar que lo que producen cumple sus propias especificaciones de calidad, consistencia, y seguridad además de las demandadas por agencias gubernamentales como la Food and Drug Administration."

"En estos casos, el laboratorio analítico es un componente entre muchos en el esquema de Calidad Total".

Además, como se dijo anteriormente, las diferentes agencias gubernamentales ejercen labores de vigilancia y control sobre las múltiples industrias existentes, disponiendo lineamientos sobre especificaciones de los productos o servicios que estas ofrecen. También ejercen acciones sobre el impacto negativo en el ambiente o sobre el consumidor mismo. Igual que sobre materias o productos importados y exportados.

4.2 CONCEPTO DE ESTANDARIZACIÓN⁸

El laboratorio de química analítica, cualquiera que sea su esfera de aplicación, constantemente genera datos que son usados para tomar decisiones o aplicar acciones. Así, en una central lechera, los datos del análisis de un lote de leche son usados para permitir o no que este sea distribuido en el mercado, como también pueden usarse para determinar si este lácteo es el más adecuado para un tipo especial de queso, yogurt o cualquier otro producto derivado.

Diariamente los laboratorios generan datos. A nivel interno, para generar dichos datos, los laboratorios requieren de equipos, reactivos, materiales de vidrio, metálicos y/o plásticos, y métodos de ensayo o analíticos. Obviamente, también es necesario que dicho laboratorio tenga políticas, objetivos, visiones, lineamientos y demás características propias de un sistema.

En la práctica, los métodos analíticos son establecidos por instituciones nacionales o internacionales, quienes entregan unos procedimientos y características funcionales del método, que concluyen con unos indicadores de calidad, denominados **características del desempeño analítico** y que suelen incluir: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango analítico.

Ejemplos de lo anterior son: el Standard Methods para los laboratorios de análisis de aguas y la USP (United States Pharmacopea) para los laboratorios farmacéuticos.

⁸ La Práctica de las Curvas de Calibración. Departamento de Metrología, Mol Labs Ltda. [en línea] <http://www.mollabs.com/desarrollo>

La implementación de un método analítico en un laboratorio de servicios de ensayo implica replicar los procedimientos y características funcionales del método, definidos por la entidad de referencia, y verificar que en el laboratorio propio se obtienen respuestas similares en el desempeño analítico medido por los indicadores establecidos.

La implementación del método en un laboratorio de servicios internos para una industria requiere de las mismas acciones y puede llegar o no a respuestas similares según sean las necesidades de precisión o incertidumbre de medida requeridas para la medida a realizar sobre un proceso particular.

La incertidumbre de la medida es inversamente proporcional al cumplimiento de los requerimientos: mientras más estrictamente se cumplan los requerimientos, menor la incertidumbre del resultado. Pero al mismo tiempo la exactitud es proporcional a los costos, esto es, menor incertidumbre mayores costos, por tanto, en la implementación es necesario considerar siempre las verdaderas necesidades de exactitud requeridas.

Es decir que son resultados válidos de la implementación del mismo método las respuestas 100 ± 5 mg/L ó 100 ± 20 mg/L, siempre y cuando correspondan a una adecuada evaluación de la incertidumbre reportada. La validez, o lo adecuado, del resultado analítico con su sesgo incluido, sólo está determinada por la certeza de las decisiones que se han de tomar con base en ellos. La validación del método analítico, como se ha denominado el procedimiento descrito, parece compleja pero en realidad se reduce a la utilización integral de los datos obtenidos en sucesivas calibraciones planeadas para el efecto, soportadas en equipos, material de vidrio, patrones y agua para laboratorio con la certificación de calidad necesaria.

4.2.1 Equipos y Materiales

El primer paso en el trabajo analítico es verificar que los equipos a utilizar, sean apropiados y se encuentran en el estado adecuado para el trabajo a realizar. Los equipos se deben verificar que se encuentran operando en las condiciones establecidas por los fabricantes en cuanto a requerimientos del sitio, espacio, flujo eléctrico y en cuanto a la respuesta funcional de todos sus componentes. Por ejemplo, en el caso de la balanza analítica, se exige que ésta se encuentre ubicada sobre una mesa antivibratoria diseñada para tal efecto.

La cualificación de la operación del equipo busca verificar que el equipo está operando de acuerdo con las especificaciones del fabricante. En general se trata de una verificación de condiciones físicas, por ejemplo, en cuanto a ajuste de la longitud de onda, intensidad de la señal de la lámpara, etc.

La cualificación del desempeño del equipo verifica que el equipo responde como se espera a un procedimiento analítico bien establecido.

Para el caso de material volumétrico: pipetas, buretas y matraces, es conveniente utilizar material calibrado de fábrica, caso en el cual la fábrica debe entregar el documento que certifica la calidad del material en cuestión.

En el equipo de vidrio se debe verificar su integridad, en cuanto debe estar en perfecto estado, sin ningún tipo de roturas ni “despicados”. Debe estar perfectamente limpio, en cuanto a ausencia de grasas y otros contaminantes químicos que puedan alterar el normal flujo de las soluciones a manejar en el curso de las operaciones.

El material volumétrico no debe mezclarse con otro material de laboratorio, para evitar contaminaciones cruzadas. Debe ser lavado inmediatamente después de ser utilizado, mediante al menos tres enjuagues con agua del grifo, seguido de un enjuague con detergente neutro para vidrio, en la dilución indicada, otros al menos tres enjuagues con agua y finalmente otros tres enjuagues con el agua más pura a disposición en el laboratorio. Al momento de la utilización del material, también es conveniente enjuagar un par de veces, con agua de calidad. Cuando las concentraciones de analito en muestras y patrones sean menores que 10 ppm, será necesario asegurar un enjuague óptimo, que puede incluir ácido clorhídrico 1M si se determinarán aniones, o ácido nítrico 1M si se analizarán cationes. Ambos casos requieren de al menos tres enjuagues finales con agua de la mejor calidad. Como resultado del lavado, después de vaciarlo el material debe mantener una película homogénea de agua cubriendo el vidrio. En general, si el material presenta residuos de grasa u otros contaminantes la película se rompe, y serán necesarios tratamientos más fuertes para la limpieza, hasta conseguir el resultado descrito.

4.2.2 Sustancias Patrón y Reactivos

Los patrones, mejor las sustancias químicas patrón son especies químicas fáciles de obtener y purificar, y en particular estables en condiciones adecuadas de almacenamiento. Los patrones primarios son un grupo de sustancias utilizadas como referencia para diferentes análisis.

Para implementar un método analítico será necesario contar con el patrón primario, o uno trazable contra un patrón primario, que puede ser bien uno autorizado por NIST (National Institute of Standards and Technology), u otro comercial cuya documentación garantice dicha trazabilidad. Además deben ser utilizados en las condiciones establecidas por la entidad que los certifica, en particular en cuanto a condiciones de almacenamiento, y en muchas ocasiones, de secado.

La utilización de reactivos no trazables puede implicar fuertes desviaciones en la exactitud de la medida, con sesgos sistemáticos amplios, y en especial, desconocidos.

La calidad de los reactivos complementarios es importante para evitar el aumento en la incertidumbre de la determinación. Los solventes grado cromatográfico o espectrofotométrico no pueden ser reemplazados por reactivos analíticos corrientes, porque sus requerimientos de ausencia de material en suspensión y de mínima absorbancia no son especificaciones que les correspondan. En general los reactivos complementarios suelen ser utilizados en exceso para garantizar que los avances de las reacciones sean rápidos y completos, pero sus altas concentraciones también significan que entregan altas de impurezas. Como regla general, las soluciones madre para espectrofotometrías suelen ser preparadas dentro del orden de 1000 mg/L, rango en el cual suelen ser estables por largo tiempo. Las soluciones con concentraciones de analito en el orden de 100 mg/L son estables por poco tiempo, no son seguras para uso durante más de una semana, y las soluciones de concentraciones menores a 10 mg/L sólo son seguras para uso en el mismo día de su preparación. Las soluciones coloreadas pueden ser afectadas de muy diferentes maneras por la luz y por tanto es conveniente utilizarlas y desecharlas en el mismo día.

Para la preparación de las soluciones de concentración variable necesarias para la calibración se utilizará agua de la mejor calidad accesible pero, al mismo tiempo, de la misma calidad con la cual serán preparadas las muestras. Es comprensible que un cambio en la pureza del agua utilizada en la preparación de los patrones, respecto de las muestras, entregará resultados fuera de control, que no corresponden a las condiciones preestablecidas, que son las definidas por los patrones.

4.2.3 Curvas de Calibración

Entre las características definidas por las entidades internacionales para un método analítico está su linealidad⁹, definida como la habilidad de un método analítico para entregar resultados proporcionales a la concentración de un analito en un rango específico. Solo algunas veces, los procedimientos analíticos propuestos llegan a proponer los datos de una curva de calibración típica, pero en todos los casos la información es suficiente para definir las concentraciones de las soluciones a preparar para obtener la curva de calibración.

Un primer objetivo en la implementación y validación de un método analítico es verificar el comportamiento del sistema en el laboratorio propio, para ello se construye una curva de calibración con un mínimo de cinco puntos, para un

⁹ Del inglés *linearity* que para efectos prácticos será equivalente a *linealidad*.

intervalo de confianza del 95%, un óptimo de siete puntos, para un intervalo de confianza del 95%, y un máximo de ocho puntos, para un intervalo de confianza del 99%.

La validación y revalidación, por tanto de una curva de calibración tan estricta como la descrita, se lleva a cabo únicamente durante la implementación del método o cuando alguna condición analítica cambia, un ejemplo típico es el cambio de la lámpara en espectrometría UV-Visible. Como recomendación de la norma NTC/ISO/IEC 17025:2005 es conveniente revalidar los métodos con cierta periodicidad.

Es conveniente insistir en que las determinaciones de la química analítica tienen una gran variedad de usos, cada uno de los cuales implica unos particulares requerimientos de calidad. Puesto que la exactitud y los costos se desplazan en sentidos opuestos, una solución de compromiso es la decisión práctica más adecuada. Las curvas de calibración preparadas tal como se han descrito anteriormente corresponden a las de los mayores requerimientos en calidad y exactitud, pero quizá en la mayoría de los casos es posible una reducción de las especificaciones y operaciones que aún lleva a resultados aceptables para la toma de las decisiones.

En general, para cada uso de una determinación existe una entidad nacional o internacional que ha definido las propiedades o especificaciones de los análisis a realizar para cumplir con su cometido. En particular, para cada caso y con el fin de asegurar que las decisiones analíticas son correctas, es conveniente consultar con un experto.

4.3 CONCEPTO DE VALIDACIÓN

“Hacer la validación de un método minuciosamente puede ser tedioso, pero las consecuencias de no hacerlo puede traducirse en pérdida de tiempo, dinero y recursos”.

La habilidad para proveer datos a tiempo, exactos y fiables es el papel central de los químicos analíticos, y es necesario, por ejemplo, en el descubrimiento, desarrollo y fabricación de fármacos, ya que se usan datos analíticos para monitorear drogas experimentales, ayudar en el desarrollo de drogas sintéticas, soportar los estudios de formulación, monitorear la estabilidad de la mayor parte de fármacos y productos formulados, y probar los productos finales antes de hacerlos públicos. La calidad de estos datos analíticos es un factor clave en el

éxito de programas para desarrollar drogas. El desarrollo del método y el proceso de validación tienen un impacto directo sobre la calidad de estos datos¹⁰.

Validar un método de análisis consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos previamente establecidos. La definición de la norma NTC/ISO/IEC 17025:2005 es: “confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”¹¹.

Se realizan millones de análisis cada día en los ámbitos más variados: análisis de productos manufacturados, medioambientales, clínicos, forenses, químicos y físicos. En todos ellos se requiere una confianza en los resultados obtenidos. La validación de los métodos analíticos, junto con otras actividades englobadas en la gran área del aseguramiento de la calidad, permite conseguir calidad en los datos generados, otorgando la confianza necesaria a la vez que confieren un grado elevado de comparabilidad entre los resultados de los análisis químicos.

Si las medidas que se realizan son en el ámbito del análisis de magnitudes físicas, la calibración de aparatos e instrumentos adquiere un papel determinante.

Desde la vertiente económica, los costos asociados al proceso analítico suelen ser elevados y surgen costos adicionales ligados a las decisiones que se toman sobre la base de los resultados obtenidos. Por ejemplo, no es permitido el lujo para ninguna industria, que les devuelvan un lote de producto expedido en función de unos resultados analíticos que erróneamente expresaban conformidad a la norma vigente. Una correcta validación del método debería haber detectado la presencia de errores en los resultados emitidos.

Los requisitos analíticos para un uso específico determinan los parámetros o criterios de calidad del método a utilizar para resolver el problema. Estos criterios de calidad, llamados “*performance characteristics*” o “*figures of merit*” en inglés, pueden ser de tipo estadístico o de tipo operativo / económico. Entre los primeros figuran los parámetros fundamentales de exactitud (relacionada con la trazabilidad) y precisión (relacionada con la incertidumbre) y los secundarios de selectividad, sensibilidad, límites de detección y de cuantificación, y robustez. La representatividad es, asimismo, un parámetro de calidad importante que está ligado fundamentalmente a la toma de muestras. Entre los criterios de tipo operativo / económico se encuentran la facilidad de comprensión del método y manejo de la instrumentación, la rapidez del análisis, su costo, la inversión, el mantenimiento, etc.

¹⁰ GREEN, J. Mark. A Practical Guide to Analytical Method Validation. En: Analytical Chemistry. 68 (may, 1996); 305A-309A.

¹¹ INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Op. cit., 29 p.

La validación de un método consiste en una etapa de evaluación, donde algunos parámetros escogidos son evaluados bajo las condiciones del método.

Un método siempre debe validarse cuando es necesario verificar que sus parámetros de calidad se adecúan al problema analítico particular que debemos resolver en nuestro laboratorio.

Tabla 1. Parámetros de calidad de un método.

Tipo Matemático-estadístico	Tipo Operatorio-económico
- Exactitud, Trazabilidad - Precisión, Incertidumbre - Representatividad - Sensibilidad - Selectividad - Límites - Robustez	- Inversión - Mantenimiento - Rapidez - Facilidad de uso - Simplicidad - Gastos directos - Gastos indirectos

4.3.1 Normas Básicas de la Validación

- a. Debe validarse el procedimiento completo
- b. Debe validarse todo el intervalo de concentraciones
- c. Debe validarse teniendo en cuenta la variedad de matrices

Es importante remarcar que el laboratorio que desea utilizar para el análisis de rutina un método analítico previamente validado es el responsable de asegurar que dicho método es válido para el uso propuesto en las condiciones de análisis rutinario¹².

4.4 NORMATIVIDAD

La acreditación de laboratorios de ensayo se concede en base al cumplimiento de la norma NTC/ISO/IEC 17025:2005 “Requisitos Generales Para la Competencia de Laboratorios de Ensayo y de Calibración”. Esta menciona acerca de la validación y la incertidumbre lo siguiente¹³:

Numeral 5.4.5.2 El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las

¹² RIUS, Op. cit., p. 382 – 385.

¹³ INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Op. cit., p. 21-23.

necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto.

Numeral 5.4.5.3 La gama y la exactitud de los valores que se obtienen empleando métodos validados (por ejemplo, la incertidumbre de los resultados, el límite de detección, la selectividad del método, la linealidad, el límite de repetibilidad o de reproducibilidad, la robustez ante influencias externas o la sensibilidad cruzada frente a las interferencias provenientes de la matriz de la muestra o del objeto de ensayo) tal como fueron fijadas para el uso previsto, deben responder a las necesidades de los clientes.

Numeral 5.4.6.2 Los laboratorios de ensayo deben tener y deben aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de la medición. En algunos casos la naturaleza del método de ensayo puede excluir un cálculo riguroso, metrológica y estadísticamente válido, de la incertidumbre de medición. En estos casos el laboratorio debe, por lo menos, tratar de identificar todos los componentes de la incertidumbre y hacer una estimación razonable, y debe asegurarse de que la forma de informar el resultado no dé una impresión equivocada de la incertidumbre. Una estimación razonable se debe basar en un conocimiento del desempeño del método y en el alcance de la medición y debe hacer uso, por ejemplo, de la experiencia adquirida y de los datos de validación anteriores.

Numeral 5.4.6.3 Cuando se estima la incertidumbre de la medición, se deben tener en cuenta todos los componentes de la incertidumbre que sean de importancia en la situación dada, utilizando métodos apropiados de análisis.

4.5 IMPACTO LEGAL DE LOS DATOS DE ANÁLISIS

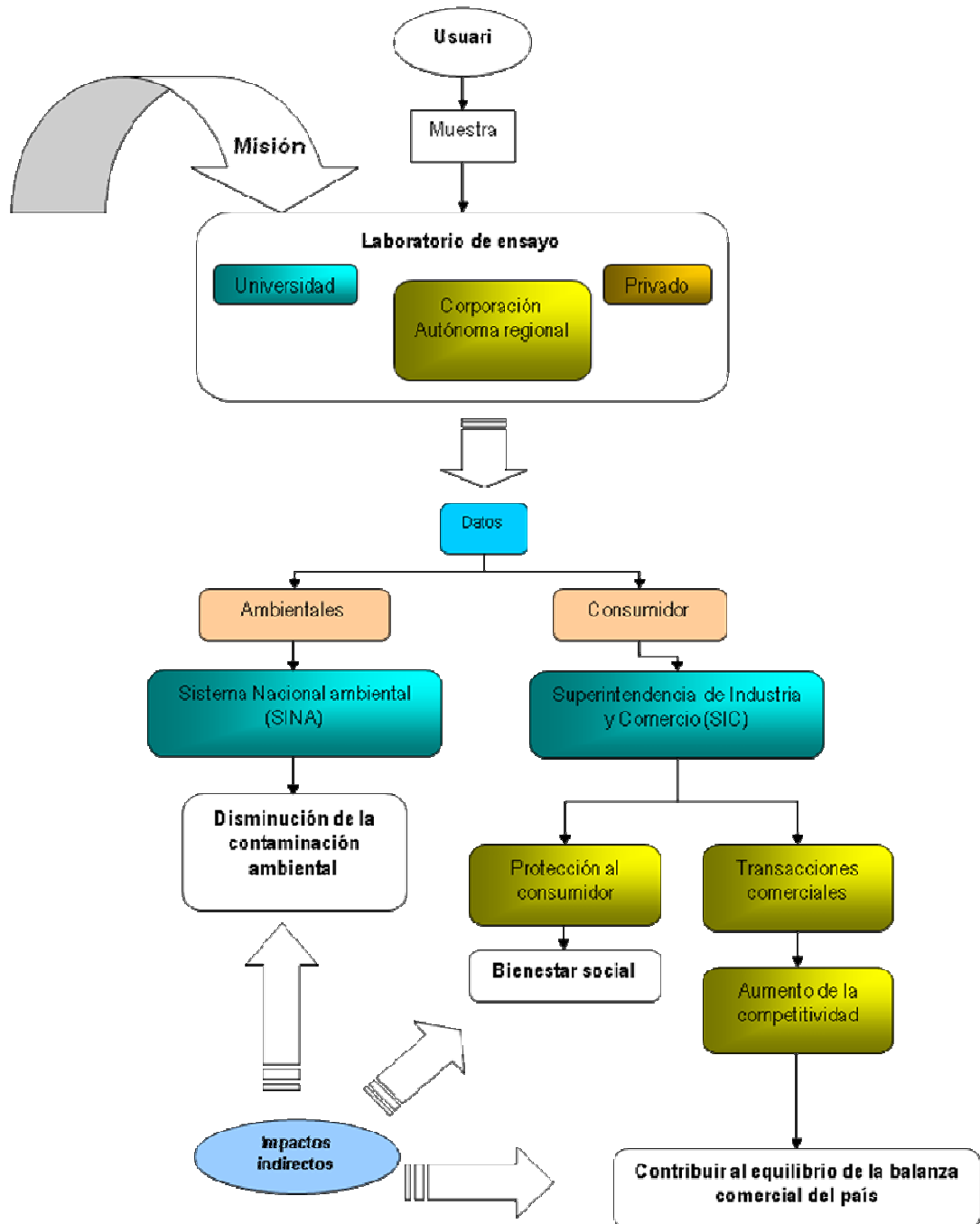
El sector industrial, los entes de control y vigilancia y la comunidad en general, requieren de datos de análisis de productos de consumo, de materias primas, de subproductos, de residuos y del medioambiente, para múltiples propósitos: ejercer control de calidad para cumplir estándares de calidad, ejercer labores de control y vigilancia para proteger el medioambiente y al consumidor, entre otros propósitos.

En términos legales, los datos se pueden dividir en dos tipos según su finalidad: los que van dirigidos a la protección del medio ambiente, y los que se enfocan en la protección del consumidor.

Los del primer tipo no pretenden acabar con la contaminación generada por la industria, sino a su disminución y control por parte del Sistema Nacional Ambiental SINA. Aunque su verdadero impacto tiene un componente legal. Estos datos son determinantes, por ejemplo, en la imposición de multas o sanciones en el caso de

los vertimientos en fuentes naturales o a la emanación de gases. Por consiguiente, es de gran importancia la veracidad de los datos ya que tienen peso legal.

Figura 1. Impacto Legal de los datos de análisis¹⁴.



¹⁴ Aporte hecho por Clara I. Arango y Lina M. García.

Los datos dirigidos a la protección del consumidor (del segundo tipo) pueden llegar a ser más complejos por sus múltiples variables. Estos pueden ir desde impedir la venta o distribución de productos manufacturados por no cumplir con especificaciones, hasta demandas por parte del consumidor o del estado por efectos adversos en la salud, que se traduce en pérdidas de mucho dinero.

La Superintendencia de Industria y Comercio perteneciente al Ministerio de Protección Social, es la agencia gubernamental encargada de todo lo referente al consumidor.

En la actualidad, con todo lo referente a la globalización y el pendiente Tratado de Libre Comercio, se abren nuevos mercados internacionales dando la oportunidad a Colombia de exportar sus productos. Con todo esto, para competir en el mercado internacional se debe mostrar competencia y uno de los indicadores de ella es la calidad de los productos a exportar con el cumplimiento de estándares internacionales. Esto tiene un impacto directo en los laboratorios de química analítica que deben implementar protocolos internacionales y trabajar por el reconocimiento como un laboratorio competente que genera datos técnicamente válidos, es decir, por la acreditación.

4.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN

4.6.1 La Luz¹⁵

La luz es de doble naturaleza, CORPUSCULAR Y ONDULATORIA. En base a su carácter ondulatorio la luz se comporta como una onda y cumple las leyes que rigen a los movimientos ondulatorios. Es reflejada, difractada, transmitida, etc.

Está formada por un componente eléctrico y otro magnético, es decir, es electromagnética. Estos componentes son vectores perpendiculares entre sí.

Cualquier onda electromagnética (luz) se mueve en el vacío con una velocidad (C_0) de 300000000 metros por segundo aproximadamente, esta depende del medio en que se mueva la radiación.

Cada radiación luminosa está caracterizada por una frecuencia (ν) que no depende del medio en el cual se transmite y una longitud de onda (λ) que sí depende de él.

$$C_1 = \nu \lambda$$

¹⁵ TORRENEGRA, Rubén Darío. Introducción al Análisis Químico Moderno. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, 1990. p. 24.

Donde C_1 es la velocidad de dicha radiación en un medio determinado. En el vacío $C_1 = C_0$

4.6.2 Absorción de Radiación

Cuando la radiación atraviesa la capa de un sólido, un líquido o un gas, ciertas frecuencias pueden eliminarse selectivamente por absorción, un proceso en el que la energía electromagnética se transfiere a los átomos, iones o moléculas que componen la muestra. La absorción provoca que estas partículas pasen de un estado normal a temperatura ambiente, también llamado estado fundamental, a uno o más estados excitados de energía superior.

De acuerdo con la teoría cuántica, los átomos, moléculas o iones sólo tienen un número limitado de niveles de energía discretos; de modo que para que se produzca la absorción de la radiación, la energía de los fotones excitadores debe coincidir exactamente con la diferencia de energía entre el estado fundamental y uno de los estados excitados de las especies absorbentes. Como estas diferencias de energía son características para cada especie, el estudio de las frecuencias de la radiación absorbida proporciona un medio para caracterizar los componentes de una muestra.

4.6.3 Absorción Atómica

El paso de radiación policromática ultravioleta o visible a través de un medio constituido por partículas monoatómicas, como mercurio o sodio gaseosos, produce la absorción de sólo unas pocas frecuencias bien definidas. La relativa simplicidad de dichos espectros se debe al pequeño número de posibles estados de energía de las partículas absorbentes¹⁶.

4.6.4 Espectrometría de Absorción Atómica

4.6.4.1 Principio

Los principios teóricos de la Absorción Atómica fueron establecidos en 1840 por Kirchhoff y Bunsen en sus estudios del fenómeno de autoabsorción en el espectro de los metales alcalinos y alcalinotérreos.

La base de la Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA) la entregó Kirchhoff al formular su ley general: "cualquier materia que pueda emitir luz a una cierta

¹⁶ SKOOG, Douglas A. HOLLER, F. James. NIEMAN, Timothy A. Principios de Análisis Instrumental. Quinta Edición. Madrid: McGraw-Hill / Interamericana España, S. A. U., 2001. p. 141.

longitud de onda también absorberá luz a esa longitud de onda”. El significado práctico de esto fue recién desarrollado en 1955 por el australiano Walsh, apareciendo los primeros instrumentos comerciales a principios de 1960.

El átomo consiste de un núcleo y de un número determinado de electrones que llenan ciertos niveles cuánticos. La configuración electrónica más estable de un átomo corresponde a la de menor contenido energético conocido como “estado fundamental”.

Si un átomo que se encuentra en un estado fundamental absorbe una determinada energía, éste experimenta una transición hacia un estado particular de mayor energía. Como este estado es inestable, el átomo regresa a su configuración inicial, emitiendo una radiación de una determinada frecuencia.

La frecuencia de la energía radiante emitida corresponde a la diferencia energética entre el estado excitado (E_1) y el estado fundamental (E_0) como se encuentra descrito en la ecuación de Planck:

$$E = E_1 - E_0 = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

h	=	Constante de Planck
v	=	Frecuencia
c	=	Velocidad de la luz
λ	=	Longitud de onda

Según la teoría atómica, el átomo puede alcanzar diferentes estados (E_1 , E_2 , E_3, \dots) y de cada uno de ellos emitir una radiación (λ_1 , λ_2 , λ_3, \dots) característica, obteniéndose así un espectro atómico, caracterizado por presentar un gran número de líneas discretas. En Absorción Atómica, es relevante solamente aquella longitud de onda correspondiente a una transición entre el estado fundamental de un átomo y el primer estado excitado y se conoce como longitud de onda de resonancia.

De la ecuación de Planck, se tiene que un átomo podrá absorber solamente radiación de una frecuencia específica. En Absorción Atómica interesa medir la absorción de esta radiación de resonancia al hacerla pasar a través de una población de átomos libres en estado fundamental. Estos absorberán parte de la radiación en forma proporcional a su concentración atómica.

La relación entre absorción y concentración se encuentra definida en la Ley de Bourguer - Beer – Lambert¹⁷.

¹⁷ BROEKAERT, José A. C. Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas. Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 2002. p. 148 – 150. ISBN 3-527-30146-1.

$$A = -\log T = \epsilon bC$$

Donde: **A**: Absorbancia
T: Transmitancia
 ϵ : Coeficiente de absortividad molar
b: Espesor de la celda o camino óptico
C: Concentración de la especie absorbente

Como el camino óptico de la radiación permanece constante y el coeficiente de absortividad es característico para cada elemento, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes¹⁸.

4.6.4.2 Equipo de Espectrometría de Absorción Atómica

Los componentes básicos de un equipo de absorción atómica son:



La **fente radiante** más común para las mediciones de Absorción Atómica es la lámpara de cátodo hueco, que consiste en un cilindro relleno con un gas inerte dentro del cual se encuentra un cátodo (construido del metal a analizar) y un ánodo. Al aplicar un cierto potencial a través de los electrodos esta fuente emite el espectro atómico del metal del cual está construido el cátodo.

En la EAA se utilizan **atomizadores** con y sin llama para producir átomos libres del metal en el haz de la radiación. El atomizador con llama está compuesto de un nebulizador y un quemador. La solución de la muestra es convertida primero a un fino aerosol, y luego llevada a la llama que entrega la energía suficiente para evaporar el solvente y descomponer los compuestos químicos resultantes en átomos libres en su estado fundamental. Las mezclas de gases más usados para producir la llama adecuada son: aire/propano, aire/acetileno y óxido nitroso/acetileno. Generalmente, la elección dependerá de la temperatura requerida para la disociación de los compuestos y de las características químicas del elemento a determinar.

En los atomizadores sin llama, como la atomización electrotérmica con horno de grafito, el vapor atómico se genera en un tubo de grafito calentado eléctricamente, en cuyo interior se ubica la muestra. Estos atomizadores presentan diversas

¹⁸ SKOOG, Op. cit., p. 321 – 325.

ventajas, como una alta eficiencia en generar vapor atómico, permite el empleo de pequeños volúmenes de muestra y análisis directo de muestras sólidas.

Los EAA poseen generalmente **monocromadores** de red con montaje de Littrow o de Czerny-Turner. Estos monocromadores permiten aislar la línea de resonancia del espectro emitido por la lámpara de cátodo hueco.

Como **detector**, se emplea un tubo fotomultiplicador que produce una corriente eléctrica, la cual es proporcional a la intensidad de la línea aislada por el monocromador. Un **amplificador** selectivo amplifica la señal pasando luego a un **dispositivo de lectura** que puede ser un voltímetro digital o un registrador u otros¹⁹.

4.6.4.3 Aplicaciones

La EAA constituye una de las técnicas más empleadas para la determinación de más de 60 elementos, principalmente en el rango de mg/L y µg/L, en una gran variedad de muestras.

Entre algunas de sus múltiples aplicaciones tenemos el análisis de: aguas, muestras geológicas, muestras orgánicas, metales y aleaciones, petróleo y sus subproductos; y de amplia gama de muestras de industrias químicas y farmacéuticas.

La EAA con llama es el método más empleado para la determinación de metales en una amplia variedad de matrices. Su popularidad se debe a su especificidad, sensibilidad y facilidad de operación. En este método la muestra es directamente aspirada a una llama de flujo laminar. La llama tiene como función generar átomos en su estado fundamental, de los elementos presentes en la muestra. Temperaturas entre los 1,500 y 3,000 °C son suficientes para producir la atomización de un gran número de elementos, los que absorberán parte de la radiación proveniente de la fuente luminosa.

Otros sistemas han sido descritos con el fin de mejorar la eficiencia de la atomización, en los cuales se deposita la muestra sólida o como suspensión en un accesorio especial para introducirlo a la llama (navecilla de tantalio, cubeta de Delves).

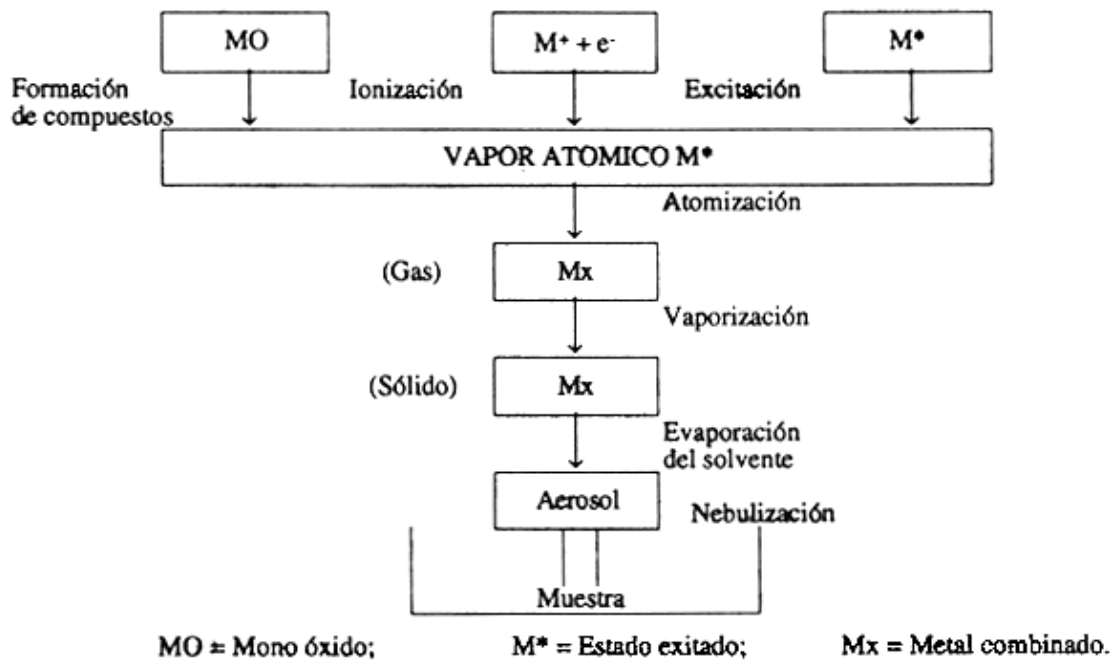
Desde el inicio, en 1955, de la EAA como método de análisis, hubo un nuevo ímpetu de desarrollar sistemas de atomización con llama, además de existir un interés continuo en conocer el mecanismo mediante el cual la muestra es convertida a vapor atómico en la llama. El resultado fue el desarrollo de un quemador con un cabezal de ranura, obteniéndose de este modo un camino óptico

¹⁹ BROEKAERT, Op. cit., p. 150 – 158.

alargado a través de la llama, lo que proporciona una mayor sensibilidad al método. Estos quemadores emplean generalmente una cámara de premezclado de oxidante/combustible en combinación con un sistema para aspirar la muestra a la llama.

En la figura 2 se observan los procesos que experimenta una muestra con estos sistemas de atomización en la llama.

Figura 2. Diagrama del proceso de atomización en una llama.



El número de átomos generados en su estado fundamental en la etapa de atomización determinará la cantidad de radiación absorbida.

El quemador del premezclado, consiste en la combinación de un nebulizador con un quemador. En este sistema continuo, la muestra es aspirada por arrastre con el gas comburente a través de un nebulizador para generar un aerosol fino dentro de una cámara donde se mezcla con los gases combustible y comburente auxiliar, en caso de haberlo. Un deflector de flujo, ubicado en la cámara de premezclado, permite que las gotitas más grandes impacten contra él, caigan al fondo de la cámara y se escurran por el tubo de drenaje. El aerosol compuesto por las gotitas más finas es transportado hacia el cabezal del quemador, donde ocurre la combustión y la atomización de la muestra. Una entrada de gas oxidante auxiliar directa a la cámara de premezclado permite que los ajustes del flujo del oxidante sean efectuados por medio de la línea auxiliar, mientras que el flujo a través del

nebulizador permanece constante. De esta forma la velocidad de aspiración de la muestra es independiente de las condiciones de la llama.

Los nebulizadores pueden ser regulados para variar la velocidad de aspiración de la muestra (1 – 4 mL/min.). Estos están hechos de un material resistente a la corrosión.

Diferentes tipos de cabezales son utilizados dependiendo del tipo de llama a emplear. Estos se construyen de titanio para darle una resistencia al calor y a la corrosión, siendo los más empleados de 10 cm de ranura simple (para llama aire/acetileno), 10 cm de ranura triple (para soluciones con alto contenido de sólidos) y cabezal de 5 cm (para llama óxido nitroso/acetileno).

El tiempo necesario para la atomización de una muestra dependerá de la velocidad de entrada de los gases en la llama y se expresa con altura de la llama, de modo que la medición de la absorbancia se debe realizar en una zona en que la atomización sea completa.

La llama debe ser en lo posible transparente, es decir, no debe absorber parte de la radiación proveniente de la lámpara. En general, la llama debe poseer una gran eficiencia en la producción de átomos libres y ésta debe evitar que ocurran reacciones del elemento a determinar con productos de la combustión de los gases empleados o con otros componentes de la muestra. Al respecto, la temperatura de la llama tiene un cierto grado de importancia, siendo a veces más valiosas las propiedades reductoras u oxidantes (según relación entre gases comburente/combustible) de ella. La razón óptima comburente/combustible dependerá del tipo de quemador, de los gases y del elemento a determinar.

La llama aire/acetileno es la más empleada, debido a que ofrece para muchos elementos un medio ambiente y temperatura suficientes para la atomización. La llama es completamente transparente y solamente muestra autoabsorción bajo los 230 nm.

La introducción de la llama óxido nitroso/acetileno (2900 – 3000 °C) permite la determinación de aquellos elementos que no se dejan determinar con llama aire/acetileno como Al, Si, Ti, etc. Como producto de su baja velocidad de combustión, esta llama energética ofrece un medio ambiente químico, térmico y óptimo favorable, pero posee dos desventajas: numerosos elementos son ionizados y muestran una emisión relativamente fuerte²⁰.

²⁰ Ibid., p. 230 – 232.

4.6.4.4 Interferencias

En EAA la concentración de un elemento en una muestra se determina por comparación de la absorbancia de la muestra con la absorbancia de soluciones estándar de concentración conocida. Si cualquier constituyente de la muestra altera uno o más pasos en el proceso de formación de átomos en su estado fundamental en la llama, llevará a un error en la medición de la concentración. Las interferencias que se pueden producir en EAA se clasifican en: físicas, químicas, de ionización y espectrales.

- **Interferencias físicas:** Están relacionadas con la efectividad con que la solución es transportada a la llama y son causadas por diferencias en las propiedades físicas de las soluciones como viscosidad, tensión superficial o presión de vapor.

Un ejemplo de estas interferencias se observa en la determinación de Mg y Cu en presencia de ácido fosfórico. A mayor concentración de H_3PO_4 la viscosidad de la solución aumenta, disminuyendo la velocidad de aspiración de ella y una fracción menor llega a la llama, produciéndose una absorbancia menor de la muestra.

También la presencia de solventes orgánicos produce este tipo de interferencias debido a un aumento en la eficiencia de la nebulización (menor viscosidad y menor tensión superficial), lo que produce un aumento de la absorbancia.

Una forma de compensar este tipo de interferencia es preparar las soluciones estándar con los mismos componentes de la matriz de la solución problema.

- **Interferencias químicas:** Es cualquier alteración en el número total de átomos libres formados por unidad de volumen debido a la formación de compuestos químicos termoestables. Las causas más comunes de éstas son:
 - a. **Disociación incompleta de la molécula formada o formación de una sal difícil de fundir:** El efecto del fosfato en la determinación de calcio es un ejemplo de este tipo de interferencia. El calcio con el fosfato forman el fosfato de calcio, el cual se transforma en pirofosfato de calcio, que es relativamente estable en una llama aire/acetileno. Así la cantidad de átomos libres de calcio generados en la llama será menor que la obtenida con una solución de calcio de igual concentración, pero sin presencia de fosfato, provocando una disminución de la señal.

Existen otros componentes refractarios que dan también una disminución de la señal de absorción del elemento de interés. Tal es el caso de silicatos, aluminatos y piro sulfatos de calcio, magnesio, estroncio y bario.

- b. Reacción espontánea de los átomos libres con otros átomos o radicales presentes en el medio ambiente:** Esta interferencia es causada por la formación de óxidos e hidróxidos u ocasionalmente carburos o nitratos, debido a la reacción de los átomos libres con los productos de la combustión de la llama. Aproximadamente unos 30 metales no se pueden determinar con llama aire/acetileno (ejemplo: aluminio, silicio, boro, elementos lantánidos, etc.). La magnitud de la interferencia va a depender del tipo de estequiometría de la llama.

Las interferencias químicas pueden ser minimizadas de las siguientes formas:

- Empleo de llamas con mayores temperaturas. Como ejemplo tenemos la llama óxido nitroso/acetileno, la que es capaz de descomponer totalmente los compuestos refractarios.
 - Agregar a la solución muestra un elemento "buffer", el cual forma con el elemento interferente un compuesto más estable que con el elemento a determinar. El ejemplo más conocido es la adición de lantano o estroncio en la determinación de calcio en presencia de fosfato.
 - Preparación de las soluciones estándar de modo tal que su composición sea lo más semejante con la de la solución problema. Esta alternativa es difícil de aplicar debido a que requiere un conocimiento completo de la muestra.
- **Interferencias de ionización:** Un átomo neutro en su estado fundamental puede ser ionizado a temperaturas elevadas. Estos iones exhiben propiedades espectroscópicas diferentes a un átomo neutro y no pueden ser determinados por EAA. Así, el número total de átomos disponibles para la absorción de la radiación por unidad de volumen disminuye, lo que produce una pérdida de sensibilidad. Esta interferencia depende tanto de la temperatura de la llama como del potencial de ionización del elemento en estudio.

La ionización puede ser detectada notando que la curva de calibración tiene una desviación positiva a concentraciones altas, dado que la fracción de átomos ionizados es menor a concentraciones mayores. Estas interferencias se pueden eliminar agregando a todas las soluciones estándar y a la muestra un exceso del elemento que sea fácilmente ionizable en la llama, por ejemplo: el sodio, potasio, litio o cesio, o mediante el empleo de una llama de menor temperatura.

- **Interferencias espectrales:** En este tipo de interferencias, la radiación del elemento a determinar es directamente influenciada, existiendo interferencias espectrales de línea e interferencias espectrales de banda.

Las **interferencias espectrales de línea** ocurren cuando hay superposición de dos líneas atómicas o cuando éstas no son resueltas por el monocromador. Un ejemplo se tiene en la determinación de trazas de zinc en una matriz de hierro, debido a que la línea de absorción del hierro (213,86 nm) se superpone a la línea de resonancia del zinc (213,86 nm).

El empleo de lámparas multielemento fabricadas con una combinación inadecuada de elementos puede producir interferencias del segundo tipo, si dentro de la banda espectral del monocromador se encuentra una línea de resonancia de otro elemento junto a la del elemento a determinar.

En general, este tipo de interferencias no son frecuentes debido a la naturaleza muy específica de la longitud de onda que se usa en EAA. Si se llegan a presentar, se pueden eliminar seleccionando una segunda línea de resonancia del elemento de interés (probablemente se obtenga mayor sensibilidad).

Las **interferencias espectrales de banda** se producen debido a la absorción de la radiación por moléculas o radicales, y por dispersión de la radiación por sólidos. Para ambos efectos, que en principio son distintos, se emplea el término Absorción de Fondo. Aquí existe una pérdida de radiación no específica que lleva a absorbancias mayores que la absorbancia obtenida por el analito. La señal está compuesta por la absorción del elemento a determinar más la absorción no específica.

La **absorción molecular** ocurre cuando una especie molecular en el atomizador posee un perfil de absorción que se superpone al del elemento de interés. El espectro molecular del hidróxido de calcio muestra un máximo de absorción en la línea de resonancia del bario. Este problema es más serio en la región espectral bajo los 250 nm, donde concentraciones altas de metales alcalinos y de otras sales muestran una alta absorción molecular.

La **dispersión de la luz** ocurre cuando partículas de sólidos causan una deflexión de parte de la radiación de la fuente fuera del eje del sistema monocromador-detector. Estos problemas son relevantes con muestras conteniendo altas concentraciones de elementos refractarios.

Los métodos más empleados en la corrección de la Absorción de Fondo (Background) son:

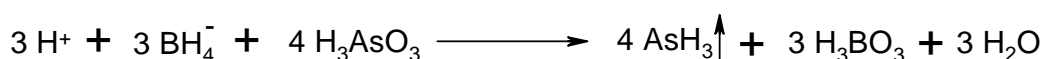
- a. **Método de corrección de doble línea:** En este método se realiza la medición de una línea de emisión no absorbida por el analito, cuyo valor se resta al valor de la medición obtenida a la longitud de onda de resonancia del analito. El método tiene la desventaja que a veces no es fácil disponer de una línea de no resonancia cercana a la línea de resonancia del analito.

b. Método de corrección continua de fondo: La forma más eficaz para medir la Absorción de Fondo es realizar la medición empleando una lámpara de deuterio o de hidrógeno que emite un espectro continuo bajo los 320 nm. En estos instrumentos ambas fuentes radiantes (lámpara de cátodo hueco y de deuterio) son moduladas a la misma frecuencia, pero desfasadas, recorriendo el mismo camino óptico a través de la muestra en el monocromador para llegar al detector. Este observa alternadamente en el tiempo las dos fuentes radiantes. La absorción de fondo disminuye la intensidad de ambas fuentes. La electrónica del instrumento separa ambas señales y compara la absorción de ambas fuentes entregando una señal corregida con respecto a la absorción de fondo²¹.

4.6.5 Generación de Hidruros²²

Las técnicas de generación de hidruros proporcionan un método para introducir muestras que contienen arsénico, antimonio, estaño, selenio, bismuto y plomo en un atomizador en forma de gas. Dicho procedimiento mejora los límites de detección de estos elementos de 10 a 100 veces. Debido a que varias de estas especies son altamente tóxicas, es de considerable importancia su determinación a concentraciones bajas. Su toxicidad obliga también, a que los gases producidos en la atomización deban eliminarse de una manera segura y eficaz.

Generalmente se pueden generar rápidamente hidruros volátiles adicionando una disolución acuosa acidificada de la muestra a un volumen pequeño de una disolución acuosa al 1 % de borohidruro de sodio en un frasco de vidrio; una reacción característica se puede representar por la expresión:



El hidruro volátil –en este caso, arsina– es arrastrado a la cámara de atomización por un gas inerte. La cámara generalmente es un tubo de sílice calentado a varios cientos de grados centígrados en un horno o en una llama, donde se descompone el hidruro originándose los átomos del analito. La concentración del mismo se determina por la medida de la absorción o de la emisión. La señal es un pico semejante al obtenido con la atomización electrotérmica.

²¹ SKOOG, Op. cit., p. 230 – 237.

²² Ibid., p. 215.

4.6.6 Análisis Cuantitativo

Cuando la absorbancia de soluciones estándar de concentración conocida del elemento a determinar se grafica versus la concentración, se obtiene una curva de calibración. La curva así obtenida es generalmente lineal a bajas concentraciones y la concentración de la muestra puede ser determinada por interpolación de su absorbancia en la curva de calibración.

Para emplear este método de análisis cuantitativo, la composición de las soluciones estándar deben ser preparadas lo más semejante posible a la composición de la muestra para compensar o eliminar interferencias.

Especialmente útil resulta el empleo del método de adición estándar, el cual permite trabajar en presencia de una interferencia sin eliminarla y obtener una determinación con buena exactitud del elemento en la muestra. Interferencias físicas y algunas interferencias químicas pueden ser compensadas empleando este método que consiste en la adición de cantidades diferentes de una solución estándar del elemento a determinar a varias porciones iguales de la muestra. De esta forma, la interferencia afectará por igual a todas las soluciones. Si existe interferencia, se observará que la pendiente de la adición estándar es menor que la de la curva de calibración²³.

²³ Ibid., p. 239.

5 METODOLOGÍA

5.1 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN²⁴

- Exactitud expresada como porcentaje de error (E%) menor o igual al 10 %.
- Precisión expresada como porcentaje de coeficiente de variación (CV%) menor al 10 %.

5.2 ESTANDARIZACIÓN

La cual incluye las actividades propuestas en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividades propuestas para la estandarización.

Actividad	¿Cómo?
Determinación del efecto de la digestión en los patrones	Construir dos curvas de calibración: en la primera los patrones no deben tener digestión ácida y en la segunda si. Para ambas curvas los patrones deben tener concentraciones equivalentes. Se comparan las absorbancias y se determina el efecto de la digestión en los patrones.
Determinación del efecto de los aditivos en los patrones	Construir dos curvas de calibración: en la primera los patrones no deben contener aditivos y en la segunda si. Para ambas curvas los patrones deben tener concentraciones equivalentes. Se comparan las absorbancias y se determina el efecto de dicho aditivo en los patrones.
Establecimiento del rango de linealidad	Correr patrones con el analito en cuestión, cuyas concentraciones cubran el rango de cuantificación sugerido por el Standard Methods y un poco más. Ajustar por Mínimos Cuadrados la tendencia de la absorbancia (respuesta del equipo) en función de la concentración, escogiendo el rango de concentraciones que produzca el ajuste más apropiado.

5.3 VALIDACIÓN

Los parámetros de calidad a evaluar se presentan en la tabla 3.

²⁴ Estos parámetros son generales para los diferentes análisis. Pueden variar según sea el caso.

Tabla 3. Parámetros de calidad a evaluar para cada método.

Parámetro	¿Cómo?
Límites de Detección y Cuantificación	<p>Medir 6 réplicas de un patrón de concentración teórica baja (estándar bajo, E. b). Calcular al lote de datos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Promedio aritmético (X_m) - Desviación estándar (s) - Límite de detección del método ($LDM = 3*s$) - Límite de cuantificación ($LC = 10*s$) <p>Realizar esta actividad 4 veces en días diferentes con patrones preparados para cada ensayo.</p>
Exactitud, expresada como porcentaje de error, E%	<p>Medir 6 réplicas de cada patrón a tres concentraciones teóricas diferentes:</p> <p>E. b: Estándar bajo E. m: Estándar medio E. a: Estándar alto</p> <p>Calcular a cada lote de datos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - X_m - s - E% <p>Realizar esta actividad 4 veces en días diferentes con patrones preparados para cada ensayo.</p>
Precisión, expresada como porcentaje de coeficiente de variación, CV%	<p>Relacionada con la repetibilidad.</p> <p>a. Repetibilidad: Medir 6 réplicas de cada patrón E. b, E. m y E. a. Calcular a cada lote de datos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - X_m - s - CV% <p>Realizar esta actividad 4 veces en días diferentes con patrones preparados para cada ensayo.</p> <p>b. Repetibilidad intermedia: Medir 6 réplicas del E. m dos veces el mismo día (en la mañana y en la tarde). Calcular a cada lote de datos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - X_m - s - CV% <p>Realizar esta actividad sólo una vez durante la validación.</p>
Prueba R & R (Repetibilidad y	Ejecutado por un analista diferente. Medir 6 réplicas del E. m. Calcular al lote de datos:

Parámetro	¿Cómo?
Reproducibilidad)	<ul style="list-style-type: none"> - X_m - s - CV% - E% <p>Realizar esta actividad sólo una vez durante la validación.</p>
Sensibilidad de calibración del método	<p>Reunir cada una de las pendientes de las curvas de calibración elaboradas durante el proceso de validación. Calcular al lote de datos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - X_m - s - CV%
Recuperación	<p><u>Analizar una muestra real (M1) con y sin adiciones.</u> Hacer adiciones de aproximadamente el 20% (adición baja, M1 A. b) y 40 % (adición alta, M1 A. a) respecto al contenido de analito en M1. Hacer 6 réplicas de cada uno. Calcular a cada lote de datos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - X_m - s - CV% - Porcentaje de recuperación (% R) <p>Realizar esta actividad 4 veces en días diferentes con patrones preparados para cada ensayo.</p>

5.4 EQUIPOS, REACTIVOS Y VIDRIERÍA

5.4.1 Equipos

- Termóstato Julabo F34
- Balanza Analítica Sartorius BP221S
- Plancha de Calentamiento
- Espectrómetro de Absorción Atómica SOLAAR 969 ThermoElemental
- Generador de Hidruros UNICAM VP 90
- Sistema de Extracción de Gases
- Compresor de Aire

5.4.2 Reactivos

Reactivos grado analítico o superior.

- Patrón de 1000 mg As/L CertiPur® Merck
- Patrón de 1000 mg Hg/L CertiPur® Merck
- Patrón de 1000 mg Na/L CertiPur® Merck
- Patrón de 1000 mg Cr/L CertiPur® Merck
- Ácido Clorhídrico concentrado
- Ácido Nítrico concentrado
- Yoduro de Potasio
- Ácido L-Ascórbico
- Borohidruro de Sodio
- Hidróxido de Sodio
- Agua Destilada (conductividad máxima: 1,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$)
- Argón
- Acetileno

5.4.3 Vidriería

Material volumétrico clase A.

- Matraces aforados de 50, 100, 200 y 1000 mL
- Pipetas volumétricas de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20 y 50 mL
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL
- Beakers de 50, 100, 250 y 1000 mL
- Probetas de 200 mL
- Erlenmeyers de 125 mL
- Embudos pequeños
- Varillas de vidrio

5.5 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Las soluciones en las que no se indica el solvente, por defecto, es agua destilada.

- a. **Solución de HCl al 0,25 %:** Medir 5,5 mL de HCl concentrado y depositarlos en un matraz aforado de 1000 mL el cual contiene aproximadamente 800 mL de agua destilada; luego, ajustar el aforo.
- b. **Solución de HNO₃ al 0,5 %:** Medir 5,5 mL de HNO₃ concentrado y depositarlos en un matraz aforado de 1000 mL el cual contiene aproximadamente 800 mL de agua destilada; luego, ajustar el aforo.
- c. **Solución prerreductora de KI / Ácido L-Ascórbico (10 % / 5 %):** Pesar 10 g de KI y 5 g de Ácido L-Ascórbico en un beaker de 250 mL, luego, diluir en 100 mL de agua destilada. Esta solución debe estar recién preparada al momento de usar, por lo que es recomendable preparar sólo la necesaria.

- d. Solución de HCl al 5 %:** Medir 110,6 mL de HCl concentrado y depositarlos en un beaker de 1000 mL que contiene aproximadamente 500 mL de agua destilada. Dejar enfriar. Luego, transferir a un matraz aforado de 1000 mL y ajustar el aforo.
- e. Solución de NaOH al 0,1 %:** Pesar 1,0 g de NaOH en un beaker de 100 mL, adicionar 50 mL de agua destilada y agitar con varilla de vidrio hasta disolver el NaOH. Transferir a un matraz aforado de 1000 mL y ajustar el aforo.
- f. Solución de NaBH₄ al 1 %:** Pesar 1,0 g de NaBH₄ en un beaker de 250 mL y diluirlos en 100 mL de NaOH al 0,1 %. Filtrar la solución con papel cualitativo. Esta solución debe estar recién preparada al momento de usar, por lo que es recomendable preparar sólo la necesaria.

5.6 DIGESTIÓN DE PATRONES Y MUESTRAS

Tomar 50 mL de la solución, a 20 °C, y depositarlos en un erlenmeyer de 125 mL, agregar 4 perlas de ebullición y 2,5 mL de HNO₃ concentrado. Llevar a plancha de calentamiento y dejar hervir hasta perder 2/3 del volumen inicial, es decir hasta que quede en el erlenmeyer un remanente de 20 mL aproximadamente. Dejar enfriar. Transferir cuantitativamente el remanente del erlenmeyer a un balón de 50 mL, filtrando si es necesario con papel cualitativo. Aforar a 20 °C.

Blanco. Aplicar el mismo procedimiento anterior a 50 mL de agua destilada.

5.7 CONSIDERACIONES PARA ESTIMAR LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN

Las siguientes consideraciones se tienen en cuenta para estimar la incertidumbre de la medición en el LQA:

- Temperatura de trabajo: 20 °C (con ayuda del termóstato).
- Agua destilada libre del metal a determinar.
- Reactivos grado analítico, a excepción de los patrones de 1000 mg/L que tienen trazabilidad a NIST.
- Espectrómetro de Absorción Atómica calibrado (ver en archivo LQA: Certificado de Calibración no. 067).
- Correcta puesta en funcionamiento del equipo según SOP 2-38 e IT 38.
- Volúmenes aditivos.
- La longitud de onda es la misma para un análisis determinado. Se considerará que la incertidumbre introducida por esta es despreciable.

5.8 LIMPIEZA EN LA ANALÍTICA DE TRAZAS

Es aplicable para el análisis de todos los metales, en especial, para aquellos que son abundantes en el agua del grifo o cuyo rango de trabajo en EAA por Llama sea de magnitud muy pequeña. Lo anterior se refiere a metales tales como Ca, Mg, Na, Ni, K y Zn.

Para digerir 50 mL de muestra por duplicado, primero se debe realizar la limpieza del material de vidrio, así:

Se toman los erlenmeyers de 125 mL que han sido lavados con abundante agua del grifo y se deposita en cada uno 50 mL de agua destilada y 2,5 mL de HNO₃ concentrado. Se agregan 4 perlas de ebullición. Se colocan sobre plancha de calentamiento para evaporar 2/3 del volumen (hasta llegar a 15 - 20 mL). Luego, se elimina el líquido remanente y se enjuaga con agua destilada, siempre teniendo en cuenta de no desechar las perlas de ebullición que también fueron lavadas. Si el metal a analizar es Ca, Mg, Na, Ni, K y Zn, se repite nuevamente todo el procedimiento anterior con el agua de mayor calidad disponible en el laboratorio.

Si al inicio del análisis encontramos que la llama es amarilla o presenta destellos amarillos, se recomienda lavar al quemador con abundante agua del grifo y luego cuidadosamente con agua de alta calidad. Enjuagar la base del quemador con ayuda del frasco lavador. Debe siempre asegurarse de que la conductividad del agua sea la menor posible, de lo contrario se obtendrán menores absorbancias aunque la sensibilidad no se altere.

Para el análisis de metales alcalinos y alcalinotérreos, verificar que el BK no presente una absorbancia mayor a 0,050.

6 RESULTADOS

6.1 DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO POR GENERACIÓN DE HIDRUROS/ ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA. 3114 C.

6.1.1 Alcance

Este método es apropiado para determinar el contenido de arsénico en aguas naturales (superficiales y subterráneas) y residuales domésticas e industriales por Generación de Hidruros / Espectrometría de Absorción Atómica.

6.1.2 Principio

Este método es aplicable a la determinación de arsénico por conversión a su hidruro por medio del borohidruro de sodio, y transportado hasta el atomizador del EAA.

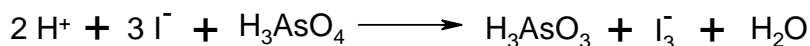
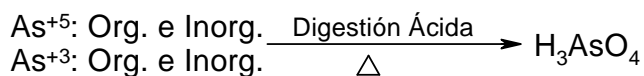
El ácido arsenioso (H_3AsO_3) y los compuestos con As^{+3} son instantáneamente convertidos por el borohidruro de sodio en solución ácida a su hidruro, la arsina (AsH_3). Esta es llevada por el argón hasta una celda de cuarzo donde es calentada por una llama aire/acetileno de un EAA y convertida en una fase gaseosa de átomos.



A temperatura ambiente y $\text{pH} \leq 1$, el ácido arsénico (H_3AsO_4) y los compuestos de As^{+5} , son reducidos relativamente lento por el borohidruro a As^{+3} el cual es instantáneamente convertido a arsina. Como resultado, los picos de absorción atómica de la arsina pueden decrecer hasta una tercera parte en comparación con el arsénico en estado +3.

La determinación de arsénico total requiere que todo el arsénico inorgánico se encuentre en estado +3. Todas las formas de arsénico orgánico son primero oxidadas por digestión ácida a As^{+5} . Este luego es cuantitativamente reducido a As^{+3} con yoduro de potasio o sodio antes de reaccionar con borohidruro de sodio²⁵.

²⁵ STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER & WASTEWATER. 21st Edition. USA: APHA, AWWA, WEF, 2005. p. 3-36. ISBN 0-87553-047-8.



6.1.3 Precauciones de Seguridad

Usar guantes de nitrilo durante toda la determinación de arsénico. Este es cancerígeno, irritante y peligroso para el medio ambiente. El ácido arsénico (H_3AsO_4) es la forma más tóxica del arsénico.

Tabla 4. Precauciones de seguridad en la determinación de arsénico.

Acción	Posibles Accidentes	Medidas a Tomar
Trabajo con ácidos concentrados	Salpicaduras en piel y ojos Derrames	Usar guantes especiales para manipulación de ácidos, careta facial y trabajar bajo cabina de extracción de gases.
Digestión de muestras	Sofocación por gases ácidos	Trabajar bajo cabina de extracción de gases.
Trabajo en el espectrómetro	Intoxicación por gases generados en la llama Radiación UV proveniente de la llama dañina para la piel, y en especial, los ojos.	Mantener durante todo el análisis, el sistema de extracción de gases encendido. Usar gafas con filtro UV

6.1.4 Preparación de Soluciones de Trabajo

- a. **Solución madre de 10 mg As/L:** Medir cuantitativamente 2 mL de la solución de 1000 mg As/L a 20 °C y diluirlos, en matraz aforado, a 200 mL con HCl al 0,25 % y a 20 °C.

$$1 \text{ mL} = 10 \mu\text{g As}$$

- b. **Solución intermedia de 100 μg As/L:** Medir cuantitativamente 2 mL de la solución madre a 20 °C y diluirlos, en matraz aforado, a 200 mL con HNO_3 al 0,5 % y a 20 °C.

$$1 \text{ mL} = 0,1 \mu\text{g As} = 100 \text{ ng As}$$

- c. **Soluciones de trabajo:** Cada solución empleada se prepara como el siguiente ejemplo: preparación de un patrón de 2 μg As/L, medir

cuantitativamente 2 mL de la solución intermedia a 20 °C y diluirlos, en balón aforado, hasta 100 mL con HNO₃ al 0,5 %. Aforar a 20 °C.

6.1.5 Experimentos de Estandarización

6.1.5.1 Efecto de la digestión en los patrones

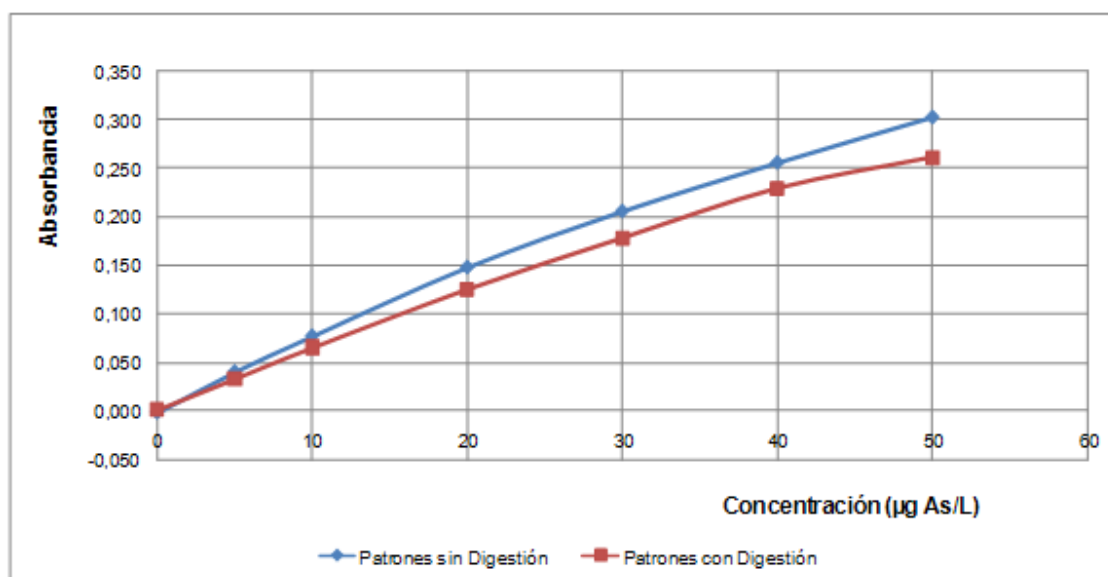
El patrón de 1000 mg As/L CertiPur® de Merck es una solución patrón trazable a SRM de NIST y preparado a partir del H₃AsO₄ (ácido arsénico, As⁺⁵) en HNO₃ 0,5 M.

Se siguió el procedimiento de digestión del numeral 5.6.

Tabla 5. Efecto de la digestión en los patrones de arsénico.

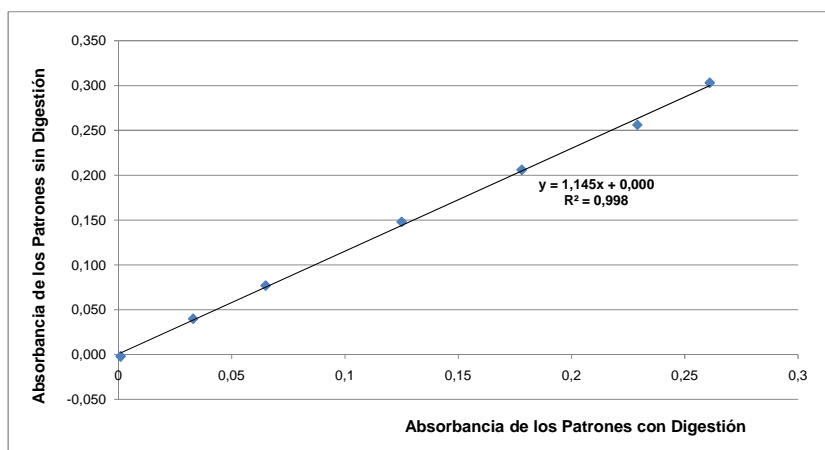
C (µg As/L)	Absorbancias	
	Patrones sin Digestión	Patrones con Digestión
0	-0,002	0,001
5	0,040	0,033
10	0,077	0,065
20	0,148	0,125
30	0,206	0,178
40	0,256	0,229
50	0,303	0,261

Figura 3. Efecto de la digestión en los patrones de arsénico.



A cada concentración le corresponde dos absorbancias: sin digestión y con digestión. Estas se pueden relacionar como en la figura 4 que ilustra con mayor claridad el efecto que se está evaluando.

Figura 4. Comparación de absorbancias entre los patrones de arsénico con y sin digestión.



Según la ecuación de la recta de la figura 4, las absorbancias de los patrones sin digestión son 1,145 veces mayores a las que tienen digestión, es decir, 14,5 % mayor, pero puede deberse en parte a la preparación, pérdidas en la digestión y a variaciones en el Generador, porque los patrones están preparados como As+5 y después de la digestión continúan igual. De esto se concluye que para los patrones no es necesaria la digestión.

6.1.5.2 Efecto de la reducción con yoduro en los patrones

El principio del método (6.1.2) dice que es necesario que el arsénico se encuentre en estado de oxidación +3 para que instantáneamente sea convertido en arsina, y que el arsénico +5 no es tan eficiente en dicha conversión. Pero el Standard Methods²⁶ también señala que: “el yoduro de sodio²⁷ se ha encontrado innecesario en los diseños de celdas de reacción si una pérdida de sensibilidad instrumental de 20 a 30 % no es importante y las variables de condiciones ácidas, temperaturas

²⁶ Ibid., p. 3-34.

²⁷ El yoduro de sodio puede ser reemplazado por su equivalente en yoduro de potasio.

y volúmenes por producción de As(V) y arsina pueden ser controladas estrictamente. Tal control requiere de un sistema automático.”

El Generador de Hidruros UNICAM VP 90 es automático y puede generar hidruros continuamente, por lo cual y según el Standard Methods, no es necesario que el arsénico se encuentre como As+3 para poder hacer determinaciones, sin embargo es necesario evaluar el efecto de la reducción y poder tomar la mejor decisión en pro de los requerimientos del LQA.

- **Procedimiento de reducción**

Aplica para patrones y muestras. Tomar 50 mL del patrón, a 20 °C, adicionarle 5 mL de HCl concentrado y 5 mL de solución prerreductora (ver numeral 5.5 c). Agitar muy bien. Dejar en reposo por lo menos 6 horas, a partir de las cuales el patrón está listo para medirle la absorbancia. (Se puede reducir un volumen menor siempre que se conserven las proporciones de los reactivos adicionados).

Blanco. Aplicar el procedimiento anterior a 50 mL de agua destilada (o una cantidad menor cuidando las proporciones).

Tabla 6. Efecto de la reducción con yoduro en los patrones de arsénico.

C (µg As/L)	Absorbancias	
	Patrones sin Reducción	Patrones con Reducción
0	-0,002	-0,004
5	0,040	0,092
10	0,077	0,168
15	0,118	0,226
20	0,148	0,283
25	0,182	0,331
30	0,206	0,374
40	0,256	0,440
50	0,303	0,493

Cabe aclarar que se prescindió de la digestión de los patrones pero que dicha digestión se aplica a las muestras poluídas para eliminar la materia orgánica.

Es evidente la diferencia de absorbancias desde el patrón de 5 µg As/L hasta el último (figura 5). Una comparación de las absorbancias en la figura 6, muestran que hay un incremento de aproximadamente el 61,7 % en las absorbancias de los patrones con reducción respecto a los que no lo tienen, por lo tanto, se opta por reducir con yoduro los patrones y las muestras.

Figura 5. Efecto de la reducción con yoduro de los patrones de arsénico.

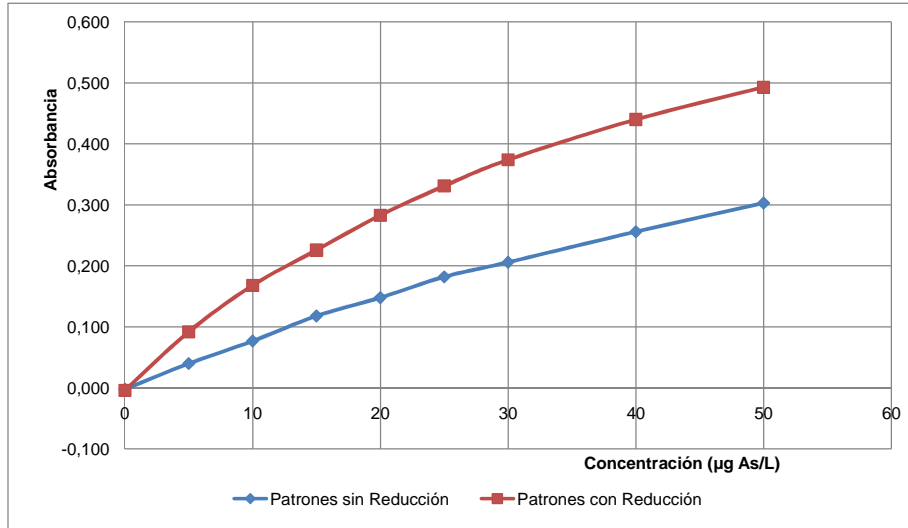
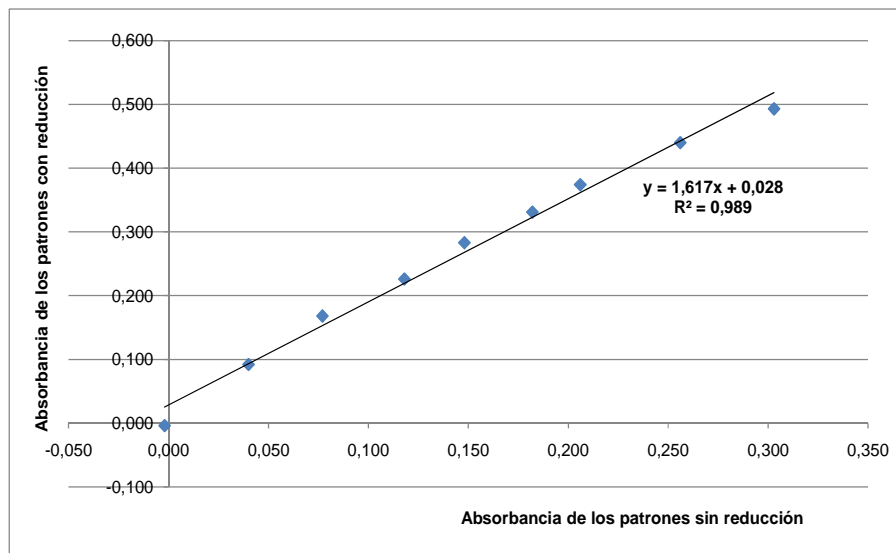


Figura 6. Comparación de absorbancias entre los patrones de arsénico con y sin reducción.



6.1.5.3 Establecimiento del rango de linealidad

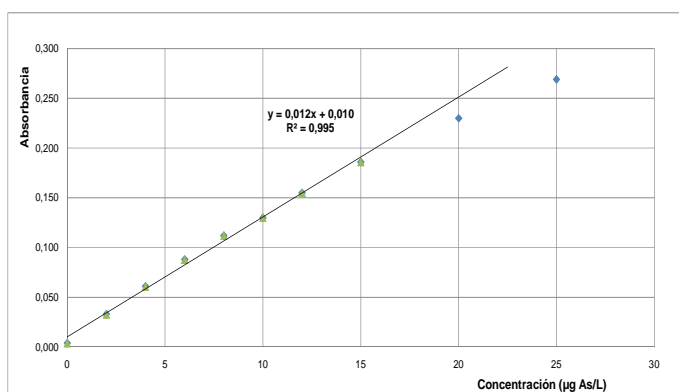
El Standard Methods establece que para el arsénico, analizado por aspiración hasta una llama nitrógeno/hidrógeno después de la reducción, el límite de detección del método es 2 µg As/L o mucho menor, y el rango de concentración óptimo va desde 2 hasta 20 µg As/L²⁸.

Los patrones no tienen digestión pero llevan reducción con yoduro.

Tabla 7. Curva 1 para establecer rango de linealidad en el análisis de arsénico.

Patrón (µg As/L)	Absorbancia
0	0,004
2	0,033
4	0,061
6	0,088
8	0,112
10	0,130
12	0,155
15	0,186
20	0,230
25	0,269

Figura 7. Curva 1 para establecer rango de linealidad en el análisis de arsénico.



Un ajuste (R^2) aceptable para este método es 0,995. Descartando los patrones de 20 y 25 $\mu\text{g As/L}$ se obtiene la ecuación $y = 0,012x + 0,010$ con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,995. Se hace el Test de Residuales con esta ecuación y se aplica a todos los patrones.

Tabla 8. Test de residuales para linealidad en el análisis de arsénico. Curva 1.

Punto	Concentración ($\mu\text{g As/L}$)	Absorbancia Experimental	Absorbancia Calculada	Diferencia
1	0	0,004	0,010	0,006
2	2	0,033	0,034	0,001
3	4	0,061	0,058	-0,003
4	6	0,088	0,082	-0,006
5	8	0,112	0,106	-0,006
6	10	0,130	0,130	0,000
7	12	0,155	0,154	-0,001
8	15	0,186	0,190	0,004
9	20	0,230	0,250	0,020
10	25	0,269	0,310	0,041

No resulta necesario graficar las diferencias para apreciar que los puntos correspondientes a los patrones de 20 y 25 $\mu\text{g As/L}$ no hacen parte de la misma población estadística.

Tabla 9. Curva 2 para establecer rango de linealidad en el análisis de arsénico.

Patrón ($\mu\text{g As/L}$)	Absorbancia
0	0,001
2	0,037
4	0,067
6	0,094
8	0,116
10	0,148
12	0,169
14	0,195
16	0,212
18	0,233
20	0,253

Para obtener un ajuste (R^2) mayor o igual a 0,995 es necesario descartar los patrones de 16, 18 y 20 $\mu\text{g As/L}$ (figura 8), obteniéndose la ecuación $y = 0,013x + 0,008$ con un R^2 de 0,996. Se hace el Test de Residuales (tabla 10).

Figura 8. Curva 2 para establecer rango de linealidad en el análisis de arsénico.

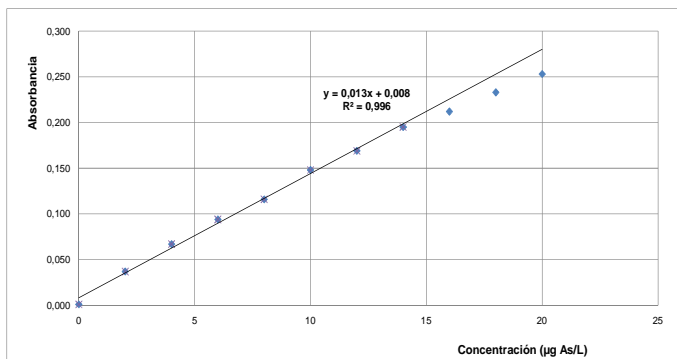


Tabla 10. Test de residuales para linealidad en el análisis de arsénico. Curva 2.

Punto	Concentración ($\mu\text{g As/L}$)	Absorbancia Experimental	Absorbancia Calculada	Diferencia
1	0	0,001	0,008	0,007
2	2	0,037	0,034	-0,003
3	4	0,067	0,060	-0,007
4	6	0,094	0,086	-0,008
5	8	0,116	0,112	-0,004
6	10	0,148	0,138	-0,010
7	12	0,169	0,164	-0,005
8	14	0,195	0,190	-0,005
9	16	0,212	0,216	0,004
10	18	0,233	0,242	0,009
11	20	0,253	0,268	0,015

En la figura 9 se observa que los puntos más alejados de la población son el 1, 9, 10 y 11. Los tres últimos corresponden a los patrones de 16, 18 y 20 $\mu\text{g As/L}$ respectivamente, los cuales fueron excluidos para mejorar el ajuste de la curva de calibración (figura 8). Pero el punto 1 es el BK que el software del Espectrómetro no permite descartar cuando elabora la curva de calibración.

Figura 9. Residuales para linealidad en el análisis de arsénico. Curva 2.

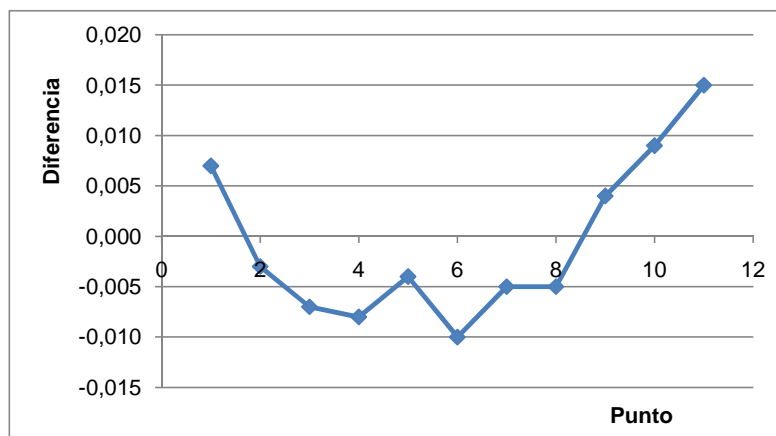


Tabla 11. Curva 3 para establecer rango de linealidad en el análisis de arsénico.

Patrón ($\mu\text{g As/L}$)	Absorbancia
0	0,002
2	0,037
4	0,065
6	0,089
8	0,117
10	0,133
12	0,167
14	0,193
15	0,206

En la figura 10 se elabora la curva de calibración con los datos de la tabla 11 obteniéndose la ecuación $y = 0,013x + 0,007$ con un R^2 de 0,996. Se realiza el Test de Residuales en la tabla 12.

Tabla 12. Test de residuales para linealidad en el análisis de arsénico. Curva 3.

Punto	Concentración ($\mu\text{g As/L}$)	Absorbancia Experimental	Absorbancia Calculada	Diferencia
1	0	0,002	0,007	0,005
2	2	0,037	0,033	-0,004
3	4	0,065	0,059	-0,006
4	6	0,089	0,085	-0,004
5	8	0,117	0,111	-0,006
6	10	0,133	0,137	0,004
7	12	0,167	0,163	-0,004
8	14	0,193	0,189	-0,004
9	15	0,206	0,202	-0,004

Figura 10. Curva 3 para establecer rango de linealidad en el análisis de arsénico.

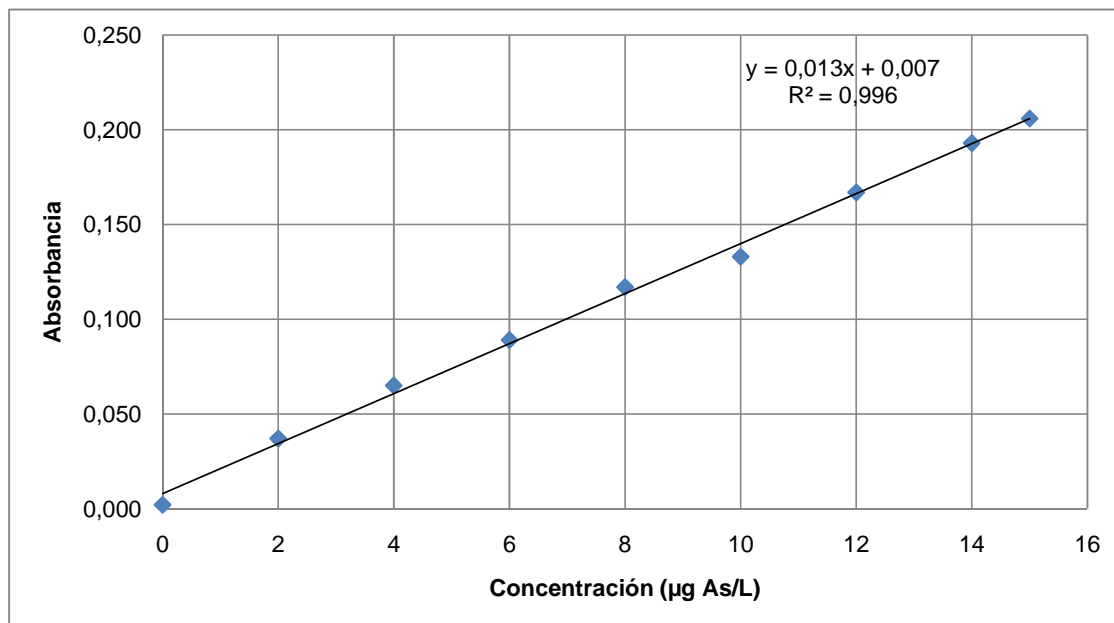
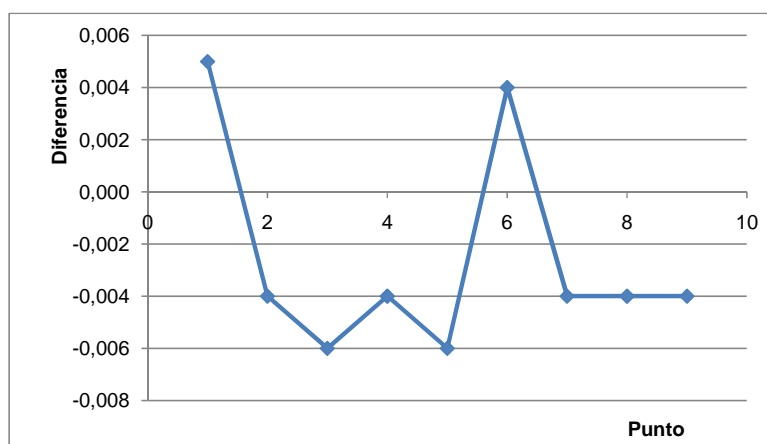


Figura11. Residuales para linealidad en el análisis de arsénico. Curva 3.



En la figura 11 se observa que los puntos 1 y 6 correspondientes al BK y al patrón de $10 \mu\text{g As/L}$ respectivamente, son los más alejados de la población. El BK vuelve a mostrar esta tendencia. Para corregirlo es necesario extender el tiempo de estabilización de la celda de reacción en el Generador de tal forma que las absorbancias de los patrones y muestras no varíen desde el momento de iniciar el análisis. Es muy probable que el patrón de $10 \mu\text{g As/L}$ este por debajo de la curva debido a un error en la preparación del mismo.

Teniendo en cuenta la información hasta aquí recopilada se concluye que el rango lineal se extiende hasta 15 µg As/L. Con esta información se definen los estándares que se van a usar en la validación.

Estándar bajo (E. b) de 3 µg As/L
 Estándar medio (E. m) de 10 µg As/L
 Estándar alto (E. a) de 14 µg As/L

6.1.6 Experimentos de Validación

Laboratorio: Laboratorio de Química Ambiental (LQA)

Equipo: Espectrómetro de Absorción Atómica SOLAAR 969 ThermoElemental con Generador de Hidruros Unicam VP 90

Analista: Andrés Mauricio Camacho Orrego

6.1.6.1 Límites de detección y cuantificación

El anexo A muestra los resultados de las pruebas estadísticas que el programa ProControl® realizó al lote de datos del E. b con un 95 % de confianza ($\alpha = 0,05$), del cual interesa por el momento la Prueba F para comparar varianzas.

La tabla 13 muestra los datos numéricos para los límites de detección (LD) y cuantificación (LC).

Tabla 13. Datos obtenidos para el E. b en la validación del ensayo de arsénico.

Réplica	E. b			
	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 3	Ens. 4
	Concentración Teórica: 3 µg As/L			
1	3,0171	3,0121	3,2199	3,1889
2	3,1082	3,0690	3,0856	3,1654
3	3,2389	3,1438	3,2865	3,3554
4	3,0405	3,2875	3,1278	3,2862
5	3,2704	3,6355	3,2712	3,2142
6	3,1137	3,1594	3,2777	3,3498
X_m	3,13	3,22	3,21	3,26
s	0,10	0,22	0,09	0,08
CV%	3,29	6,99	2,66	2,53
E%	4,38	7,26	7,05	8,67
LD	0,31	0,67	0,26	0,25
LC	1,03	2,25	0,85	0,82

Al efectuar la prueba F, se pudo establecer que los ensayos 1, 3 y 4 son homogéneos entre sí, lo que significa que no hay diferencias significativas en las

distribuciones de cada uno de ellos, por lo tanto, pertenecen a la misma población, lo que permite que los valores de LD y LC se puedan promediar. Por otro lado, el ensayo 2 no es homogéneo con los ensayos 3 y 4 y por esta razón se puede descartar ya que presenta diferencias significativas con ellos, no importa que sea homogéneo con el ensayo 1.

El límite de detección LD promedio es 0,27 µg As/L.

El límite de cuantificación LC promedio es 0,90 µg As/L.

Con el fin de confirmar experimentalmente que el límite de cuantificación establecido a partir de cálculos matemáticos cumpliera con los requisitos de aceptación determinados en el laboratorio se efectuó un ensayo usando una concentración de 1 µg As/L.

Tabla 14. Ensayo adicional para confirmar el LD y el LC.

Réplica	C _{teórica} : 1 µg As/L
1	0,9536
2	0,9734
3	1,0274
4	1,1532
5	0,9592
6	1,0741
X _m	1,02
s	0,08
CV%	7,68
E%	2,35
LD	0,24
LC	0,79

Conclusión: LD = 0,27 µg As/L
LC = 0,90 µg As/L

6.1.6.2 Exactitud (expresada como E%)

NOTA: Aunque los errores poseen signo que indica si el promedio está sobre (signo positivo) o por debajo (signo negativo) del valor convencional, para efectos de análisis se tomará su valor absoluto.

El análisis estadístico para el E. b respecto a la prueba t de comparación de medias (anexo A) muestra que no hay diferencias significativas entre los ensayos, a excepción del 1 y el 4; aun así el E% máximo es 8,67 % que corresponde al ensayo 4 en la tabla 13.

En el anexo B, la prueba t para el E_m muestra que todos los ensayos son estadísticamente iguales, no hay diferencias significativas en un 95 % de confianza. Por lo tanto, el E% máximo es 3,60 % (ver tabla 15).

Tabla 15. Datos obtenidos para el E_m en la validación del ensayo de arsénico.

Réplica	E. m				
	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 3	Ens. 4	Ens. 5
	Concentración Teórica: 10 $\mu\text{g As/L}$				
1	9,0332	10,7159	10,1342	10,4542	10,3485
2	10,6195	10,0305	10,0250	10,1899	10,2478
3	10,7485	9,9872	9,8608	10,1156	10,2392
4	10,5915	9,9599	10,0107	9,9516	10,2820
5	10,8133	10,3784	10,1795	9,7814	10,3661
6	10,3551	10,1467	10,1852	9,8403	9,8598
X_m	10,4	10,2	10,1	10,1	10,2
s	0,67	0,29	0,13	0,25	0,19
CV%	6,46	2,88	1,25	2,49	1,82
E%	3,60	2,03	0,66	0,56	2,24

Para el E_a , la prueba t (ver anexo C) muestra que sólo en los ensayos 3 y 4 no hay diferencias significativas, las demás son desiguales. Aun así, el E% máximo es 6,42 % (ver tabla 16).

Tabla 16. Datos obtenidos para el E_a en la validación del ensayo de arsénico.

Réplica	E. a			
	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 3	Ens. 4
	Concentración Teórica: 14 $\mu\text{g As/L}$			
1	13,8138	13,6853	14,2636	14,0875
2	12,9101	13,5632	14,3909	14,1496
3	12,9801	13,6991	14,4250	14,2834
4	12,9634	13,6971	14,4023	14,3263
5	12,9452	13,6075	14,4790	14,2795
6	12,9938	13,5838	14,5873	14,5817
X_m	13,1	13,6	14,4	14,3
s	0,35	0,06	0,11	0,17
CV%	2,67	0,45	0,74	1,20
E%	-6,42	-2,58	3,03	2,03

6.1.6.3 Precisión

a. Repetibilidad: Se evalúa a partir de la prueba F (ver anexo C).

Como se discutió en los límites de detección y cuantificación, los ensayos del E. b son todos homogéneos a excepción del ensayo 2, el cual se descarta, encontrándose que el CV% máximo es de 3,29 % (ver tabla 13). Sin embargo, el ensayo descartado tiene un CV% de 6,99 % que es tolerable dada la escala de operación del método.

De igual forma, los ensayos del E. m son en su mayoría homogéneos (anexo B). El CV% máximo es de 6,46 % (ver tabla 15).

Para el E. a los resultados de la prueba F muestran diferencias entre los ensayos (ver anexo C). Aún así, el CV% máximo es 2,67 %.

- b. Repetibilidad intermedia:** En la tabla 17 se encuentran los datos de repetibilidad intermedia. Se observa que los valores de X_m , s , CV% y E% no difieren significativamente a simple vista y según las pruebas F y t (ver anexo D en las columnas correspondientes).

Tabla 17. Datos obtenidos para la repetibilidad intermedia en la validación del ensayo de arsénico.

Réplica	Repetibilidad Intermedia	
	Concentración Teórica: 10 µg As/L	
1	10,0798	9,9588
2	9,9273	9,9855
3	10,0400	10,1715
4	10,3106	10,2490
5	10,1489	10,1191
6	10,1007	9,8731
X_m	10,1	10,1
s	0,13	0,14
CV%	1,26	1,42
E%	1,01	0,60

6.1.6.4 Repetibilidad y reproducibilidad (R & R)

Analista: Clara Inés Arango Sotelo

Datos en la tabla 18.

Tabla 18. Datos obtenidos para la R & R en la validación del ensayo de arsénico.

Réplica	R & R
	C _{teórica} : 10 µg As/L
1	10,2774
2	10,1641
3	10,4925
4	10,6567
5	10,3056
6	10,0935
X _m	10,3
s	0,22
CV%	2,11
E%	2,99

6.1.6.5 Sensibilidad de calibración del método

Cuando se construye una curva de calibración se obtiene una ecuación algebraica de tipo lineal, así:

$$y = mx + b$$

Donde: y: Absorbancia

m: Sensibilidad de calibración del método

x: Concentración

b: Intercepto, error sistemático

En la tabla 19 se registran cada una de las sensibilidades de calibración de todas las curvas construidas durante la etapa de validación, el intercepto b y el ajuste o coeficiente de determinación R².

El "Cook Book"²⁹ del software del equipo indica una señal: "un patrón de 7 µg As/L presenta una absorbancia de 0,1". Con lo anterior se obtiene una pendiente de 0,014. La pendiente máxima obtenida se aproxima a este valor, lo que sugiere que bajo las condiciones de trabajo es posible cumplir con este criterio.

²⁹ Información sobre cada uno de los metales referente al análisis por EAA. Se encuentra en el software SOLAAR32 del equipo.

Tabla 19. Datos de cada curva de calibración construida en la validación del ensayo de arsénico.

Sensibilidad de Calibración		Intercepto b	R ²
0,0111		0,0071	0,9919
0,0121		0,0102	0,9951
0,0136		0,0082	0,9960
0,0132		0,0079	0,9968
0,0093		0,0016	0,9985
0,0096		0,0056	0,9983
0,0129		0,0068	0,9985
0,0112		0,0072	0,9965
0,0129		0,0050	0,9951
0,0107		0,0029	0,9988
Promedio	0,0117	0,0063	0,9966
Valor Mínimo	0,0093	0,0016	0,9919
Valor Máximo	0,0136	0,0102	0,9988

6.1.6.6 Recuperación

La muestra real M1 empleada para la validación de arsénico fue hecha tomando una cantidad de solución intermedia de arsénico y adicionándola en un volumen de agua residual de la Planta de Tratamiento de la Universidad Tecnológica de Pereira de tal forma que su concentración fuera próxima a la mitad del rango de trabajo. Esta se preservó a $\text{pH} \leq 2$ con HNO_3 y fue refrigerada a 4 °C.

Para la recuperación se tomaron 18 réplicas de 50 mL de M1 y se sometieron a digestión según numeral 5.6; luego se realizaron las adiciones necesarias: 6 réplicas para A. b y 6 réplicas para A. a. Por último, la reducción para todas las muestras según el procedimiento descrito en el numeral 6.1.5.2 "Procedimiento de reducción".

Las adiciones fueron de 2 $\mu\text{g As/L}$ para la A. b, correspondiente al 22,2 % aproximadamente, y 4 $\mu\text{g As/L}$ para la A. a, correspondiente al 44,4 % aproximadamente.

En la tabla 20 se recopilan los datos obtenidos para la recuperación.

El CV% máximo obtenido para M1, M1 A. a y M1 A. b es 2,79 %, 3,10 % y 1,94 % respectivamente.

Se obtuvieron recuperaciones para M1 A. b de 86,0 a 110% y para M1 A. a de 80,6 a 110 %.

Tabla 20. Datos obtenidos para la recuperación en la validación del análisis de arsénico.

Réplica	Ensayo 1		
	Concentración M1 ($\mu\text{g As/L}$)	A. b: 2 $\mu\text{g As/L}$	A. a: 4 $\mu\text{g As/L}$
1	8,7763	10,6270	12,3049
2	8,7374	10,3760	11,8306
3	8,8721	10,5440	11,8841
4	8,9078	10,4591	12,0272
5	8,8061	10,4517	12,0443
6	8,7837	10,7512	12,1350
X_m	8,81	10,5	12,0
s	0,06	0,14	0,17
CV%	0,73	1,30	1,43
% R	N/A	86,0	80,6
Réplica	Ensayo 2		
	Concentración M1 ($\mu\text{g As/L}$)	A. b: 2 $\mu\text{g As/L}$	A. a: 4 $\mu\text{g As/L}$
1	8,9097	10,8633	12,2426
2	8,4545	10,6202	12,1592
3	8,5017	10,3115	12,2308
4	9,0366	10,1796	12,4955
5	8,8360	10,9101	12,5908
6	8,7509	10,9564	12,1853
X_m	8,75	10,6	12,3
s	0,23	0,33	0,18
CV%	2,63	3,10	1,46
% R	N/A	94,6	89,2
Réplica	Ensayo 3		
	Concentración M1 ($\mu\text{g As/L}$)	A. b: 2 $\mu\text{g As/L}$	A. a: 4 $\mu\text{g As/L}$
1	9,0694	11,3209	13,0880
2	9,0185	11,3000	13,4284
3	9,1563	11,1429	13,6382
4	9,0435	11,5097	13,6263
5	9,2258	11,0645	13,3373
6	8,9883	11,3700	13,8283
X_m	9,08	11,3	13,5
s	0,09	0,16	0,26
CV%	0,99	1,42	1,94
% R	N/A	110	110
Réplica	Ensayo 4		
	Concentración M1 ($\mu\text{g As/L}$)	A. b: 2 $\mu\text{g As/L}$	A. a: 4 $\mu\text{g As/L}$
1	9,3505	11,6924	13,2341
2	9,4254	11,3092	13,4308
3	9,3030	11,7084	13,2732
4	9,9205	11,4464	13,3096
5	9,1542	11,4908	13,5413
6	9,5362	-	-
X_m	9,45	11,5	13,4
s	0,26	0,17	0,13
CV%	2,79	1,47	0,95
% R	N/A	104	97,7

6.1.7 Estimación de la Incertidumbre de la Medición

6.1.7.1 Mesurando

Se mide la absorbancia por parte del arsénico después de disociarse la arsina proveniente de la muestra.

6.1.7.2 Modelo matemático

$$x = \left(\frac{y - b}{m} \right)$$

Donde: x : Concentración ($\mu\text{g As/L}$)

y : Absorbancia

m : Sensibilidad del método ($\text{L}/\mu\text{g As}$)

b : Intercepto

6.1.7.3 Principio de medición

Después de la reacción del borohidruro en medio ácido con el arsénico de la muestra, el hidruro de arsénico (arsina) formado es arrastrado por parte del argón hacia la celda de cuarzo donde es disociada en sus átomos por calentamiento con una llama aire/acetileno. Al vapor de arsénico elemental se le mide la absorbancia, la cual es matemáticamente interpolada en una curva de calibración construida con anterioridad con patrones de concentración conocida.

6.1.7.4 Identificación de fuentes de incertidumbre

Las fuentes de incertidumbre están resumidas en la tabla 21.

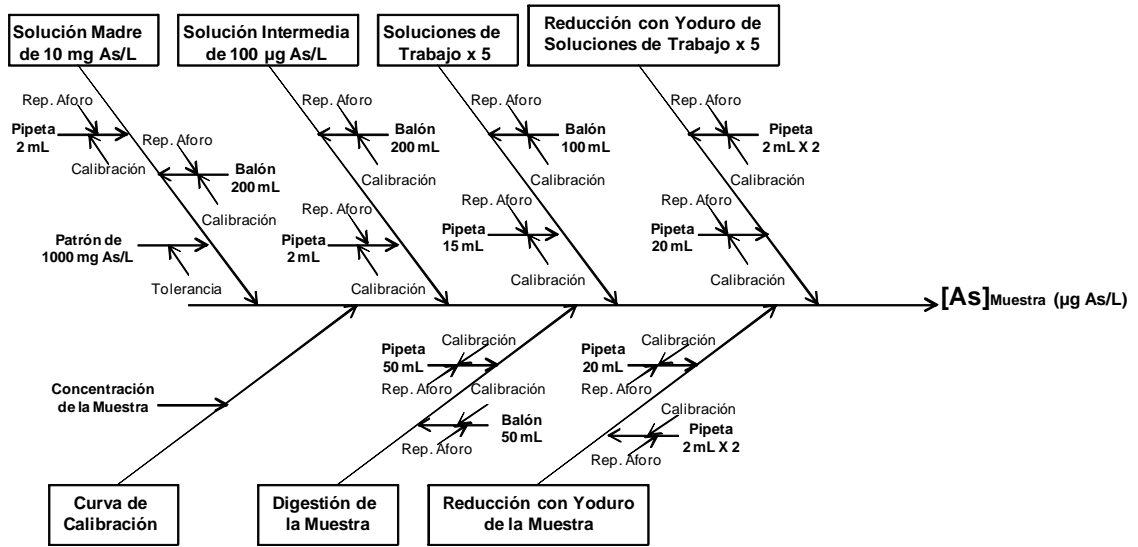
Tabla 21. Fuentes de incertidumbre para el análisis de arsénico.

Procedimiento	Factor Crítico en la Cuantificación	
	Aplica Incertidumbre	No Aplica Incertidumbre
Preparación de la solución madre de 10 mg As/L	X	
Preparación de la solución intermedia de 100 $\mu\text{g As/L}$	X	
Preparación de las soluciones de trabajo x 5	X	
Reducción con yoduro de las soluciones de trabajo x 5	X	
Preparación de BK de curva		X
Construcción de la curva de calibración	X	
Digestión de la muestra	X	
Reducción con yoduro de la muestra	X	
Preparación de BK de muestra		X

6.1.7.5 Diagrama causa-efecto

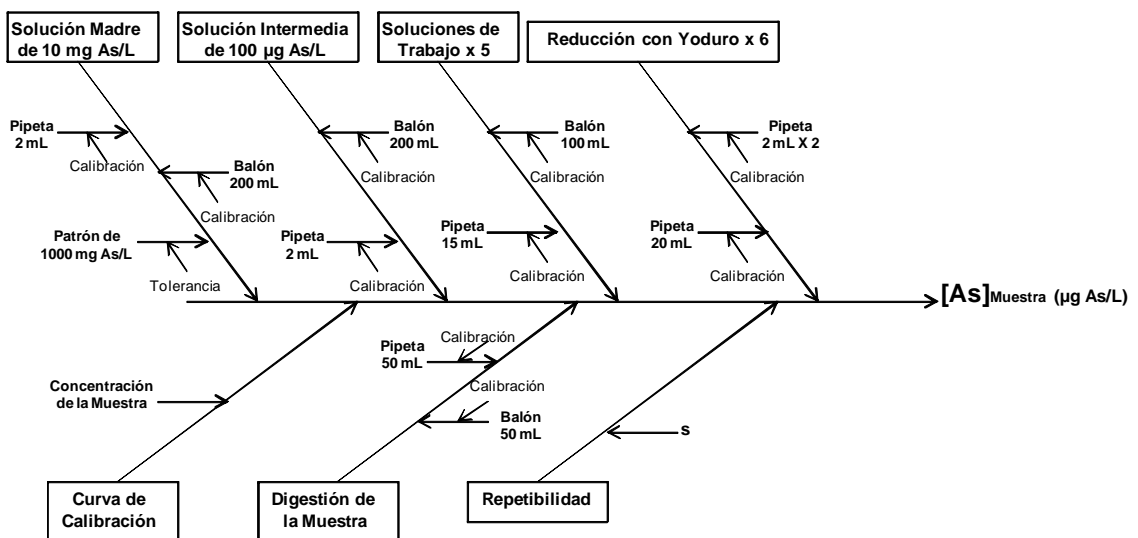
Se deben tener en cuenta las consideraciones hechas para la estimación de la incertidumbre del numeral 5.7.

Figura 12. Primer diagrama causa-efecto en la estimación de la incertidumbre de la medición en el análisis de arsénico.



Se pueden integrar en una rama llamada “repetibilidad” todas las “repetibilidades de aforo”. Las “reducciones con yoduro” pueden ir en una sola.

Figura 13. Segundo diagrama causa-efecto en la estimación de la incertidumbre de la medición en el análisis de arsénico.



6.1.7.6 Cálculos

Se aplica la siguiente fórmula general:

$$\frac{U_{(x)}}{x} = \sqrt{\sum \left(\frac{U_{(x_i)}}{x_i} \right)^2}$$

Donde:

$$U_{(x_i)} = \frac{\text{Tolerancia}(x_i)}{\sqrt{3}}$$

La tolerancia del patrón de referencia se encuentra en el anexo F. Para la calibración de pipetas y balones se usan sus tolerancias que se encuentran en el anexo E.

Se omiten unidades.

a. Incertidumbre por la solución madre de 10 mg As/L, U_{SM} :

$$\frac{U_{(SM)}}{[SM]} = \sqrt{\left(\frac{5}{\sqrt{3} * 1007} \right)^2 + \left(\frac{0,01}{\sqrt{3} * 2} \right)^2 + \left(\frac{0,15}{\sqrt{3} * 200} \right)^2} = 4,09 * 10^{-3}$$

b. Incertidumbre por la solución intermedia de 100 µg As/L, U_{SI} :

$$\frac{U_{(SI)}}{[SI]} = \sqrt{\left(\frac{0,01}{\sqrt{3} * 2} \right)^2 + \left(\frac{0,15}{\sqrt{3} * 200} \right)^2} = 2,92 * 10^{-3}$$

c. Incertidumbre por las soluciones de trabajo, U_{ST} :

$$\frac{U_{(ST)}}{[ST]} = 5 * \sqrt{\left(\frac{0,03}{\sqrt{3} * 15} \right)^2 + \left(\frac{0,1}{\sqrt{3} * 100} \right)^2} = 6,45 * 10^{-3}$$

d. Incertidumbre por la reducción con yoduro, U_{RY} :

$$\frac{U_{(RY)}}{[RY]} = 6 * \sqrt{\left(\frac{0,03}{\sqrt{3} * 20} \right)^2 + \left[2 * \left(\frac{0,01}{\sqrt{3} * 2} \right)^2 \right]} = 0,02504$$

e. Incertidumbre por digestión de la muestra, U_{DM} :

$$\frac{U_{(DM)}}{[DM]} = \sqrt{\left(\frac{0,05}{\sqrt{3} * 50}\right)^2 + \left(\frac{0,06}{\sqrt{3} * 50}\right)^2} = 9,0 * 10^{-4}$$

f. Incertidumbre por repetibilidad, U_R :

Se calcula con ayuda de la desviación estándar s más grande obtenida durante la validación, o sea 0,67 $\mu\text{g As/L}$. Ver "ensayo 1" tabla 15, E. m.

$$\frac{U_{(R)}}{[R]} = \sqrt{\left(\frac{0,67}{\sqrt{6} * 10}\right)^2} = 0,02735$$

g. Incertidumbre por la curva de calibración, U_{CC} :

Para este paso es necesario tener una curva de calibración típica.

Tabla 22. Datos para construir una curva de calibración para análisis de arsénico.

Patrón ($\mu\text{g As/L}$)	Absorbancia
0	0,002
2	0,037
4	0,065
6	0,089
10	0,133
15	0,206

La figura 14 muestra la curva de calibración construida con los datos anteriores. La ecuación obtenida es $y = 0,013x + 0,007$.

La ecuación para calcular la incertidumbre dada por la curva de calibración cuando se hace la medición de una muestra es:

$$U_{(CC)} = \frac{s}{b_1} * \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_M - \bar{C})^2}{s_{xx}}}$$

Donde:

s: Desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal.

b_1 : Pendiente de la curva de calibración.

p: Número de réplicas de la muestra en estudio.

n: Número de patrones para construir la curva de calibración.

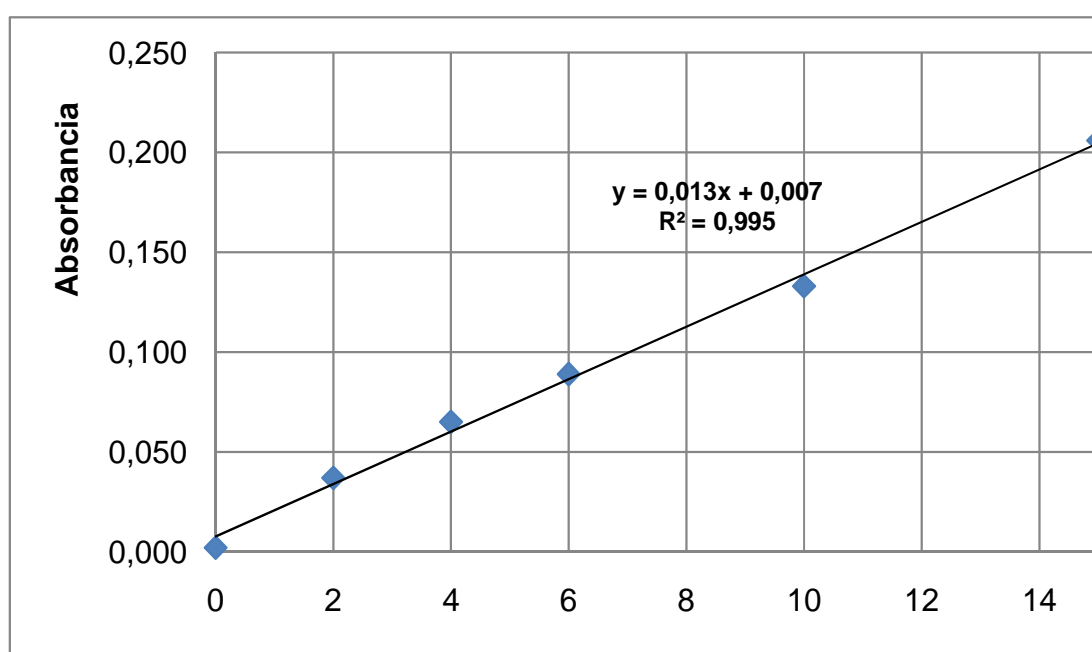
C_M : Concentración de la muestra.

\bar{C} : Concentración promedio de los patrones.

s_{xx} : Suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas.

Según lo anterior, es necesario conocer la concentración de la muestra, que se asumirá es de 7,5 $\mu\text{g As/L}$, que corresponde a la mitad del rango lineal, para efecto de cálculos.

Figura 14. Curva de calibración para análisis de arsénico.



La desviación estándar residual s y la suma de cuadrados de los residuales \hat{s}_{xx} se calculan así:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (b_0 + b_1 * C_i)]^2}{n - 2}} \quad \text{y} \quad s_{xx} = \sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2$$

Donde:

A_i : Absorbancia del patrón i .

b_0 : Intercepto de la curva de calibración.

C_i : Concentración del patrón i .

$$s = \sqrt{\frac{[0,002 - (0,007 + 0,013 * 0)]^2 + [0,037 - (0,007 + 0,013 * 2)]^2}{4} + \frac{[0,065 - (0,007 + 0,013 * 4)]^2 + [0,089 - (0,007 + 0,013 * 6)]^2}{4} + \frac{[0,133 - (0,007 + 0,013 * 10)]^2 + [0,206 - (0,007 + 0,013 * 15)]^2}{4}} = 5,59 * 10^{-3}$$

$$s_{xx} = (0 - 6,17)^2 + (2 - 6,17)^2 + (4 - 6,17)^2 + (6 - 6,17)^2 + (10 - 6,17)^2 + (15 - 6,17)^2 = 152,83$$

$$U_{(CC)} = \frac{5,59 * 10^{-3}}{0,013} * \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{6} + \frac{(7,5 - 6,17)^2}{152,83}} = 0,354$$

$$\frac{U_{(CC)}}{[CC]} = \frac{0,354}{7,5} = 0,04722$$

h. Incertidumbre estándar combinada en el análisis de arsénico

Se toman los aportes de cada fuente de incertidumbre desde **a** hasta **g**.

$$\frac{U_{(As)}}{[As]} = \sqrt{(4,09 * 10^{-3})^2 + (2,92 * 10^{-3})^2 + (6,45 * 10^{-3})^2 + (0,02504)^2 + (9,0 * 10^{-4})^2 + (0,02735)^2 + (0,04722)^2} = 0,0606$$

i. Expresión de los resultados

- **Incertidumbre estándar combinada**

$$[As]_{\text{Muestra}} = [As]_{\text{Muestra}} \pm (0,0606 * [As]_{\text{Muestra}})$$

- **Incertidumbre expandida**

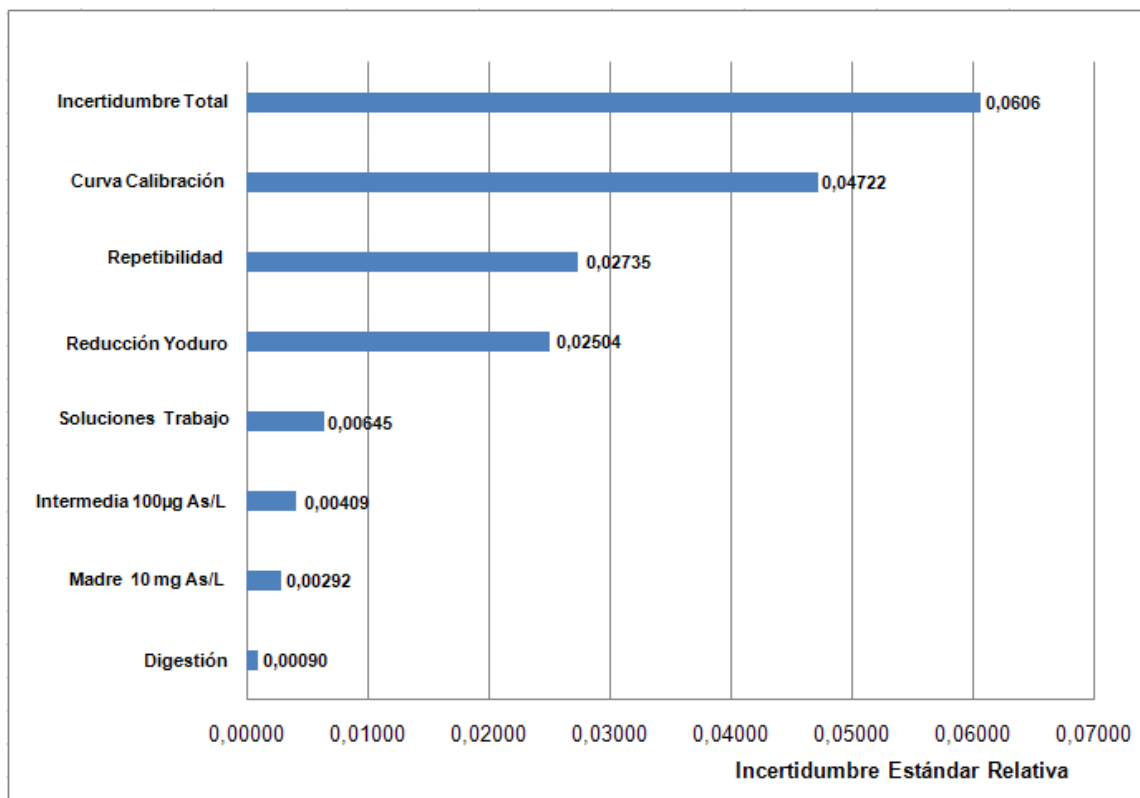
$$[As]_{\text{Muestra}} = [As]_{\text{Muestra}} \pm (0,0606 * [As]_{\text{Muestra}} * 2)$$

$$[As]_{\text{Muestra}} = [As]_{\text{Muestra}} \pm (0,1212 * [As]_{\text{Muestra}})$$

Por ejemplo, para la muestra de 7,5 µg As/L se expresa así:

$$7,50 \mu\text{g As/L} \pm 0,91 \mu\text{g As/L}$$

Figura 15. Contribuciones a la incertidumbre del análisis de arsénico.



6.1.8 Discusión de Resultados

La digestión se encontró innecesaria en los patrones, pero en las muestras poluídas es necesario este paso para eliminar materia orgánica y poder llevar todo el arsénico disponible al estado +5, para luego reducirlo cuantitativamente al estado +3 que es con el cual se da mayor rendimiento en la formación de la arsina.

Cuando se reducen los patrones, aumenta la sensibilidad del análisis y disminuye el límite de cuantificación. Por lo anterior y debido a que los niveles de arsénico en las muestras pueden llegar a ser muy bajos se escoge hacer la reducción con yoduro. Queda inmerso en el método de determinación de este analito el paso de reducción.

Aunque los criterios de aceptación para la exactitud y la precisión son generales y pueden variar según el analito y la escala de operación de la técnica, se cumplen satisfactoriamente para la determinación de arsénico por Generación de Hidruros / Espectrometría de Absorción Atómica.

La prueba R & R efectuada por un segundo analista demuestra que el método es reproducible y que los resultados obtenidos por un segundo analista son comparables con los resultados del primero.

En la figura 15 “contribuciones a la incertidumbre del análisis de arsénico” se observa que la mayor contribución proviene de la construcción de la curva de calibración. Esto sugiere que en la construcción de dicha curva es conveniente que esta se adapte a una recta según el modelo de la Ley de Beer³⁰ y que los residuales sean los más pequeños posibles, es decir que su coeficiente de determinación R^2 sea mayor a 0,995.

La repetibilidad es otra contribución significativa, pero esta depende en gran parte del manejo del método por el analista.

La reducción con yoduro es otra contribución igualmente significativa a la anterior pero inherente al método, porque es una contribución dada por material volumétrico, y por tanto reducirla lleva a reducir la tolerancia en este material. La forma práctica de disminuir esta contribución es aumentando el volumen de patrón o muestra a reducir, lo cual lleva a mayor consumo de reactivos y muestras.

La incertidumbre expandida de la medición es $0,1212 \cdot [As]$. Pero puede pasar lo siguiente:

Si la muestra presenta un contenido de arsénico que coincide con el límite de cuantificación, $0,90 \mu\text{g As/L}$, la incertidumbre asociada es $\pm 0,11 \mu\text{g As/L}$, es decir que el contenido real de arsénico en la muestra se encuentra entre $0,79$ y $1,01 \mu\text{g As/L}$. Entonces es posible que la concentración se encuentre entre $0,79$ y $0,90 \mu\text{g As/L}$ lo cual invalida el límite de cuantificación calculado.

Según lo anterior, debe hallarse un límite práctico de cuantificación según el cual su incertidumbre no sea menor al límite de $0,90 \mu\text{g As/L}$. Este valor es $1,02 \mu\text{g As/L}$ y se calcula con el límite inferior de la incertidumbre así:

$$X - 0,1212X = 0,90$$

$$X = \frac{0,90}{1 - 0,1212} = 1,02$$

Donde X es la concentración en $\mu\text{g As/L}$.

³⁰ El nombre completo es Ley de Bourguer - Beer - Lambert simplificada a Ley de Beer.

6.1.9 Conclusiones

- Se estandarizó y validó el método para determinar As por Generación de Hidruros / Espectrometría de Absorción Atómica.
- **Tabla 23.** Conclusiones acerca de los parámetros de calidad analítica para el método de determinación de arsénico.

Parámetro	Resultado
Límite de detección	0,27 µg As/L
Límite de Cuantificación	0,90 µg As/L
Límite Práctico de Cuantificación ³¹	1,02 µg As/L
Rango Óptimo de Cuantificación	Desde 1,02 hasta 15 µg As/L
Exactitud	E% máximo de 8,67 %
Precisión	CV% máximo de 7,68 %
Sensibilidad de calibración	0,0117 L/µg As
Recuperación	Desde 80,6 hasta 110 %
Incertidumbre de la Medición	0,1212*[As]

6.1.10 Recomendaciones

- Para mejorar la precisión y la exactitud, hacer un ensayo para evaluar el tiempo que tarda la celda de reacción en U para estabilizarse, usando un patrón de 10 µg As/L. Obtener la absorbancia y el CV% del patrón cada vez que se hace la medición, desde el tiempo en que se enciende la bomba peristáltica y los reactivos se mezclan, hasta que la absorbancia y el CV% se estabilizan.
- Establecer la concentración óptima del reductor yoduro para reducir la cantidad de arsénico de todos los patrones de la curva.

6.1.11 Control de Calidad y Seguimiento de Validación

- Reducir un patrón con el conjunto de muestras a analizar.
- Introducir patrones cada cinco muestras cuando se haga un análisis.
- Hacer prueba R & R cada seis meses.
- Verificar el límite de cuantificación cada seis meses.
- Participar en pruebas de desempeño cada año.

³¹ Corregido respecto a la incertidumbre.

6.2 DETERMINACIÓN DE MERCURIO POR GENERACIÓN DE HIDRUROS / ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

6.2.1 Alcance

Este método aplica para determinar el contenido de mercurio en aguas naturales (superficiales y subterráneas) y residuales domésticas e industriales por Generación de Hidruros / Espectrometría de Absorción Atómica.

6.2.2 Principio

En aguas naturales con bajo contenido orgánico prevalece el mercurio inorgánico en forma de sales como cloruro mercúrico (HgCl_2) y cloruro mercurioso (Hg_2Cl_2) principalmente. En aguas residuales con contenido orgánico, el mercurio puede estar haciendo parte de moléculas orgánicas como los alquilmérgurios y otras formas más complejas, que bajo calentamiento se volatilizan perdiéndose de las soluciones que la contienen. La medición se hace directamente de la muestra en estos casos.

Las diferentes formas de mercurio reaccionan con el borohidruro que lo reduce a su forma elemental, formándose un vapor de mercurio que es arrastrado por el argón hasta la celda de cuarzo situado en el camino óptico del espectrómetro donde se lleva a cabo la medición de la absorbancia. No se requiere calentamiento.

6.2.3 Precauciones de Seguridad

Usar guantes de nitrilo durante toda la determinación del mercurio. Los vapores de este atacan el sistema nervioso, producen infertilidad, afecciones cutáneas, es teratógeno, entre otros efectos adversos para la salud. Además es peligroso para el medio ambiente.

Tabla 24. Precauciones de seguridad en la determinación de mercurio.

Acción	Posibles Accidentes	Medidas a Tomar
Trabajo con ácidos concentrados	Salpicaduras en piel y ojos Derrames	Usar guantes especiales para manipulación de ácidos, careta facial y trabajar bajo cabina de extracción de gases.
Trabajo en el espectrómetro	Intoxicación por mercurio gaseoso.	Mantener durante todo el análisis, el sistema de extracción de gases encendido.

6.2.4 Preparación de Soluciones de Trabajo

Igual que el numeral 6.1.4 pero aplicado al mercurio.

6.2.5 Experimentos de Estandarización

6.2.5.1 Establecimiento del rango de linealidad

Inicialmente se hace la curva de calibración hasta 50 µg Hg/L, resultando ser lineal. Luego, se extiende hasta 100 µg Hg/L.

Tabla 25. Datos para construir la curva de calibración para establecer el rango de linealidad en el análisis de mercurio.

Patrón (µg Hg/L)	Absorbancia
0	-0,002
5	0,025
10	0,050
20	0,103
30	0,152
40	0,205
50	0,258
60	0,316
70	0,359
100	0,525

En la figura 16 se construye la curva de calibración. Con todos los patrones se obtiene la ecuación $y = 0,005x - 0,002$ con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,999. Se hace el Test de Residuales en la tabla 26.

Tabla 26. Test de residuales para linealidad en el análisis de mercurio.

Punto	Concentración (µg Hg/L)	Absorbancia Experimental	Absorbancia Calculada	Diferencia
1	0	-0,002	-0,003	-0,001
2	5	0,025	0,023	-0,002
3	10	0,050	0,049	-0,001
4	20	0,103	0,101	-0,002
5	30	0,152	0,153	0,001
6	40	0,205	0,205	0,000
7	50	0,258	0,257	-0,001
8	60	0,316	0,309	-0,007
9	70	0,359	0,361	0,002
10	100	0,525	0,517	-0,008

Figura 16. Curva de calibración para establecer el rango de linealidad en el análisis de mercurio.

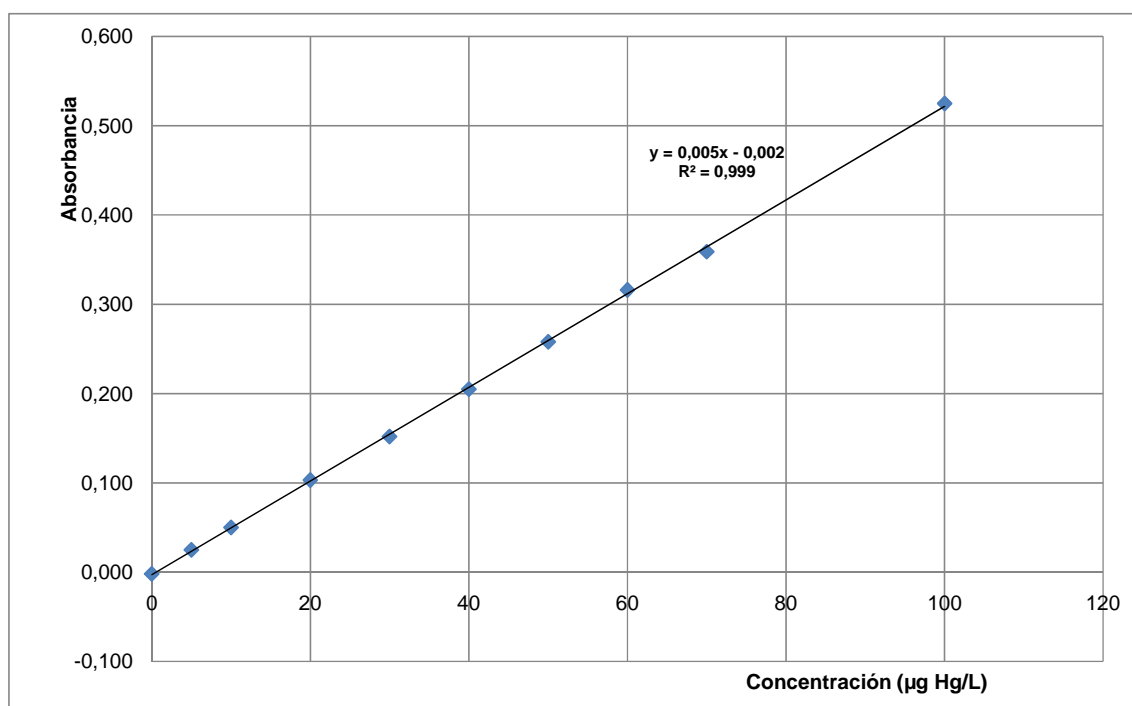
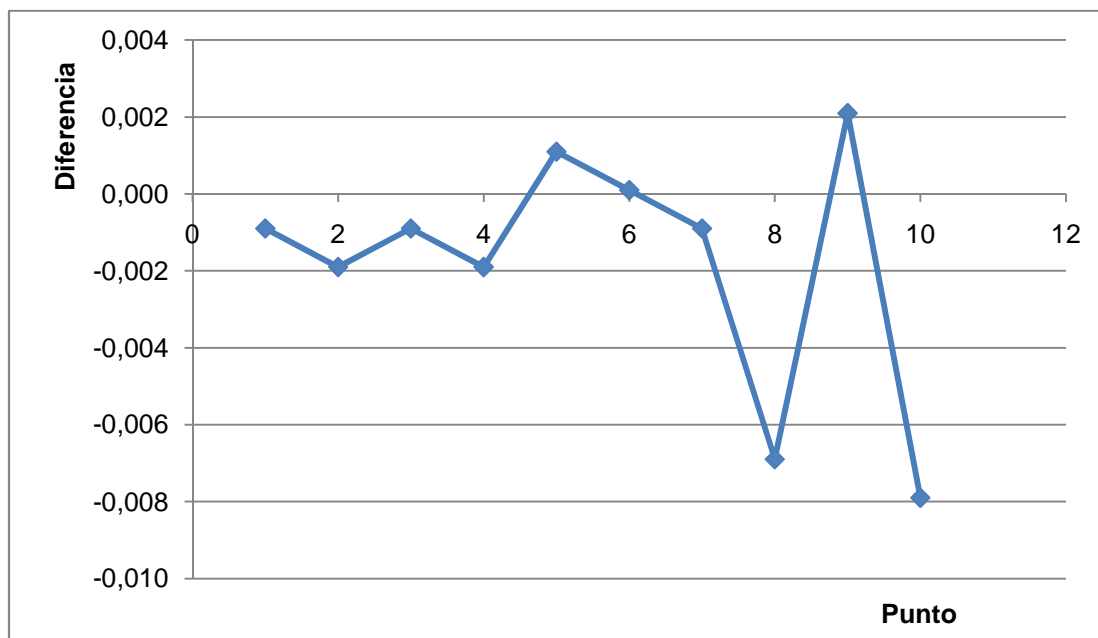


Figura 17. Residuales para linealidad en el análisis de mercurio.



En la figura 17 se observa que los puntos 8 y 10 correspondientes a los patrones de 60 y 100 $\mu\text{g Hg/L}$ respectivamente, son los más alejados de la población. Aunque la curva presenta linealidad hasta 100 $\mu\text{g Hg/L}$, se ha tomado la decisión de validar hasta 50 $\mu\text{g Hg/L}$ pensando en el rango de concentraciones más común entre las que se encuentra el contenido de mercurio en las muestras. Con esta información se definen los estándares que se van a usar en la validación.

Estándar bajo (E. b) de 5 $\mu\text{g Hg/L}$
Estándar medio (E. m) de 25 $\mu\text{g Hg/L}$
Estándar alto (E. a) de 40 $\mu\text{g Hg/L}$

6.2.6 Experimentos de Validación

Laboratorio: Laboratorio de Química Ambiental (LQA)

Equipo: Espectrómetro de Absorción Atómica SOLAAR 969 ThermoElemental con Generador de Hidruros Unicam VP 90

Analista: Andrés Mauricio Camacho Orrego

6.2.6.1 Límites de detección y cuantificación

Tabla 27. Datos obtenidos para el E. b en la validación del ensayo de mercurio.

Réplica	E. b		
	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 3
	Concentración Teórica: 5 µg Hg/L		
1	4,3246	4,5039	4,7110
2	4,8942	5,0716	5,0214
3	4,8954	5,0802	4,9731
4	4,9019	5,2482	4,8636
5	4,9549	5,0887	5,1365
6	5,0361	5,3403	5,1925
X_m	4,83	5,06	4,98
s	0,26	0,29	0,18
CV%	5,29	5,76	3,56
E%	-3,31	1,11	-0,34
LD	0,77	0,87	0,53
LC	2,56	2,91	1,77

La prueba F de E. b muestra que todos los ensayos son homogéneos entre sí (anexo G), lo que significa que no hay diferencias significativas en las distribuciones de cada uno de ellos, por lo tanto pertenecen a la misma población lo que permite que los valores de LD y LC se puedan promediar.

El límite de detección LD promedio es 0,72 µg Hg/L.

El límite de cuantificación LC promedio es 2,41 µg Hg/L.

Se efectuó un ensayo usando patrones de 2 µg Hg/L para confirmar experimentalmente el límite de cuantificación.

Tabla 28. Ensayo adicional para confirmar el LD y el LC en la validación del análisis de mercurio.

Réplica	$C_{teórica}$: 2 µg Hg/L
1	1,9116
2	2,1349
3	2,0904
4	2,1186
5	2,0352
6	2,0962
X_m	2,06
s	0,08
CV%	3,98
E%	3,22
LD	0,25
LC	0,82

Los resultados confirman que para un patrón de 2 µg Hg/L el E% y el CV% cumplen con los criterios establecidos por el LQA, confirmando que:

LD = 0,72 µg Hg/L

LC = 2,41 µg Hg/L

6.2.6.2 Exactitud y precisión

Tabla 29. Datos obtenidos para el E. m en la validación del ensayo de mercurio.

Réplica	E. m			
	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 3	Ens. 4
	Concentración Teórica: 25 µg Hg/L			
1	25,7130	25,3006	26,1641	25,1422
2	23,5384	29,0580	26,4146	25,7265
3	23,8250	24,5460	26,3943	25,8189
4	22,7967	22,7898	26,2294	25,2492
5	26,6769	22,7112	26,5346	25,6747
6	21,8374	25,8707	26,4974	25,9595
X_m	24,1	25,0	26,4	25,6
s	1,81	2,35	0,15	0,33
CV%	7,54	9,39	0,56	1,27
E%	-3,74	0,18	5,49	2,38

El E. m tiene un E% y CV% máximos de 5,49 % y 9,39 % respectivamente.

Tabla 30. Datos obtenidos para el E. a en la validación del ensayo de mercurio.

Réplica	E. a			
	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 3	Ens. 4
	Concentración Teórica: 40 µg Hg/L			
1	42,3785	39,2901	40,6138	42,3651
2	35,7192	40,5091	40,3865	42,3350
3	36,1862	39,6849	40,5496	42,5905
4	45,4980	37,8856	40,1658	42,9719
5	40,4987	40,4082	40,9271	42,6578
6	41,7248	38,7006	40,8459	42,7853
X_m	40,3	39,4	40,6	42,6
s	3,78	1,01	0,28	0,24
CV%	9,36	2,57	0,70	0,57
E%	0,84	-1,47	1,45	6,54

El E. a tiene un E% y CV% máximos de 6,54 % y 9,36 %.

6.2.6.3 Repetibilidad intermedia

Tabla 31. Datos obtenidos para la repetibilidad intermedia en la validación del ensayo de mercurio.

Réplica	Repetibilidad Intermedia	
	Concentración Teórica: 25 µg Hg/L	
1	22,2978	20,2553
2	20,7548	19,8861
3	22,4019	23,6404
4	28,5248	22,3272
5	25,2201	25,6681
6	24,3079	24,2632
X_m	23,9	22,7
s	2,76	2,29
CV%	11,53	10,09
E%	-4,33	-9,31

6.2.6.4 Sensibilidad de calibración del método

Tabla 32. Datos de cada curva de calibración construida en la validación del ensayo de mercurio.

Sensibilidad de Calibración	Intercepto b	R ²
0,0053	-0,0031	0,9997
0,0051	-0,0014	0,9997
0,0051	-0,0024	0,9992
0,0051	-0,0016	0,9994
0,0052	-0,0029	0,9997
0,0049	-0,0014	0,9997
Promedio	0,0051	0,9996
Valor Mínimo	0,0049	0,9992
Valor Máximo	0,0053	0,9997

De la tabla anterior se demuestra que la sensibilidad de calibración del método es 0,0051. Dicho de otra forma, un patrón de 10 µg Hg/L presenta una absorbancia de 0,051.

6.2.6.5 Recuperación

La muestra usada es agua residual de lavados de una amalgama. Fue preservada con HNO₃ y almacenada bajo refrigeración a 4 °C.

Su concentración en mercurio es aproximadamente 28 µg Hg/L y las adiciones fueron de 7 y 15 µg As/L correspondiente al 27,8 % y al 51,4 % respectivamente.

En la tabla 33 se recopilan los datos obtenidos para la recuperación.

Tabla 33. Datos obtenidos para la recuperación en la validación del análisis de mercurio.

Réplica	Ensayo 1		
	Concentración M1 ($\mu\text{g Hg/L}$)	A. b: 7 $\mu\text{g Hg/L}$	A. a: 15 $\mu\text{g Hg/L}$
1	24,8724	38,2793	39,4665
2	23,0633	30,1349	42,2858
3	35,3882	31,2105	34,9075
4	27,7669	32,4146	35,6494
5	27,2826	51,1695	40,5341
6	24,9184	28,4762	35,2974
X_m	27,2	35,3	38,0
s	4,36	8,47	3,14
CV%	16,0	24,0	8,26
% R	N/A	115,2	72,1
Réplica	Ensayo 2		
	Concentración M1 ($\mu\text{g Hg/L}$)	A. b: 7 $\mu\text{g Hg/L}$	A. a: 15 $\mu\text{g Hg/L}$
1	29,5785	35,125	43,2092
2	27,7862	35,5412	42,6371
3	27,911	34,9283	43,0697
4	27,8933	35,0159	43,1553
5	28,3405	35,0451	42,9202
6	28,3868	35,0954	43,1148
X_m	28,3	35,1	43,0
s	0,67	0,21	0,21
CV%	2,35	0,61	0,49
% R	N/A	97,3	98,0
Réplica	Ensayo 3		
	Concentración M1 ($\mu\text{g Hg/L}$)	A. b: 7 $\mu\text{g Hg/L}$	A. a: 15 $\mu\text{g Hg/L}$
1	27,6115	35,8833	45,1744
2	27,684	36,3092	44,3327
3	27,7865	36,1868	44,3917
4	28,3569	36,1968	44,6369
5	28,4547	36,047	44,8899
6	28,7705	36,742	44,7481
X_m	28,1	36,2	44,7
s	0,48	0,29	0,32
CV%	1,71	0,80	0,71
% R	N/A	116,0	110,6
Réplica	Ensayo 4		
	Concentración M1 ($\mu\text{g Hg/L}$)	A. b: 8 $\mu\text{g Hg/L}$	A. a: 16 $\mu\text{g Hg/L}$
1	27,9799	37,0406	44,6899
2	28,719	36,1935	44,3045
3	28,6767	36,7385	43,9775
4	28,0073	36,6542	43,9138
5	29,0257	36,2771	43,9245
6	28,1838	36,2827	43,762
X_m	28,4	36,5	44,1
s	0,43	0,33	0,34
CV%	1,53	0,91	0,78
% R	N/A	101,2	97,9

Se obtuvieron recuperaciones para M1 A. b de 97,3 a 116 % y para M1 A. a de 72,1 a 110,6 %.

6.2.7 Estimación de la Incertidumbre de la Medición

6.2.7.1 Mesurando

Se mide la absorbancia por parte del vapor de mercurio que proveniente de la muestra.

6.2.7.2 Modelo matemático

El mismo dado en el numeral 6.1.7.2.

6.2.7.3 Principio de medición

Después de reaccionar el borohidruro en medio ácido con el mercurio de la muestra, se forma un vapor de mercurio que es arrastrado por parte del argón hacia la celda de cuarzo donde se mide la absorbancia por parte del espectrómetro, la cual es matemáticamente interpolada en una curva de calibración construida con anterioridad con patrones de concentración conocida.

6.2.7.4 Identificación de fuentes de incertidumbre

Las fuentes de incertidumbre están resumidas en la tabla 34.

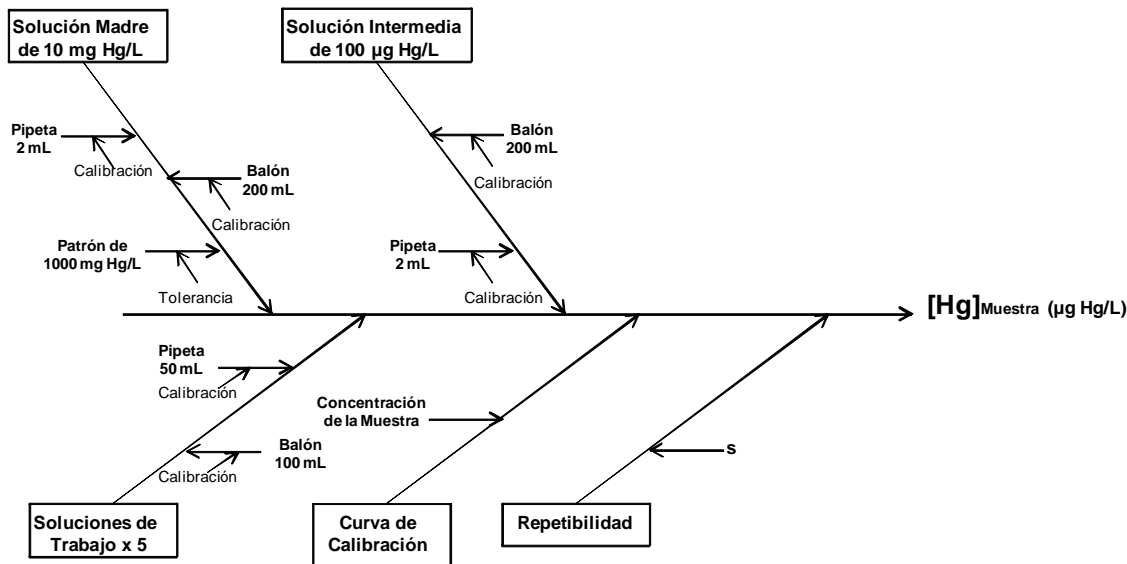
Tabla 34. Fuentes de incertidumbre para el análisis de mercurio.

Procedimiento	Factor Crítico en la Cuantificación	
	Aplica Incertidumbre	No Aplica Incertidumbre
Preparación de la solución madre de 10 mg Hg/L	X	
Preparación de la solución intermedia de 100 µg Hg/L	X	
Preparación de las soluciones de trabajo x 5	X	
Preparación de BK de curva		X
Construcción de la curva de calibración	X	

6.2.7.5 Diagrama causa-efecto

Se deben tener en cuenta las consideraciones hechas para la estimación de la incertidumbre del numeral 5.7.

Figura 18. Diagrama causa-efecto en la estimación de la incertidumbre de la medición en el análisis de mercurio.



6.2.7.6 Cálculos

Se usan las mismas ecuaciones que aparecen en el numeral 6.1.7.6.

La tolerancia del patrón de referencia se encuentra en el anexo F. Para la calibración de pipetas y balones se usan sus tolerancias que se encuentran en el anexo E.

a. Incertidumbre por la solución madre de 10 mg Hg/L, U_{SM} :

$$\frac{U_{(SM)}}{[SM]} = 3,14 * 10^{-3}$$

b. Incertidumbre por la solución intermedia de 100 µg Hg/L, U_{SI} :

$$\frac{U_{(SI)}}{[SI]} = 2,92 * 10^{-3}$$

c. Incertidumbre por las soluciones de trabajo, U_{ST} :

$$\frac{U_{(ST)}}{[ST]} = 4,08 * 10^{-3}$$

d. Incertidumbre por repetibilidad, U_R :

Se calcula con ayuda de la desviación estándar s más grande obtenida durante la validación, o sea 3,78 $\mu\text{g Hg/L}$. Ver “ensayo 1” tabla 30, E. a.

$$\frac{U_{(R)}}{[R]} = 0,03858$$

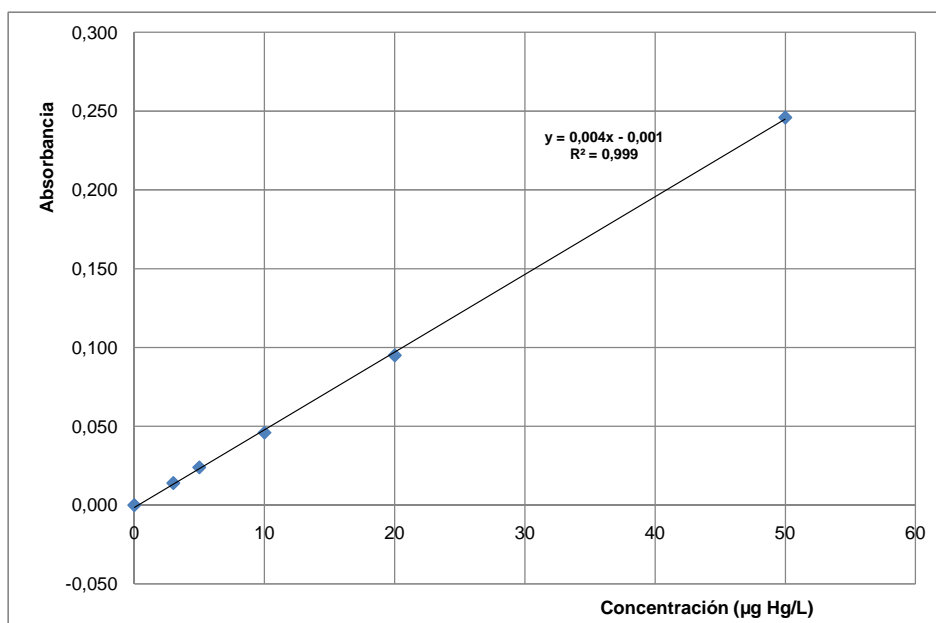
e. Incertidumbre por la curva de calibración, U_{CC} :

Se usó una curva de calibración típica como la siguiente.

Tabla 35. Datos para construir una curva de calibración para análisis de mercurio.

Patrón ($\mu\text{g Hg/L}$)	Absorbancia
0	0,000
3	0,014
5	0,024
10	0,046
20	0,095
50	0,246

Figura 19. Curva de calibración para análisis de mercurio.



Se asumirá una muestra de 10,0 µg As/L.

$$s = 1,88 * 10^{-3}$$

$$s_{xx} = 1743,33$$

$$U_{(CC)} = 0,316$$

$$\frac{U_{(CC)}}{[CC]} = 0,03162$$

f. Incertidumbre estándar combinada en el análisis de arsénico

$$\frac{U_{(Hg)}}{[Hg]} = 0,0502$$

g. Expresión de los resultados

- **Incertidumbre estándar combinada**

$$[Hg]_{\text{Muestra}} = [Hg]_{\text{Muestra}} \pm (0,0502 * [Hg]_{\text{Muestra}})$$

- **Incertidumbre expandida**

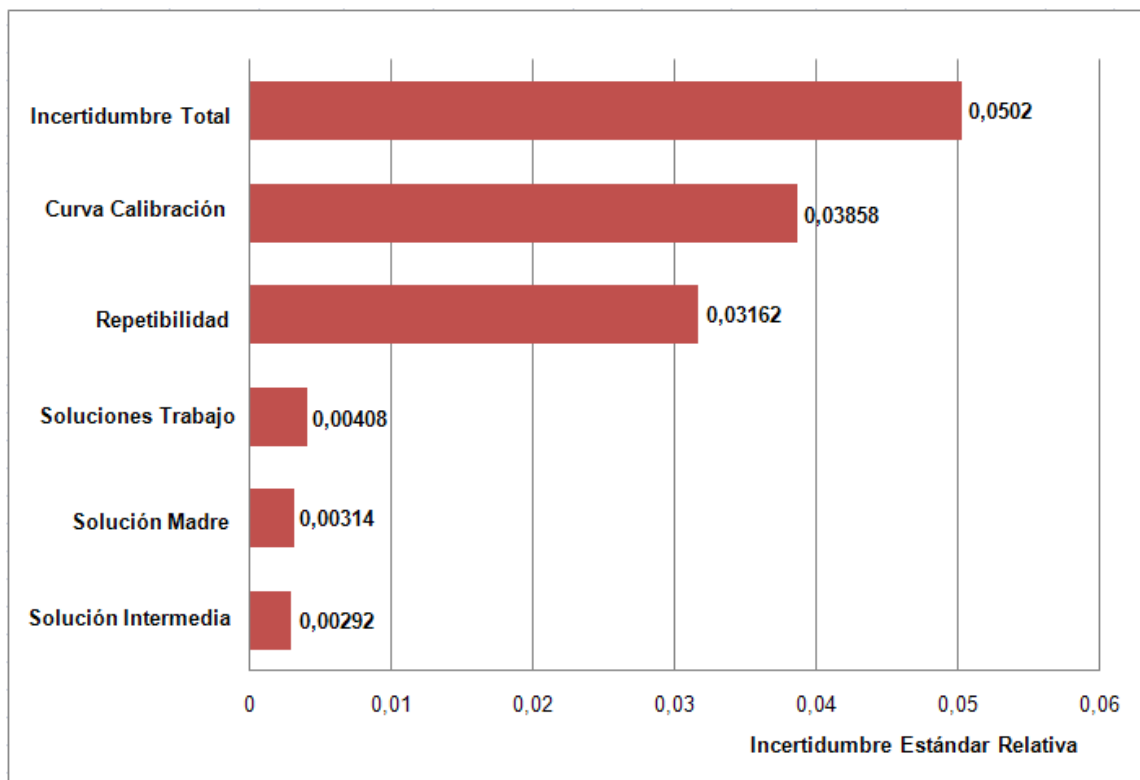
$$[Hg]_{\text{Muestra}} = [Hg]_{\text{Muestra}} \pm (0,0502 * [Hg]_{\text{Muestra}} * 2)$$

$$[Hg]_{\text{Muestra}} = [Hg]_{\text{Muestra}} \pm (0,1005 * [Hg]_{\text{Muestra}})$$

Por ejemplo, para la muestra de 10,0 µg Hg/L se expresa así:

$$10,0 \mu\text{g Hg/L} \pm 1,0 \mu\text{g As/L}$$

Figura 20. Contribuciones a la incertidumbre del análisis de mercurio.



6.2.8 Discusión de Resultados

La mayoría de muestras para determinación de mercurio están entre el rango de concentraciones escogido para validar. No se hicieron ensayos para determinar hasta qué punto es lineal la relación de la concentración con la absorbancia, pero a partir del ensayo incluido en la tabla 26 se infiere que es mayor a igual a 100 µg Hg/L.

En la figura 20 “contribuciones a la incertidumbre del análisis de mercurio” se observa que la mayor contribución proviene de la construcción de la curva de calibración, esto es similar que para el análisis de arsénico.

De igual manera que en el análisis de arsénico, la repetibilidad es otra contribución significativa.

La incertidumbre expandida de la medición es $0,1005 \cdot [\text{Hg}]$, y el límite de cuantificación es 2,41 µg Hg/L, por lo tanto, el límite práctico es 2,68 µg Hg/L.

Ver las discusiones del método para determinar arsénico en el numeral 6.1.8.

6.2.9 Conclusiones

- Se estandarizó y validó el método para determinar Hg por Generación de Hidruros / Espectrometría de Absorción Atómica.
- **Tabla 36.** Conclusiones acerca de los parámetros de calidad analítica para el método de determinación de mercurio.

Parámetro	Resultado
Límite de detección	0,72 µg Hg/L
Límite de Cuantificación	2,41 µg Hg/L
Límite Práctico de Cuantificación	2,68 µg Hg/L
Rango Óptimo de Cuantificación	Desde 2,68 hasta 50 µg Hg/L
Exactitud	E% máximo de 9,31 %
Precisión	CV% máximo de 11,53 %
Sensibilidad de calibración	0,0051 L/µg Hg
Recuperación	Desde 72,1 hasta 116 %
Incertidumbre de la Medición	0,1005*[Hg]

6.2.10 Recomendaciones

- Ver recomendación del numeral 6.1.10 usando un patrón de mercurio.
- La concentración máxima de mercurio en agua potable permitida es 1 µg Hg/L. El límite de cuantificación de este método es 2,68 µg Hg/L, que está por encima del valor máximo permitido antes descrito, por lo tanto no se puede cuantificar. La recomendación es implementar el kit de vapor frío de mercurio para cuantificar a niveles de ng Hg/L.

6.2.11 Control de Calidad y Seguimiento de Validación

- Introducir patrones cada cinco muestras cuando se haga un análisis.
- Hacer prueba R & R cada seis meses.
- Verificar el límite de cuantificación cada seis meses.
- Participar en pruebas de desempeño cada año.

6.3 DETERMINACIÓN DE SODIO POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA. 3111 B.

6.3.1 Alcance

Este método es apropiado para determinar el contenido de sodio en aguas naturales (superficiales y subterráneas) y residuales domésticas e industriales por Espectrometría de Absorción Atómica con llama.

6.3.2 Principio

La muestra es aspirada hasta la llama donde es atomizada. Una luz emitida pasa a través de la llama, por un monocromador y sobre un detector que mide la cantidad de luz absorbida por el elemento atomizado en la llama. Para algunos metales, la absorción atómica muestra una sensibilidad superior en comparación con la emisión de llama. Como cada metal tiene su propia longitud de onda de absorción característica, la fuente es una lámpara del elemento a analizar; esto hace que el método esté relativamente libre de interferencias espectrales o de radiación. La cantidad de energía absorbida a la longitud de onda característica en la llama es proporcional a la concentración del elemento en la muestra entre un rango de concentración límite³².

6.3.3 Precauciones de Seguridad

Usar guantes de nitrilo durante toda la determinación.

Tabla 37. Precauciones de seguridad en la determinación de sodio.

Acción	Posibles Accidentes	Medidas a Tomar
Trabajo con ácidos concentrados	Salpicaduras en piel y ojos Derrames	Usar guantes especiales para manipulación de ácidos, careta facial y trabajar bajo cabina de extracción de gases.
Digestión de muestras	Sofocación por gases ácidos	Trabajar bajo cabina de extracción de gases.

³² STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER & WASTEWATER. Op. cit., 3-
—.

Acción	Posibles Accidentes	Medidas a Tomar
Trabajo en el espectrómetro	Intoxicación por gases generados en la llama Radiación UV proveniente de la llama dañina para la piel, y en especial, los ojos.	Mantener durante todo el análisis, el sistema de extracción de gases encendido. Usar gafas con filtro UV Tener la pantalla protectora del espectrómetro puesta

6.3.4 Preparación de Soluciones de Trabajo

- a. **Solución madre de 10 mg Na/L:** Medir cuantitativamente 2 mL de la solución de 1000 mg Na/L a 20 °C y diluirlos, en matraz aforado, a 200 mL con HNO₃ al 0,5 % y a 20 °C.

$$1 \text{ mL} = 10 \mu\text{g Na}$$

- b. **Soluciones de trabajo:** Cada solución empleada se prepara a partir de la solución madre. Ejemplo: preparación de un patrón de 0,5 mg Na/L, medir cuantitativamente 5 mL de la solución madre a 20 °C y diluirlos, en balón aforado, hasta 100 mL con HNO₃ al 0,5 %. Aforar a 20 °C.

6.3.5 Experimentos de Estandarización

Durante todo el trabajo con soluciones de sodio, tener siempre presente lo descrito en el numeral 5.8.

6.3.5.1 Efecto de la digestión en los patrones

Se siguió el procedimiento de digestión del numeral 5.6.

Tabla 38. Efecto de la digestión en los patrones de sodio.

C (mg Na/L)	Absorbancias	
	Patrones sin Digestión	Patrones con Digestión
0,00	0,024	0,069
0,05	0,023	0,103
0,50	0,198	0,248
1,00	0,379	0,404
1,50	0,539	0,566
2,00	0,674	0,686
3,00	0,895	0,907
4,00	1,054	1,064

Figura 21. Efecto de la digestión en los patrones de sodio.

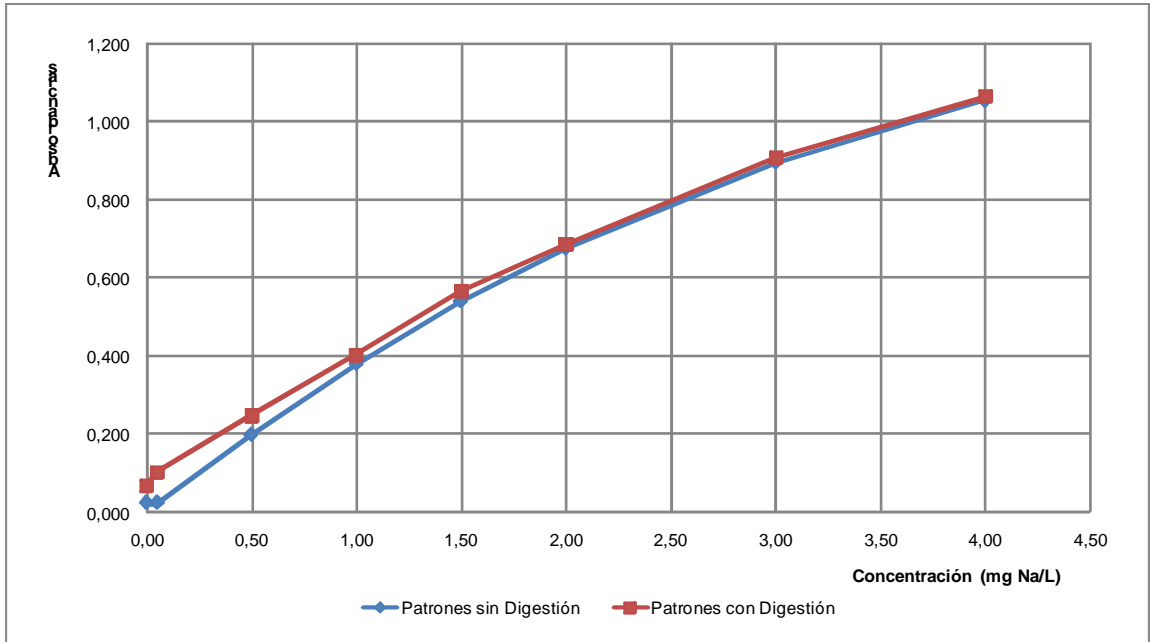
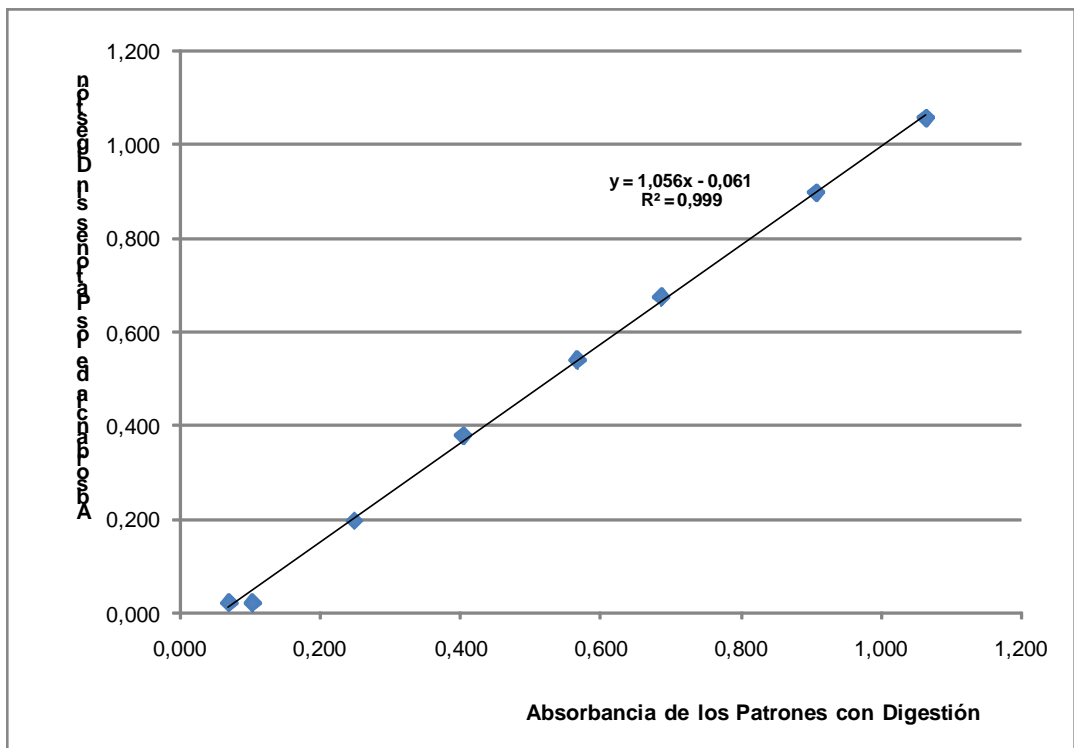


Figura 22. Comparación de absorbancias entre los patrones de sodio con y sin digestión.



Según la ecuación de la recta de la figura 22, las absorbancias de los patrones sin digestión son 1,056 veces más grandes a las que tienen digestión, es decir, 5,6 % mayor. De lo anterior se concluye que para los patrones no es necesaria la digestión.

6.3.5.2 Efecto del buffer de ionización en los patrones

Los patrones no llevan digestión, esta se aplica a las muestras para eliminar la materia orgánica.

El buffer de ionización elimina interferencias químicas en la llama (ver numeral 4.6.4.4 “interferencias químicas”).

Como buffer de ionización se usa una solución de 0,2 % en K⁺ en los patrones.

Tabla 39. Efecto del buffer de ionización en los patrones de sodio.

C (mg/L)	Absorbancias	
	Patrones sin Buffer	Patrones con Buffer
0,00	0,011	0,003
0,05	0,019	0,025
0,50	0,155	0,164
1,00	0,299	0,311
1,50	0,423	0,439
2,00	0,543	0,562
3,00	0,741	0,762
4,00	0,901	0,908

Figura 23. Efecto del buffer de ionización en los patrones de sodio.

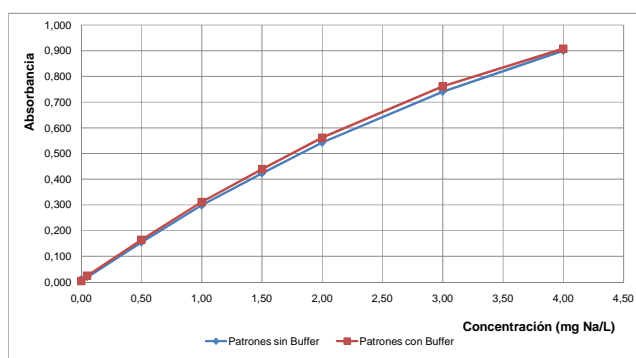
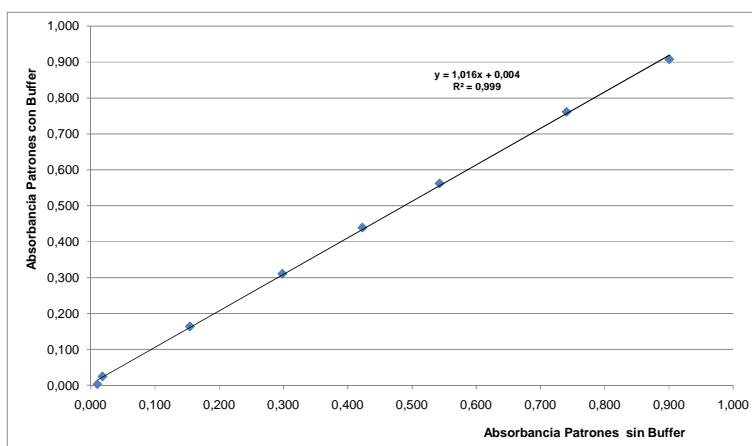


Figura 24. Comparación de absorbancias entre los patrones de sodio con y sin buffer de ionización.



En la figura anterior se observa un aumento de 1,6 % en la absorbancia de los patrones con buffer de ionización comparados con los patrones sin buffer. La diferencia no es significativa. Se establece que no es necesario que los patrones contengan dicho buffer.

6.3.5.3 Establecimiento del rango de linealidad

El Standard Methods establece que para el sodio por aspiración directa a una llama aire/acetileno, el rango de concentración óptimo va desde 0,03 hasta 1 mg Na/L³³.

Los patrones no tienen digestión ni contienen el buffer de ionización.

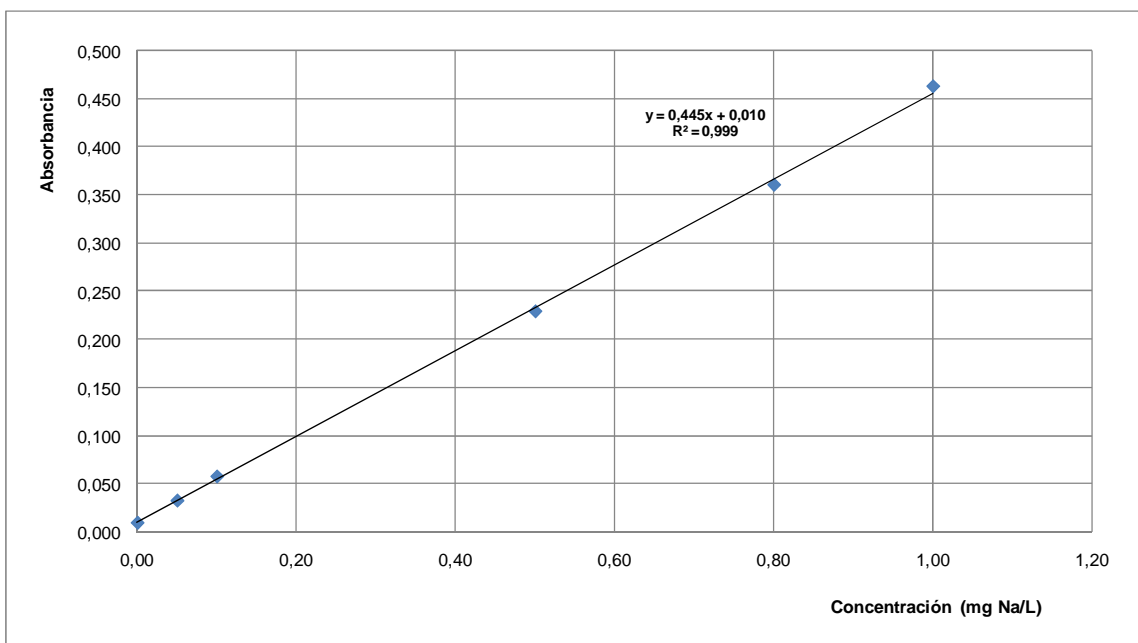
Después de varios ensayos se establece que el mejor rango de linealidad se extiende hasta 1 mg Na/L, como se muestra a continuación:

³³ Ibid., 3-__.

Tabla 40. Datos para establecer rango de linealidad en el análisis de sodio.

Patrón (mg Na/L)	Absorbancia
0,00	0,010
0,05	0,033
0,10	0,058
0,50	0,229
0,80	0,360
1,00	0,462

Figura 25. Curva de calibración para establecer rango de linealidad en el análisis de sodio.

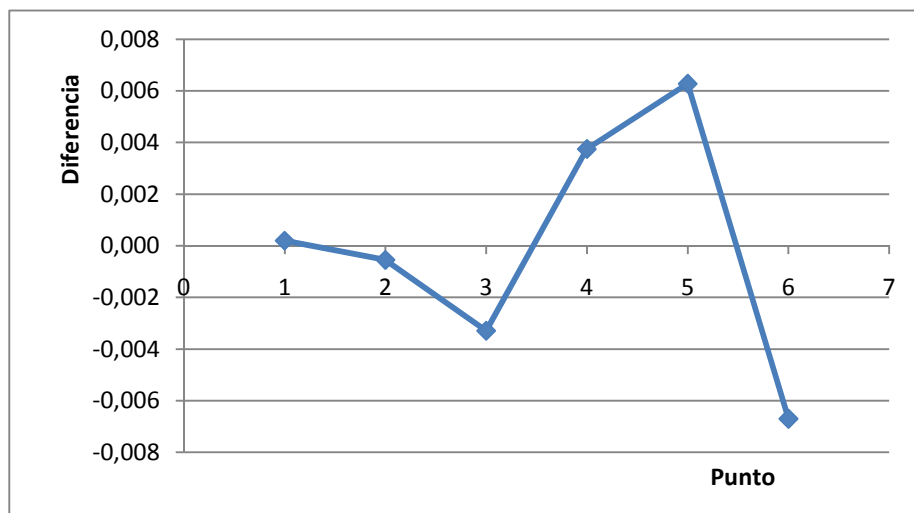


Con los datos de la tabla 40 y la ecuación obtenida en la figura anterior, se hace el Test de Residuales para todos los patrones.

Tabla 41. Test de residuales para linealidad en el análisis de sodio.

Punto	Concentración (mg Na/L)	Absorbancia Experimental	Absorbancia Calculada	Diferencia
1	0,00	0,010	0,010	0,000
2	0,05	0,033	0,032	-0,001
3	0,10	0,058	0,055	-0,003
4	0,50	0,229	0,233	0,004
5	0,80	0,360	0,366	0,006
6	1,00	0,462	0,455	-0,007

Figura 26. Residuales para linealidad en el análisis de sodio.



La distribución de puntos en la figura 26 es uniforme a ambos lados. Ningún punto se puede eliminar.

Con lo anterior se concluye que el rango lineal se extiende hasta 1 mg Na/L. Con esta información se definen los estándares que se van a usar en la validación.

Estándar bajo (E. b) de 0,05 mg Na/L

Estándar medio (E. m) de 0,50 mg Na/L

Estándar alto (E. a) de 0,80 mg Na/L

6.3.6 Experimentos de Validación

Laboratorio: Laboratorio de Química Ambiental (LQA)

Equipo: Espectrómetro de Absorción Atómica SOLAAR 969 ThermoElemental con Llama

Analista: Andrés Mauricio Camacho Orrego

6.3.6.1 Límites de detección y cuantificación

Tabla 42. Datos obtenidos para el E. b en la validación del ensayo de sodio.

Réplica	E. b		
	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 3
	Concentración Teórica: 0,05 mg Na/L		
1	0,0533	0,0414	0,0576
2	0,0472	0,0394	0,0493
3	0,0482	0,0407	0,0476
4	0,0473	0,0432	0,0423
5	0,0539	0,0462	0,0461
6	-	0,0408	0,0496
X_m	0,050	0,042	0,049
s	0,003	0,002	0,005
CV%	6,67	5,77	10,4
E%	-0,04	-16,1	-2,50
LD	0,010	0,007	0,015
LC	0,033	0,024	0,051

Realizando la prueba F para los ensayos de la tabla anterior, se concluye que los ensayos son homogéneos. Esto permite promediar los valores LD y LC.

El límite de detección LD promedio es 0,011 mg Na/L.

El límite de cuantificación LC promedio es 0,036 mg Na/L.

6.3.6.2 Exactitud (expresada como E%)

Tabla 43. Datos obtenidos para el E. m en la validación del ensayo de sodio.

Réplica	E. m			
	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 3	Ens. 4
	Concentración Teórica: 0,50 mg Na/L			
1	0,5252	0,5155	0,5050	0,5039
2	0,5376	0,5059	0,4918	0,5021
3	0,5385	0,5134	0,4920	0,4992
4	0,5448	0,5152	0,4965	0,4951
5	0,5239	0,5176	0,5022	0,5044
6	0,5329	0,5156	0,4987	0,5031
X_m	0,534	0,514	0,498	0,501
s	0,008	0,004	0,005	0,004
CV%	1,52	0,80	1,08	0,71
E%	6,76	2,77	-0,46	0,26

El E% máximo para el E. b en la tabla 42 es de 16,1 % (con signo negativo), mientras que para el E. m y el E. a son de 6,76 y 2,71 % respectivamente (tablas 43 y 44).

Tabla 44. Datos obtenidos para el E. a en la validación del ensayo de sodio.

Réplica	E. a			
	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 3	Ens. 4
	Concentración Teórica: 0,80 mg Na/L			
1	0,7831	0,7829	0,9809	0,7829
2	0,7801	0,7796	0,7885	0,7543
3	0,7808	0,7807	0,7991	0,7454
4	0,7866	0,7921	0,7795	0,7724
5	0,7962	0,8024	0,7943	0,7847
6	0,7943	0,7995	0,7876	1,0087
X_m	0,79	0,79	0,82	0,81
s	0,007	0,010	0,078	0,100
CV%	0,88	1,26	9,53	12,32
E%	-1,64	-1,31	2,71	1,01

6.3.6.3 Precisión

a. Repetibilidad:

CV% máximo para E. b, E. m y E. a de 10,4; 1,52 y 12,32 % respectivamente.

b. Repetibilidad intermedia:

Tabla 45. Datos obtenidos para la repetibilidad intermedia en la validación del ensayo de sodio.

Réplica	Repetibilidad Intermedia	
	C Teórica: 0,50 mg Na/L	
1	0,5258	0,5211
2	0,5132	0,5083
3	0,5093	0,5125
4	0,5173	0,5222
5	0,5097	0,5095
6	0,5120	0,5082
X_m	0,515	0,514
s	0,006	0,006
CV%	1,21	1,25
E%	2,91	2,73

Este ensayo es muy homogéneo. Todas las variables estadísticas son comparables o ligeramente diferentes.

6.3.6.4 Sensibilidad de calibración del método

El “Cook Book” indica una señal: “*un patrón de 1,2 mg Na/L presenta una absorbancia de 0,4*”. Con lo anterior se obtiene una pendiente de 0,3333. Contra este valor comparamos la sensibilidad de calibración que se obtenga.

Tabla 46. Datos de cada curva de calibración construida en la validación del ensayo de sodio.

Sensibilidad de Calibración	Intercepto	R ²
0,3800	0,0144	0,9998
0,3660	0,0096	0,9998
0,3839	0,0099	0,9998
0,3922	0,0042	0,9990
0,4146	0,0064	0,9989
0,4002	0,0098	0,9995
0,4451	0,0102	0,9995
Promedio	0,3974	0,0092
Valor Mínimo	0,3660	0,0042
Valor Máximo	0,4451	0,0144

La sensibilidad promedio obtenida esta conforme al valor sugerido por el Cook Book. Bajo las condiciones de trabajo, la pendiente obtenida es comparable con criterios externos.

6.3.6.5 Recuperación

La muestra real M1 empleada para la validación de sodio fue tomada del afluente de la Planta de Tratamiento de la Universidad Tecnológica de Pereira. Esta se preservó a pH ≤ 2 con HNO₃ y fue refrigerada a 4 °C.

La muestra es filtrada, por lo tanto se determina sodio soluble. Las adiciones fueron de 0,10 mg Na/L para la A. b, correspondiente al 27,0 % aproximadamente, y 0,20 mg Na/L para la A. a, correspondiente al 54,0 % aproximadamente.

En la tabla 47 se recopilan los datos obtenidos para la recuperación.

Se obtuvieron recuperaciones para M1 A. b de 81,9 a 98,6 % y para M1 A. a de 90,2 a 100,5 %.

Tabla 47. Datos obtenidos para la recuperación en la validación del análisis de sodio

Réplica	Ensayo 1		
	Concentración M1 (mg Na/L)	A. b: 0,10 mg Na/L	A. a: 0,20 mg Na/L
1	0,3868	0,4755	0,5513
2	0,3806	0,4759	0,5705
3	0,4019	0,4812	0,5723
4	0,3752	0,4948	0,5927
5	0,4027	0,4744	0,5840
6	0,3769	0,4722	0,5731
X _m	0,387	0,479	0,574
s	0,012	0,008	0,014
CV%	3,16	1,73	2,44
% R	N/A	91,7	93,3
Réplica	Ensayo 2		
	Concentración M1 (mg Na/L)	A. b: 0,10 mg Na/L	A. a: 0,20 mg Na/L
1	0,351	0,4607	0,5619
2	0,3669	0,4591	0,5529
3	0,3589	0,4529	0,5601
4	0,3582	0,456	0,5601
5	0,3579	0,4575	0,5675
6	0,3595	0,4579	0,5553
X _m	0,359	0,457	0,560
s	0,005	0,003	0,005
CV%	1,41	0,59	0,92
% R	N/A	98,6	100,5
Réplica	Ensayo 3		
	Concentración M1 (mg Na/L)	A. b: 0,10 mg Na/L	A. a: 0,20 mg Na/L
1	0,3491	0,5065	0,5425
2	0,3487	0,4404	0,5402
3	0,3478	0,4393	0,5354
4	0,3506	0,4464	0,5363
5	0,3534	0,4163	0,5395
6	0,3435	0,412	0,5365
X _m	0,349	0,443	0,538
s	0,003	0,034	0,003
CV%	0,94	7,64	0,51
% R	N/A	94,6	94,8
Réplica	Ensayo 4		
	Concentración M1 (mg Na/L)	A. b: 0,10 mg Na/L	A. a: 0,20 mg Na/L
1	0,3784	0,4562	0,5478
2	0,382	0,4559	0,5343
3	0,3811	0,4496	0,5575
4	0,3612	0,4604	0,5958
5	0,3674	0,4502	0,5219
6	0,3571	0,4462	0,5526
X _m	0,371	0,453	0,552
s	0,011	0,005	0,025
CV%	2,90	1,16	4,58
% R	N/A	81,9	90,2

6.3.7 Estimación de la Incertidumbre de la Medición

6.3.7.1 Mesurando

Se mide la absorbancia por parte del sodio en una llama aire / acetileno.

6.3.7.2 Modelo matemático

Ver numeral 6.1.7.2.

6.3.7.3 Principio de medición

Ver numeral 6.3.2.

6.3.7.4 Identificación de fuentes de incertidumbre

Las fuentes de incertidumbre están resumidas en la tabla 48.

Tabla 48. Fuentes de incertidumbre para el análisis de sodio.

Procedimiento	Factor Crítico en la Cuantificación	
	Aplica Incertidumbre	No Aplica Incertidumbre
Preparación de la solución madre de 10 mg Na/L	X	
Preparación de las soluciones de trabajo x 5	X	
Construcción de la curva de calibración	X	
Digestión de la muestra	X	

6.3.7.5 Diagrama causa-efecto

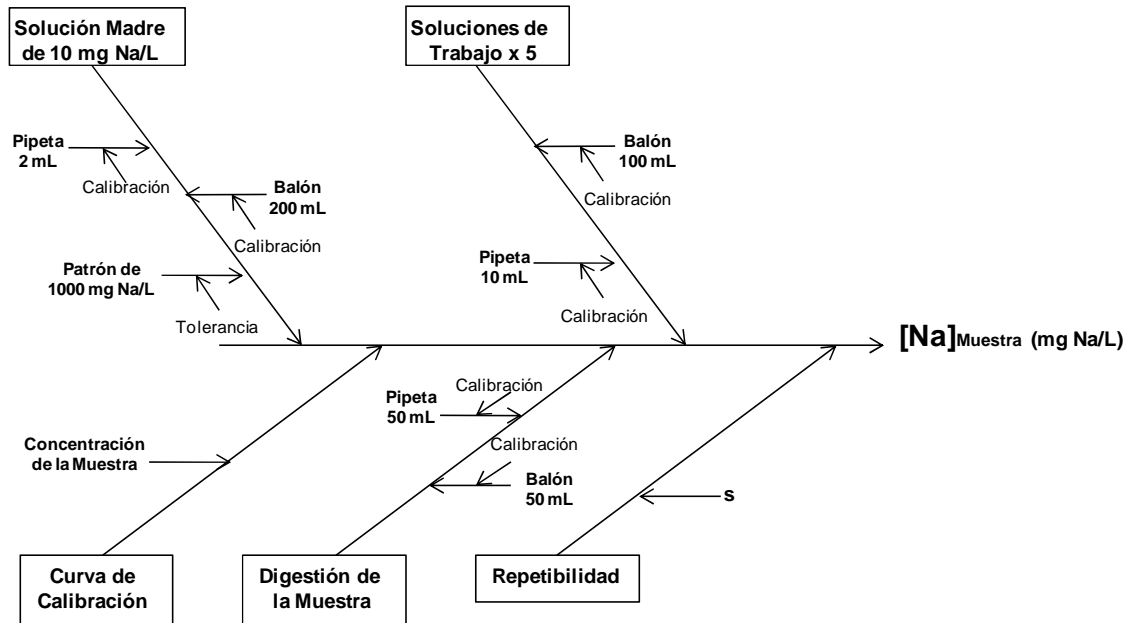
Se deben tener en cuenta las consideraciones hechas para la estimación de la incertidumbre del numeral 5.7. Ver figura 27.

6.3.7.6 Cálculos

La tolerancia del patrón de referencia se encuentra en el anexo F. Para la calibración de pipetas y balones se usan sus tolerancias que se encuentran en el anexo E.

Se omiten unidades.

Figura 27. Diagrama causa-efecto en la estimación de la incertidumbre de la medición en el análisis de sodio.



a. Incertidumbre por la solución madre de 10 mg Na/L, U_{SM} :

$$\frac{U_{(SM)}}{[SM]} = 3,14 * 10^{-3}$$

b. Incertidumbre por las soluciones de trabajo, U_{ST} :

$$\frac{U_{(ST)}}{[ST]} = 6,45 * 10^{-3}$$

c. Incertidumbre por digestión de la muestra, U_{DM} :

$$\frac{U_{(DM)}}{[DM]} = 9,0 * 10^{-4}$$

d. Incertidumbre por repetibilidad, U_R :

Se calcula con ayuda de la desviación estándar \underline{s} más grande obtenida durante la validación, o sea 0,100 mg Na/L. Ver “ensayo 4” tabla 44, E. a.

$$\frac{U_{(R)}}{[R]} = 0,05103$$

e. Incertidumbre por la curva de calibración, U_{CC} :

Se va a usar los datos de la tabla 40 y la figura 25.

La ecuación es $y = 0,445x + 0,010$.

La concentración de la muestra se asumirá de 0,80 mg Na/L

$$s = 2,74 * 10^{-5}$$

$$s_{xx} = 0,902$$

$$U_{(CC)} = 7,22 * 10^{-5}$$

$$\frac{U_{(CC)}}{[CC]} = 9,02 * 10^{-5}$$

f. Incertidumbre estándar combinada en el análisis de sodio

Se toman los aportes de cada fuente de incertidumbre.

$$\frac{U_{(Na)}}{[Na]} = 0,0515$$

g. Expresión de los resultados

- **Incertidumbre estándar combinada**

$$[Na]_{Muestra} = [Na]_{Muestra} \pm (0,0515 * [Na]_{Muestra})$$

- **Incertidumbre expandida**

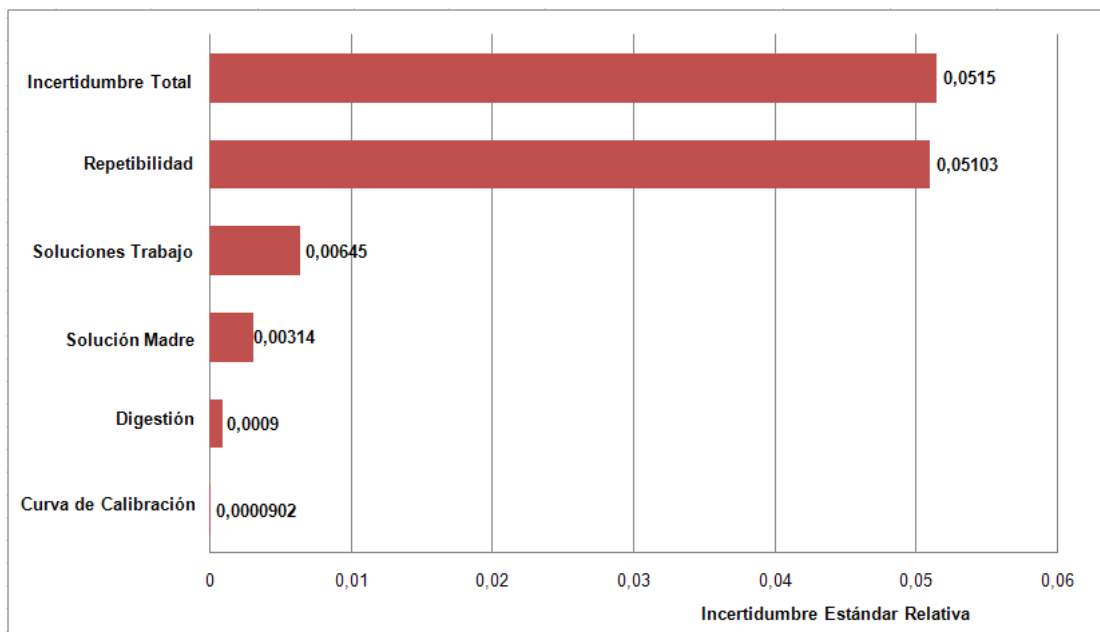
$$[Na]_{Muestra} = [Na]_{Muestra} \pm (0,0515 * [Na]_{Muestra} * 2)$$

$$[Na]_{Muestra} = [Na]_{Muestra} \pm (0,1031 * [Na]_{Muestra})$$

Por ejemplo, para la muestra de 0,80 mg Na/L se expresa así:

$$0,80 \text{ mg Na/L} \pm 0,08 \text{ mg Na/L}$$

Figura 28. Contribuciones a la incertidumbre del análisis de sodio.



6.3.8 Discusión de Resultados

La digestión se encuentra innecesaria en los patrones, pero las muestras con materia orgánica deben ser digeridas para eliminarla y liberar totalmente el sodio. No se puede olvidar el grado de limpieza que trabajar con este metal implica ya que su abundancia en los alrededores propicia la contaminación cruzada.

En cuanto a la necesidad del buffer de ionización de potasio, se comprobó que no hay efecto significativo en las absorbancias de los patrones con el buffer mencionado. En la llama puede ocurrir que cuando la atomización se lleva a cabo, parte de los átomos de sodio son ionizados, lo que ocasiona que la longitud de onda de mayor absorbancia cambie y por ende la absorbancia por parte del sodio con la longitud de onda de trabajo sea menor. A mayor concentración en sodio, mayor es la ionización. El efecto neto de todo lo anterior, es que la curva de calibración se acueste a medida que se avanza en la concentración. Debido a que dicho efecto no se ve en la curva de calibración (figura 25) demuestra que a la magnitud de concentraciones en las que se trabaja la ionización no afecta la curva de calibración de forma significativa.

Bajo las condiciones de trabajo, se reproduce con facilidad la señal que establece el Cook Book para un patrón de sodio determinado.

En la figura 28 “contribuciones a la incertidumbre del análisis de sodio” se observa que la mayor contribución proviene de la repetibilidad debido probablemente a la contaminación cruzada que es muy propicia cuando se trabaja con este metal, y a la sensibilidad del método, pues su escala de operación está por debajo de 1 mg Na/L. La contribución debida a la construcción de la curva de calibración a diferencia de los métodos anteriores, es insignificante comparado con la repetibilidad.

En este método se encuentra otro factor inmerso y es la limpieza. Así como se pide que el agua de dilución este libre del metal a analizar, también es necesario que el material a usar este libre de sodio. El paso del método en el cual la contaminación con sodio se agudiza es en la digestión de muestras, por lo tanto el material necesario para este paso debe estar muy bien lavado. La contaminación cruzada además de afectar la exactitud tiene impacto directo sobre la precisión.

La contribución de la curva de calibración es insignificante debida a su gran estabilidad lo cual se ve reflejado en el coeficiente de determinación.

La incertidumbre expandida de la medición es $0,1031*[Na]$. El límite práctico de cuantificación según el cual la incertidumbre no invalida el límite es 0,40 mg Na/L calculado de la misma forma que en el caso del arsénico.

6.3.9 Conclusiones

- Se estandarizó y validó el método para determinar Na por Espectrometría de Absorción Atómica con llama aire / acetileno.
- **Tabla 49.** Conclusiones acerca de los parámetros de calidad analítica para el método de determinación de sodio.

Parámetro	Resultado
Límite de detección	0,011 mg Na/L
Límite de Cuantificación	0,036 mg Na/L
Límite Práctico de Cuantificación	0,040 mg Na/L
Rango Óptimo de Cuantificación	Desde 0,040 hasta 1,00 mg Na/L
Exactitud	E% máximo de 6,76 %
Precisión	CV% máximo de 10,4 %
Sensibilidad de calibración	0,3974 L/mg Na
Recuperación	Desde 81,9 hasta 100,5 %
Incertidumbre de la Medición	$0,1031*[Na]$

6.3.10 Recomendaciones

- Todos los patrones y soluciones que se usen para este análisis deben prepararse en el agua de mayor calidad disponible.
- Siempre debe tenerse presente la limpieza en la analítica de trazas establecida en el numeral 5.8.

6.3.11 Control de Calidad y Seguimiento de Validación

- Introducir patrones cada cinco muestras cuando se haga un análisis.
- Hacer prueba R & R cada seis meses.
- Verificar el límite de cuantificación cada seis meses.
- Participar en pruebas de desempeño cada año.

6.4 DETERMINACIÓN DE CROMO POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA. 3111 D.

6.4.1 Alcance

Este método es apropiado para determinar el contenido de cromo en aguas naturales (superficiales y subterráneas) y residuales domésticas e industriales por Espectrometría de Absorción Atómica con llama.

6.4.2 Principio

Igual al numeral 6.3.2.

6.4.3 Precauciones de Seguridad

Igual que el numeral 6.3.3.

6.4.4 Preparación de Soluciones de Trabajo

- a. **Solución madre de 100 mg Cr/L:** Medir cuantitativamente 10 mL de la solución de 1000 mg Cr/L a 20 °C y diluirlos, en matraz aforado, a 100 mL con HNO₃ al 0,5 % y a 20 °C.

$$1 \text{ mL} = 100 \mu\text{g Na}$$

- b. **Soluciones de trabajo:** Cada solución empleada se prepara a partir de la solución madre. Ejemplo: preparación de un patrón de 10 mg Cr/L, medir cuantitativamente 10 mL de la solución madre a 20 °C y diluirlos, en balón aforado, hasta 100 mL con HNO₃ al 0,5 %. Aforar a 20 °C.

6.4.5 Experimentos de Estandarización

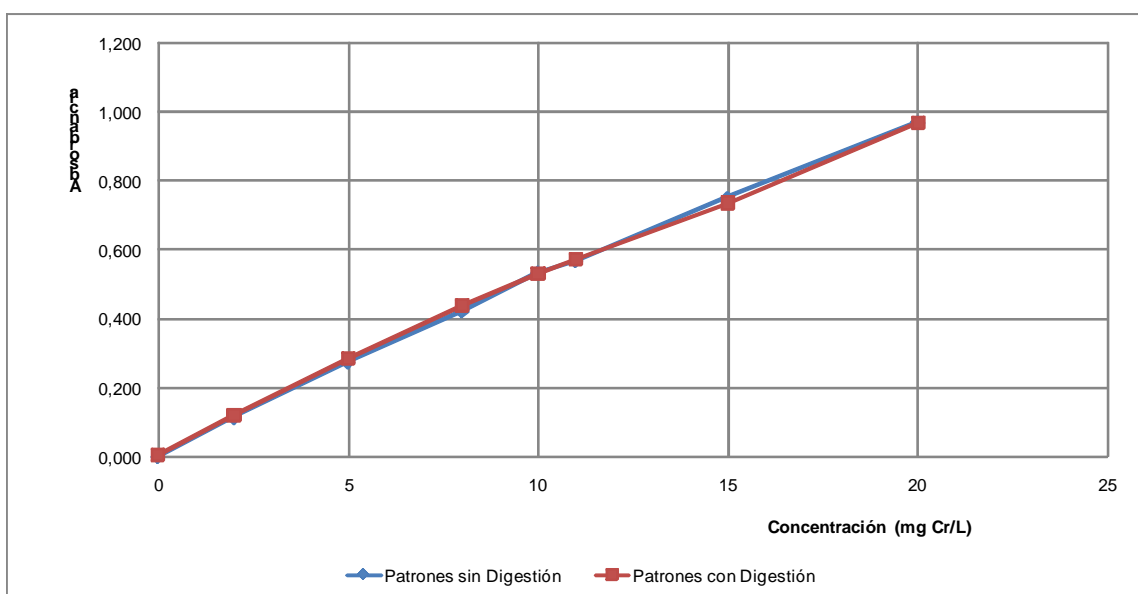
6.4.5.1 Efecto de la digestión en los patrones

Se siguió el procedimiento de digestión del numeral 5.6.

Tabla 50. Efecto de la digestión en los patrones de cromo.

C (mg Cr/L)	Absorbancias	
	Patrones sin Digestión	Patrones con Digestión
0	0,001	0,006
2	0,115	0,120
5	0,276	0,286
8	0,423	0,439
10	0,534	0,530
11	0,569	0,574
15	0,751	0,736
20	0,970	0,968

Figura 29. Efecto de la digestión en los patrones de cromo.



Las absorbancias son muy similares. De la figura 30 se deduce que la absorbancia de los patrones sin digestión es 1,015 veces mayor a los patrones con digestión, es decir, se verifica un aumento de 1,5 %. La diferencia es insignificante, por lo tanto los patrones no llevan digestión.

6.4.5.2 Efecto del buffer de ionización en los patrones

El Standard Methods menciona interferencias por ionización en la llama, las cuales se suprimen por adición de un buffer de ionización de potasio.

Todos los patrones contienen 0,2 % en K⁺.

Figura 30. Comparación de absorbancias de los patrones de cromo con y sin digestión.

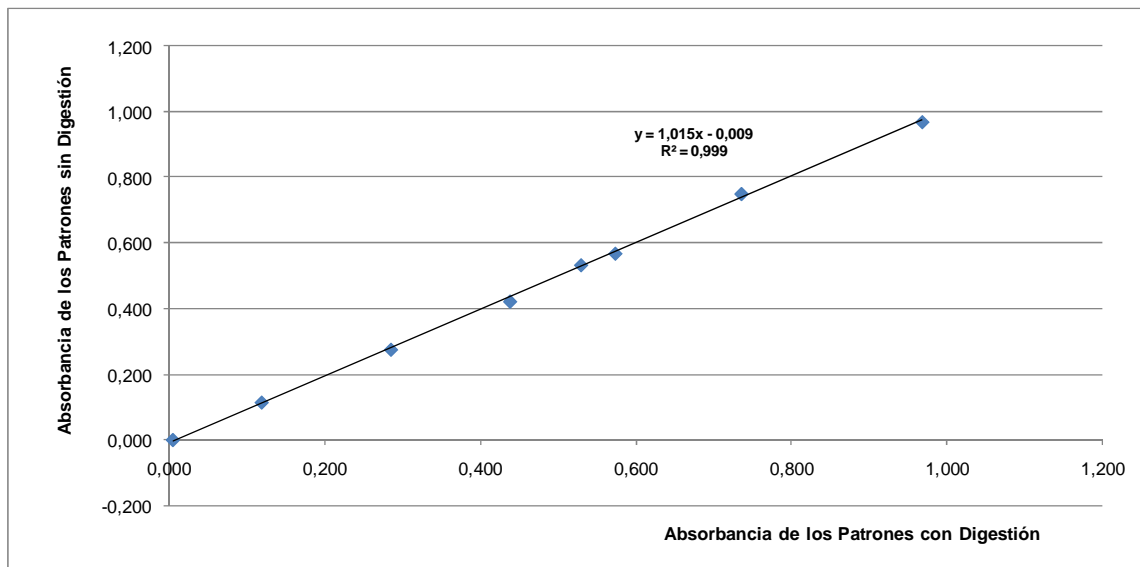


Tabla 51. Efecto del buffer de ionización en los patrones de cromo.

C (mg Cr/L)	Absorbancias	
	Patrones sin Buffer	Patrones con Buffer
0	-0,001	-0,005
2	0,101	0,106
5	0,251	0,281
8	0,393	0,444
10	0,491	0,525
11	0,533	0,576
15	0,711	0,779
20	0,915	1,002

De la figura 32 se observa un aumento de 9,5 % en la absorbancia de los patrones con buffer de ionización en comparación con los patrones sin buffer. Hay una diferencia apreciable, sin embargo se puede despreciar ya que el mayor efecto se ve en los patrones más concentrados, mientras que en el rango bajo no hay cambios que contribuyan a la disminución en el límite de cuantificación. Por lo tanto, ni patrones ni muestras llevarán buffer de ionización.

El ión potasio es el buffer de ionización, y este puede estar en forma natural en la muestra, eliminando por consiguiente la ionización en la llama. Debido a lo anterior y para la siguiente actividad, en la estandarización se despreciarán aquellos patrones cuya absorbancia sea mayor a 0,8 para evitar sesgos en la medición.

Figura 31. Efecto del buffer de ionización en los patrones de cromo.

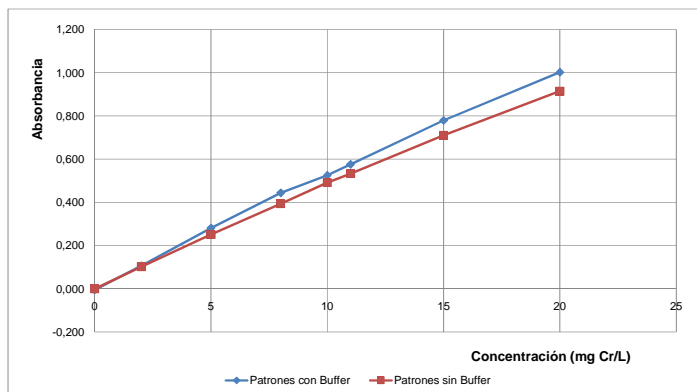
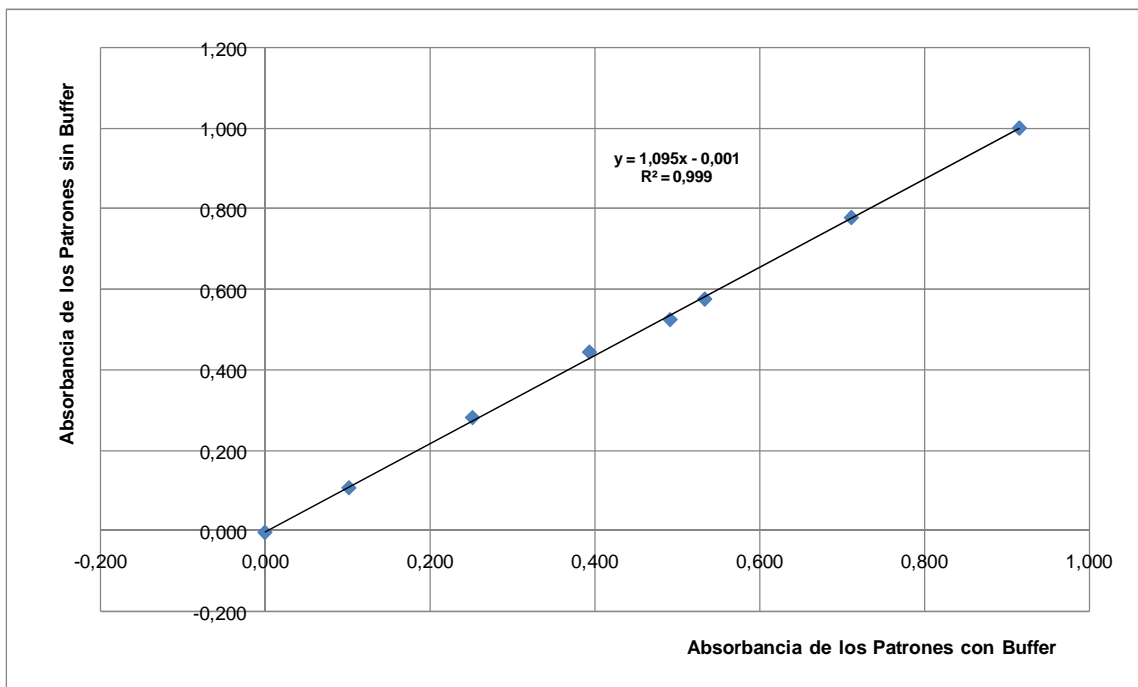


Figura 32. Comparación de absorbancias entre los patrones de Cromo con y sin buffer de ionización.



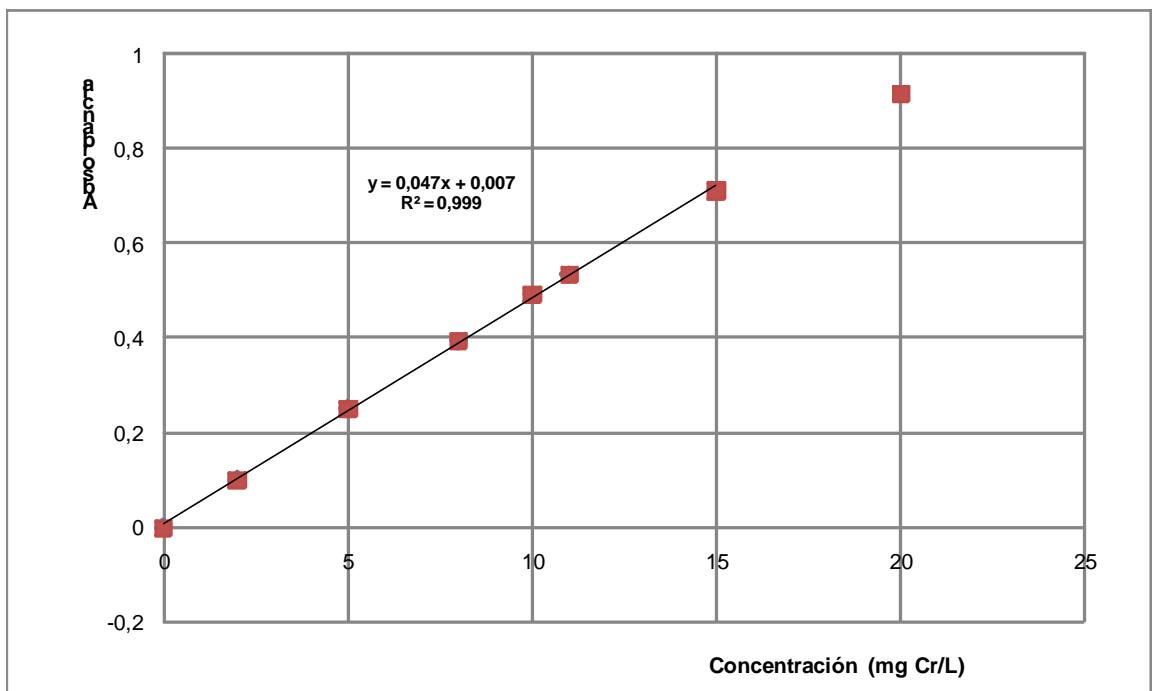
6.4.5.3 Establecimiento del rango de linealidad

El Standard Methods establece que para el cromo por aspiración directa a una llama aire/acetileno, el rango de concentración óptimo va desde 0,2 hasta 10 mg Cr/L³⁴. Para el caso presente, la llama que se está usando es de óxido nítrico / acetileno. Los patrones no tienen digestión ni contienen el buffer de ionización.

Tabla 52. Datos para establecer rango de linealidad en el análisis de cromo.

Patrón (mg Cr/L)	Absorbancia
0	-0,001
2	0,101
5	0,251
8	0,393
10	0,491
11	0,533
15	0,711
20	0,915

Figura 33. Curva de calibración para establecer rango de linealidad en el análisis de cromo.



³⁴ Ibid., 3-__.

La ecuación obtenida en la figura 31, fue construida sin incluir el patrón de 20 mg Cr/L por tener una absorbancia mayor a 0,8. Por el ajuste de 0,999 obtenido y las experiencias con los otros ensayos, no se hace el Test de Residuales.

Se determina el rango de trabajo hasta 15 mg Cr/L. Con esta información se definen los estándares que se van a usar en la validación.

Estándar bajo (E. b) de 0,5 mg Cr/L

Estándar medio (E. m) de 7 mg Cr/L

Estándar alto (E. a) de 11 mg Cr/L

6.4.6 Experimentos de Validación

Laboratorio: Laboratorio de Química Ambiental (LQA)

Equipo: Espectrómetro de Absorción Atómica SOLAAR 969 ThermoElemental con Llama

Analista: Andrés Mauricio Camacho Orrego

6.4.6.1 Límites de detección y cuantificación

Tabla 53. Datos obtenidos para el E. b en la validación del ensayo de cromo.

Réplica	E. b		
	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 3
	Concentración Teórica: 0,5 mg Cr/L		
1	0,4254	0,5047	0,4556
2	0,4349	0,4984	0,4715
3	0,4367	0,5132	0,4761
4	0,4337	0,5062	0,4836
5	0,4434	0,5111	0,4698
6	0,4397	0,5103	0,4662
X _m	0,44	0,51	0,47
s	0,006	0,005	0,009
CV%	1,40	1,06	2,01
E%	-12,9	1,46	-5,91
LD	0,018	0,016	0,028
LC	0,061	0,054	0,094

El límite de detección LD promedio es 0,021 mg Cr/L.

El límite de cuantificación LC promedio es 0,070 mg Cr/L.

Se hace otro ensayo para confirmar el LD y el LC usando un patrón de 0,2 mg Cr/L.

Tabla 54. Ensayo adicional para confirmar el LD y el LC.

Réplica	C _{Teórica} : 0,2 mg Cr/L
1	0,1398
2	0,1296
3	0,1348
4	0,1275
5	0,1269
6	0,1216
X _m	0,13
s	0,006
CV%	4,93
E%	-35,0
LD	0,019
LC	0,064

La tabla anterior confirma que no se puede cuantificar con buena exactitud aunque la precisión esté dentro de los parámetros establecidos. Sin embargo, el límite de cuantificación para este ensayo, 0,064 mg Cr/L, respalda el valor obtenido previamente. Por lo tanto, se establece que:

LD: 0,021 mg Cr/L

LC: 0,070 mg Cr/L

6.4.6.2 Exactitud (expresada como E%)

Tabla 55. Datos obtenidos para el E. m en la validación del ensayo de cromo.

Réplica	E. m			
	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 3	Ens. 4
	Concentración Teórica: 7 mg Cr/L			
1	7,1891	6,9676	7,2774	6,9790
2	7,2124	7,1201	7,3127	7,0867
3	7,2612	7,1548	7,3303	7,1203
4	7,1011	6,9429	7,3065	7,1472
5	7,1520	6,7976	7,3693	7,1440
6	7,2372	6,7998	7,3636	6,9595
X _m	7,19	6,96	7,33	7,07
s	0,059	0,152	0,035	0,083
CV%	0,81	2,19	0,48	1,18
E%	2,75	-0,52	4,67	1,04

Los E% máximos son:

E. b 12,9 % (con signo negativo)

E. m 4,67 %
 E.a 4,49 %

Tabla 56. Datos obtenidos para el E. a en la validación del ensayo de cromo.

Réplica	E. a			
	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 3	Ens. 4
	Concentración Teórica: 11 mg Cr/L			
1	11,3394	10,7230	11,3387	10,8522
2	11,4040	10,7101	11,4179	10,8782
3	11,4630	10,7924	11,4983	10,9679
4	11,5640	10,8589	11,4393	10,9420
5	11,6127	10,7661	11,3527	10,7642
6	11,5785	10,3989	11,2302	10,5373
X_m	11,49	10,71	11,38	10,82
s	0,109	0,161	0,094	0,158
CV%	0,95	1,50	0,82	1,46
E%	4,49	-2,65	3,45	-1,60

6.4.6.3 Precisión

a. Repetibilidad:

CV% máximos:

E. b 2,01 %
 E. m 2,19 %
 E. a 1,50 %

b. Repetibilidad intermedia:

Tabla 57. Datos obtenidos para la repetibilidad intermedia en la validación del ensayo de cromo.

Réplica	Repetibilidad Intermedia	
	C Teórica: 7 mg Cr/L	
1	6,9261	6,8734
2	6,8774	6,7848
3	6,9335	6,7696
4	6,9628	6,7581
5	6,9512	6,7254
6	7,2688	6,9726
X_m	6,99	6,81
s	0,141	0,092
CV%	2,02	1,35
E%	-0,19	-2,66

El ensayo fue homogéneo e igual estadísticamente.

6.4.6.4. R & R

Analista: Diana Lucina Hincapié Marín

Tabla 58. R & R para el análisis de cromo.

Réplica	Repetibilidad y Reproducibilidad
	$C_{\text{Teórica}}: 7 \text{ mg Cr/L}$
1	7,2440
2	7,2524
3	7,2854
4	7,2601
5	7,3276
6	7,2075
X_m	7,26
s	0,041
CV%	0,56
E%	3,75

6.4.6.5 Sensibilidad de calibración del método

El “Cook Book” indica una señal: “*un patrón de 4,5 mg Cr/L presenta una absorbancia de 0,4*”. Con lo anterior se obtiene una pendiente de 0,0889.

Tabla 59. Datos de cada curva de calibración construida en la validación del ensayo de cromo.

Sensibilidad de Calibración	Intercepto	R^2
0,0463	0,0033	0,9994
0,0463	0,0030	0,9992
0,0451	0,0138	0,9996
0,0494	0,0010	0,9995
0,0501	0,0029	0,9997
0,0498	0,0016	0,9998
Promedio	0,0478	0,9995
Valor Mínimo	0,0451	0,9992
Valor Máximo	0,0501	0,9998

Bajo las condiciones de trabajo no se está reproduciendo la señal sugerida por el Cook Book, ya que la sensibilidad de calibración obtenida en promedio es mucho más baja que la calculada con lo sugerido por él. Sin embargo, este valor queda establecido para el laboratorio.

6.4.6.6 Recuperación

La muestra real M1 empleada para la validación de cromo fue un agua residual industrial. Esta se preservó a $\text{pH} \leq 2$ con HNO_3 y fue refrigerada a $4\text{ }^\circ\text{C}$.

La muestra requiere digestión. Las adiciones fueron de $0,8\text{ mg Cr/L}$ para la A. b, correspondiente al 35% aproximadamente, y $1,6\text{ mg Cr/L}$ para la A. a, correspondiente al $65,0\%$ aproximadamente.

Tabla 60. Datos obtenidos para la recuperación en la validación del análisis de cromo.

Réplica	Ensayo 1		
	Concentración M1 (mg Cr/L)	A. b: $0,8\text{ mg Cr/L}$	A. a: $1,6\text{ mg Cr/L}$
1	1,9448	2,7789	3,1394
2	1,9826	2,8303	2,9294
3	2,0052	2,7206	2,8436
4	1,9928	2,6964	2,9523
5	1,9759	2,6067	2,9673
6	2,0225	2,6019	3,0538
X_m	1,99	2,71	2,98
s	0,027	0,091	0,103
CV%	1,34	3,38	3,45
% R	N/A	89,81	62,10
Réplica	Ensayo 2		
	Concentración M1 (mg Cr/L)	A. b: $0,8\text{ mg Cr/L}$	A. a: $1,6\text{ mg Cr/L}$
1	2,1985	2,9763	3,7412
2	2,2188	2,8991	3,7545
3	2,3020	2,9167	3,8599
4	2,2200	2,8859	3,8648
5	2,1969	2,8894	3,6947
6	2,1652	2,8894	3,6809
X_m	2,22	2,91	3,77
s	0,046	0,035	0,080
CV%	2,08	1,19	2,11
% R	N/A	86,57	96,82
Réplica	Ensayo 3		
	Concentración M1 (mg Cr/L)	A. b: $0,8\text{ mg Cr/L}$	A. a: $1,6\text{ mg Cr/L}$
1	2,0484	2,9923	3,7136
2	2,0693	2,7626	3,7860
3	2,0675	2,9165	3,7523
4	2,1581	2,9330	3,6227
5	2,1532	2,9275	3,6267
X_m	2,10	2,91	3,70
s	0,052	0,086	0,074
CV%	2,48	2,95	1,99
% R	N/A	100,9	100,1

Se obtuvieron recuperaciones para M1 A. b de $86,6$ a $100,9\%$ y para M1 A. a de $62,1$ a $100,1\%$.

6.4.7 Estimación de la Incertidumbre de la Medición

6.4.7.1 Mesurando

Se mide la absorbancia por parte del cromo en una llama óxido nitroso / acetileno.

6.4.7.2 Modelo matemático

Ver numeral 6.1.7.2.

6.4.7.3 Principio de medición

Ver numeral 6.3.2.

6.4.7.4 Identificación de fuentes de incertidumbre

Las fuentes de incertidumbre están resumidas en la tabla 61.

Tabla 61. Fuentes de incertidumbre para el análisis de cromo.

Procedimiento	Factor Crítico en la Cuantificación	
	Aplica Incertidumbre	No Aplica Incertidumbre
Preparación de la solución madre de 100 mg Cr/L	X	
Preparación de las soluciones de trabajo x 5	X	
Construcción de la curva de calibración	X	
Digestión de la muestra	X	

6.4.7.5 Diagrama causa-efecto

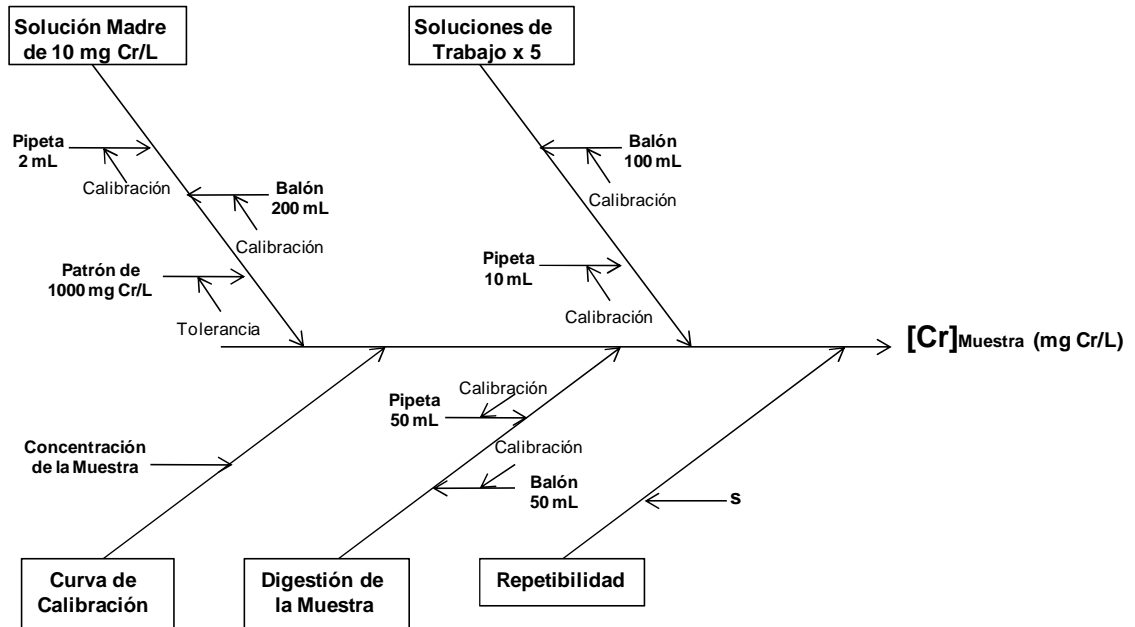
Se deben tener en cuenta las consideraciones hechas para la estimación de la incertidumbre del numeral 5.7. Ver figura 34.

6.4.7.6 Cálculos

La tolerancia del patrón de referencia se encuentra en el anexo F. Para la calibración de pipetas y balones se usan sus tolerancias que se encuentran en el anexo E.

Se omiten unidades.

Figura 34. Diagrama causa-efecto en la estimación de la incertidumbre de la medición en el análisis de cromo.



a. Incertidumbre por la solución madre de 100 mg Cr/L, U_{SM} :

$$\frac{U_{(SM)}}{[SM]} = 3,14 * 10^{-3}$$

b. Incertidumbre por las soluciones de trabajo, U_{ST} :

$$\frac{U_{(ST)}}{[ST]} = 1.29 * 10^{-3}$$

c. Incertidumbre por digestión de la muestra, U_{DM} :

$$\frac{U_{(DM)}}{[DM]} = 9,0 * 10^{-4}$$

d. Incertidumbre por repetibilidad, U_R :

Se calcula con ayuda de la desviación estándar \underline{s} más grande obtenida durante la validación, o sea 0,161 mg Cr/L. Ver “ensayo 2” tabla 56, E. a.

$$\frac{U_{(R)}}{[R]} = 5,98 * 10^{-3}$$

e. Incertidumbre por la curva de calibración, U_{CC} :

Se van a usar los datos de la tabla 52 y la figura 33 excluyendo el patrón de 20 mg Cr/L.

La ecuación es $y = 0,047x + 0,007$.

La concentración de la muestra se asumirá de 8 mg Cr/L.

$$s = 0,01023$$

$$s_{xx} = 167,429$$

$$U_{(CC)} = 0,1725$$

$$\frac{U_{(CC)}}{[CC]} = 0,0216$$

f. Incertidumbre estándar combinada en el análisis de sodio

Se toman los aportes de cada fuente de incertidumbre.

$$\frac{U_{(Cr)}}{[Cr]} = 0,0226$$

g. Expresión de los resultados

- **Incertidumbre estándar combinada**

$$[Cr]_{\text{Muestra}} = [Cr]_{\text{Muestra}} \pm (0,0226 * [Cr]_{\text{Muestra}})$$

- **Incertidumbre expandida**

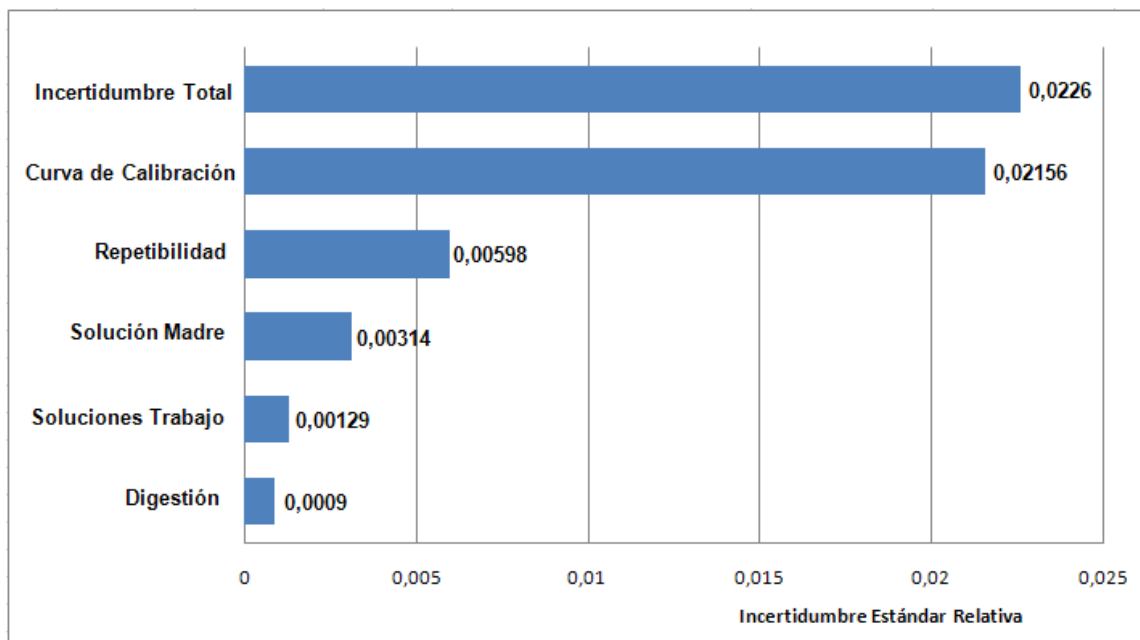
$$[Cr]_{\text{Muestra}} = [Cr]_{\text{Muestra}} \pm (0,0226 * [Cr]_{\text{Muestra}} * 2)$$

$$[Cr]_{\text{Muestra}} = [Cr]_{\text{Muestra}} \pm (0,0453 * [Cr]_{\text{Muestra}})$$

Por ejemplo, para la muestra de 8 mg Cr/L se expresa así:

8,00 mg Cr/L \pm 0,36 mg Cr/L

Figura 35. Contribuciones a la incertidumbre del análisis de cromo.



6.4.8 Discusión de Resultados

No es necesario digerir los patrones, pero en las muestras es un paso imprescindible ya que elimina materia orgánica. Aunque el buffer de ionización incrementa la sensibilidad hasta un 10 % esta se excluye.

En la figura 35 “contribuciones a la incertidumbre del análisis de cromo” se observa que la mayor contribución proviene de la curva de calibración; a la hora de construir la curva es de gran importancia para la incertidumbre lograr un ajuste mayor a 0,999.

La incertidumbre expandida de la medición es $0,0453 \cdot [\text{Cr}]$. El límite práctico de cuantificación según el cual la incertidumbre no invalida el límite es 0,073 mg Cr/L.

6.4.9 Conclusiones

- Se estandarizó y validó el método para determinar Cr por Espectrometría de Absorción Atómica con llama óxido nitroso / acetileno.

- **Tabla 62.** Conclusiones acerca de los parámetros de calidad analítica para el método de determinación de cromo.

Parámetro	Resultado
Límite de detección	0,021 mg Cr/L
Límite de Cuantificación	0,070 mg Cr/L
Límite Práctico de Cuantificación	0,073 mg Cr/L
Rango Óptimo de Cuantificación	Desde 0,073 hasta 15 mg Cr/L
Exactitud	E% máximo de 5,91 %
Precisión	CV% máximo de 4,43 %
Sensibilidad de calibración	0,0478 L/mg Cr
Recuperación	Desde 62,1 hasta 100,9 %
Incertidumbre de la Medición	0,0453*[Cr]

6.4.10 Control de Calidad y Seguimiento de Validación

- Introducir patrones cada cinco muestras cuando se haga un análisis.
- Hacer prueba R & R cada seis meses.
- Verificar el límite de cuantificación cada seis meses.
- Participar en pruebas de desempeño cada año.

BIBLIOGRAFÍA

BROEKAERT, José A. C. Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas. Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 2002. ISBN 3-527-30146-1.

GREEN, J. Mark. A Practical Guide to Analytical Method Validation. En: Analytical Chemistry. 68 (may, 1996); 305A-309A.

HARVEY, David. Modern Analytical Chemistry. USA: McGraw-Hill Higher Education, 2000. ISBN 0-07-237547-7.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Requisitos Generales Para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración. Geneva: ISO, 2005, 29 p. (NTC/ISO/IEC 17025:2005).

KENKEL, John. A Primer on Quality in the Analytical Laboratory. USA: National Science Foundation, 2000. ISBN 1-566-70516-9.

La Importancia de la Validación. En: Técnicas de Laboratorio. No 269 (2002); p. 110 – 111.

La Práctica de las Curvas de Calibración. Departamento de Metrología, Mol Labs Ltda. [en línea] <http://www.mollabs.com/desarrollo>

RIUS, F. Xavier. MAROTO, Alicia. BOQUÉ, Ricard. RIU, Jordi. La Validación de Métodos Analíticos. En: Técnicas de Laboratorio. No 252 (2000); p. 382 – 385.

SECRETARÍA DE SALUD DE BOGOTÁ. Estandarización de Metodologías Analíticas en el Laboratorio de Salud Pública. Bogotá: Secretaría de Salud de Bogotá, 2002. 10 p.

SKOOG, Douglas A. HOLLER, F. James. NIEMAN, Timothy A. Principios de Análisis Instrumental. Quinta Edición. Madrid: McGraw-Hill / Interamericana España, S. A. U., 2001.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER & WASTEWATER. 21st Edition. USA: APHA, AWWA, WEF, 2005. ISBN 0-87553-047-8.

TORRENEGRA, Rubén Darío. Introducción al Análisis Químico Moderno. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, 1990.

ANEXOS

Anexo A. Contraste estadístico de los datos del E. b para la validación del ensayo de arsénico usando el programa ProControl®.

ProControl® V. 3.1b para Excel 8.0 y Excel 2000 Seguridad estad.: 95% Probab. de error.: 5%		Licencia para: Prof. Dr. Bertram Nagel • Beta-Version • Revisi			
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
		3 µg/L	3 µg/L	3 µg/L	3 µg/L
Valores de Y No.	1	3,0171	3,0121	3,2199	3,1889
	2	3,1082	3,069	3,0856	3,1654
	3	3,2389	3,1438	3,2865	3,3554
	4	3,0405	3,2875	3,1278	3,2862
	5	3,2704	3,6355	3,2712	3,2142
	6	3,1137	3,1594	3,2777	3,3498
	7				
	8				
	9				
	10				
No. de valores valid.:		6	6	6	6
Media:		3,13147	3,21788	3,21145	3,25998
Desviación estándar:		0,10301	0,2248	0,08544	0,08241
Coef. de variación [%]:		3,29%	6,99%	2,66%	2,53%
1. Prueba de Grubbs (sospecha de 1 (!) valor anómalo), α=0,01					
Resultado :					
Pos. del val. anóm.:					
Aviso :					
P= 95%		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
Matriz de prueba F	X ₁	[1,1]			
	X ₂		[1,2]		
	X ₃			[1,3]	
	X ₄				[1,4]
	X ₅		[2,2]	inhomogéneo	inhomogéneo
	X ₆			[3,3]	[3,4]
	X ₇				[4,4]
	X ₈				
	X ₉				
	X ₁₀				
	X ₁₁				
	X ₁₂				
	X ₁₃				
	X ₁₄				
Leyenda: Prueba de F: Serie de datos A con B [se [A,B]: Resultado de la prueba: no Inhomogéneo: Varianzas en A y B difiere -/-: prueba no ejecutada / no po					
P= 95%		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
Matriz de prueba t	X ₁	[1,1]			
	X ₂		[1,2]		desigual
	X ₃			[1,3]	
	X ₄				[2,4] *)
	X ₅		[2,2]	[2,3] *)	[3,4]
	X ₆			[3,3]	[4,4]
	X ₇				
	X ₈				
	X ₉				
	X ₁₀				
	X ₁₁				
	X ₁₂				
	X ₁₃				
	X ₁₄				
Leyenda: Prueba de t: Serie de datos A con B [se [A,B]: Resultado de la prueba: no hay desigual: Las medias en A y B difieren s *) : Resultado de la prueba t, si las -/-: prueba no ejecutada / no posib					

Anexo B. Contraste estadístico de los datos del E. m para la validación del ensayo de arsénico usando el programa ProControl®.

Licencia para: Prof. Dr. Bertram Nagel • Beta-Version • Revisión					
ProControl® V. 3.1b para Excel 8.0 y Excel 2000 Seguridad estad.: 95% Probab. de error.: 5%					
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	
	10 µg/L	10 µg/L	10 µg/L	10 µg/L	
Valores de Y No.	1	10,7159	10,1342	10,4542	10,3485
	2	10,0305	10,025	10,1899	10,2478
	3	9,9872	9,8608	10,1156	10,2392
	4	9,9599	10,0107	9,9516	10,282
	5	10,3784	10,1795	9,7814	10,3661
	6	10,1467	10,1852	9,8403	9,8598
	7				
	8				
	9				
	10				
No. de valores valid.:	6	6	6	6	
Media:	10,2031	10,0659	10,0555	10,2239	
Desviación estándar:	0,29408	0,12537	0,25015	0,18574	
Coef. de variación [%]:	2,88%	1,25%	2,49%	1,82%	
1. Prueba de Grubbs (sospecha de 1 (!) valor anómalo), α=0,01					
Resultado:				Si!	
Pos. del val. anóm.:				6	
Aviso:					
Matriz de prueba F	P= 95%	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
	X ₁	[1,1]	inhomogéneo	[1,3]	[1,4]
	X ₂		[2,2]	[2,3]	[2,4]
	X ₃			[3,3]	[3,4]
	X ₄				[4,4]
	X ₅				
	X ₆				
	X ₇				
	X ₈				
	X ₉				
	X ₁₀				
	X ₁₁				
	X ₁₂				
	X ₁₃				
	X ₁₄				
Leyenda: Prueba de F: Serie de datos A con B [se [A,B]: Resultado de la prueba: no Inhomogéneo: Varianzas en A y B difiere -/-: prueba no ejecutada / no po					
Matriz de prueba t	P= 95%	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
	X ₁	[1,1]	[1,2]*)	[1,3]	[1,4]
	X ₂		[2,2]	[2,3]	[2,4]
	X ₃			[3,3]	[3,4]
	X ₄				[4,4]
	X ₅				
	X ₆				
	X ₇				
	X ₈				
	X ₉				
	X ₁₀				
	X ₁₁				
	X ₁₂				
	X ₁₃				
	X ₁₄				
Leyenda: Prueba de t: Serie de datos A con B [se [A,B]: Resultado de la prueba: no hay desigual: Las medias en A y B difieren s *) : Resultado de la prueba t, si las -/-: prueba no ejecutada / no posibil					

Anexo C. Contraste estadístico de los datos del E. a para la validación del ensayo de arsénico usando el programa ProControl®.

Licencia para: Prof. Dr. Bertram Nagel • Beta-Version • Revisión					
ProControl® V. 3.1b para Excel 8.0 y Excel 2000 Seguridad estad.: 95% Probab. de error.: 5%					
	X₁	X₂	X₃	X₄	
	14 µg/L	14 µg/L	14 µg/L	14 µg/L	
Valores de Y No.	1	13,8138	13,6853	14,2636	14,0875
	2	12,9101	13,5632	14,3909	14,1496
	3	12,9801	13,6991	14,425	14,2834
	4	12,9634	13,6971	14,4023	14,3263
	5	12,9452	13,6075	14,479	14,2795
	6	12,9938	13,5838	14,5873	14,5817
	7				
	8				
	9				
	10				
No. de valores valid.:	6	6	6	6	
Media:	13,10107	13,63933	14,42468	14,28467	
Desviación estándar:	0,35038	0,06151	0,10676	0,17153	
Coef. de variación [%]:	2,67%	0,45%	0,74%	1,20%	
1. Prueba de Grubbs (sospecha de 1 (!) valor anómalo), α=0,01					
Resultado : Si !					
Pos. del val. anóm.: 1					
Aviso :					
Matriz de prueba F	P= 95%	X₁	X₂	X₃	X₄
	X ₁	[1,1]	inhomogéneo	inhomogéneo	[1,4]
	X ₂		[2,2]	[2,3]	inhomogéneo
	X ₃			[3,3]	[3,4]
	X ₄				[4,4]
	X ₅				
	X ₆				
	X ₇				
	X ₈				
	X ₉				
	X ₁₀				
	X ₁₁				
	X ₁₂				
	X ₁₃				
	X ₁₄				
Leyenda: Prueba de F: Serie de datos A con B [se [A,B]: Resultado de la prueba: no Inhomogéneo: Varianzas en A y B difiere -/-: prueba no ejecutada / no po					
Matriz de prueba t	P= 95%	X₁	X₂	X₃	X₄
	X ₁	[1,1]	desigual *)	desigual *)	desigual
	X ₂		[2,2]	desigual	desigual *)
	X ₃			[3,3]	[3,4]
	X ₄				[4,4]
	X ₅				
	X ₆				
	X ₇				
	X ₈				
	X ₉				
	X ₁₀				
	X ₁₁				
	X ₁₂				
	X ₁₃				
	X ₁₄				
Leyenda: Prueba de t: Serie de datos A con B [se [A,B]: Resultado de la prueba: no hay desigual: Las medias en A y B difieren s *) : Resultado de la prueba t, si las -/-: prueba no ejecutada / no posib					

Anexo D. Contraste estadístico de los datos de la repetibilidad intermedia (R I) y la repetibilidad y reproducibilidad (R & R) para la validación del ensayo de arsénico usando el programa ProControl®.

Licencia para: Prof. Dr. Bertram Nagel • Beta-V				
ProControl® V. 3.1b para Excel 9.0 y Excel 2000 Seguridad estad.: 95% Probab. de error.: 5%				
	X₁	X₂	X₃	
	10µg/L (R&R)	10µg/L (R I)	10µg/L (R I)	
Valores de Y No.	1	10,2774	10,0798	9,9588
	2	10,1641	9,9273	9,9855
	3	10,4925	10,04	10,1715
	4	10,6567	10,3106	10,249
	5	10,3056	10,1489	10,1191
	6	10,0935	10,1007	9,8731
	7			
	8			
	9			
	10			
No. de valores valid.:	6	6	6	
Media:	10,33163	10,10122	10,0595	
Desviación estándar:	0,20973	0,12694	0,14309	
Coef. de variación [%]:	2,03%	1,26%	1,42%	
1. Prueba de Grubbs (sospecha de 1 (!) valor anómalo), c				
Resultado :				
Pos. del val. anóm.:				
Aviso :				
P= 95%				
Matriz de prueba F	X ₁	[1,1]	[1,2]	[1,3]
	X ₂		[2,2]	[2,3]
	X ₃			[3,3]
	X ₄			
	X ₅			
	X ₆			
	X ₇			
	X ₈			
	X ₉			
	X ₁₀			
	X ₁₁			
	X ₁₂			
	X ₁₃			
	X ₁₄			
Leyenda: Prueba de F: Serie de datos A [A;B]: Resultado de la prueba de F Inhomogéneo: Varianzas en A y B -/-: prueba no ejecutada				
P= 95%				
Matriz de prueba t	X ₁	[1,1]	desigual	desigual
	X ₂		[2,2]	[2,3]
	X ₃			[3,3]
	X ₄			
	X ₅			
	X ₆			
	X ₇			
	X ₈			
	X ₉			
	X ₁₀			
	X ₁₁			
	X ₁₂			
	X ₁₃			
	X ₁₄			
Leyenda: Prueba de t: Serie de datos A [A;B]: Resultado de la prueba de t desigual: Las medias en A y B son diferentes *) : Resultado de la prueba de t -/-: prueba no ejecutada				

Anexo E. Tolerancias de pipetas y balones clase A. A 20 °C.

Pipeta (mL)	Tolerancia (mL)	Balón (mL)	Tolerancia (mL)
1	± 0,007	20	± 0,04
2	± 0,01	25	± 0,04
3	± 0,01	50	± 0,06
4	± 0,015	100	± 0,1
5	± 0,015	200	± 0,15
6	± 0,015	250	± 0,15
7	± 0,015	500	± 0,25
8	± 0,02	1000	± 0,4
9	± 0,02	2000	± 0,6
10	± 0,02		
11	± 0,02		
15	± 0,03		
20	± 0,03		
25	± 0,03		
40	± 0,05		
50	± 0,05		
100	± 0,08		

Anexo F. Concentraciones y tolerancias de los patrones CertiPur® de Merck trazables a NIST.

Metal	Concentración (mg/L)	Tolerancia (mg/L)
As	1007	± 5
Cr	1007	± 5
Hg	998	± 2
Na	1000	± 2

Anexo G. Contraste estadístico de los datos del E. b para la validación del ensayo de mercurio usando el programa ProControl®.

Licencia para: Prof. Dr. Bertram Nagel • Beta-Version • Revisión					
ProControl® V. 3.1b para Excel 8.0 y Excel 2000 Seguridad estad.: 95% Probab. de error.: 5%					
Valores de Y No.		X₁	X₂	X₃	X₄
		2 µg/L	5 µg/L	5 µg/L	5 µg/L
	1	1,9116	4,3246	4,5039	4,711
	2	2,1349	4,8942	5,0716	5,0214
	3	2,0904	4,8954	5,0802	4,9731
	4	2,1186	4,9019	5,2482	4,8636
	5	2,0352	4,9549	5,0887	5,1365
	6	2,0962	5,0361	5,3403	5,1925
	7				
	8				
	9				
10					
No. de valores valid.:		6	6	6	6
Media:		2,06448	4,83452	5,05548	4,98302
Desviación estándar:		0,08221	0,25572	0,29137	0,17735
Coef. de variación [%]:		3,98%	5,29%	5,76%	3,56%
P = 95%					
Matriz de prueba F		X₁	X₂	X₃	X₄
	X ₁	[1;1]	inhomogéneo	inhomogéneo	[1;4]
	X ₂		[2;2]	[2;3]	[2;4]
	X ₃			[3;3]	[3;4]
	X ₄				[4;4]
	X ₅				
	X ₆				
	X ₇				
	X ₈				
	X ₉				
	X ₁₀				
	X ₁₁				
	X ₁₂				
	X ₁₃				
X ₁₄					
Leyenda: Prueba de F: Serie de datos A con B [se [A;B]: Resultado de la prueba: no Inhomogéneo: Varianzas en A y B difiere -/-: prueba no ejecutada / no po					
P = 95%					
Matriz de prueba t		X₁	X₂	X₃	X₄
	X ₁	[1;1]	desigual *)	desigual *)	desigual
	X ₂		[2;2]	[2;3]	[2;4]
	X ₃			[3;3]	[3;4]
	X ₄				[4;4]
	X ₅				
	X ₆				
	X ₇				
	X ₈				
	X ₉				
	X ₁₀				
	X ₁₁				
	X ₁₂				
	X ₁₃				
X ₁₄					
Leyenda: Prueba de t: Serie de datos A con B [se [A;B]: Resultado de la prueba: no hay desigual: Las medias en A y B difieren s *) : Resultado de la prueba t, si las -/-: prueba no ejecutada / no posit					