

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN INTERNA DE LA METODOLOGÍA  
ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO EN AGUAS Y SUELOS  
POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA-GENERACIÓN DE  
HIDRUROS (HGAAS)

ALEXANDER RODRÍGUEZ MANTILLA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA

2013

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN INTERNA DE LA METODOLOGÍA  
ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO EN AGUAS Y SUELOS  
POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA-GENERACIÓN DE  
HIDRUROS (HGAAS)

ALEXANDER RODRÍGUEZ MANTILLA

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE: QUÍMICO

DIRECTORA  
M.Sc LUZ YOLANDA VARGAS FIALLO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2013

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios primero que todo, a mis padres Alberto Rodríguez, Ana Licenia Mantilla y hermana Genny M. Rodríguez por su apoyo y confianza. A todos los demás familiares que de alguna u otra manera me apoyaron y colaboraron, especialmente a nuestros familiares que hoy no nos acompañan, y para una personita muy especial Brayan Yesid Hernández un colega más.

Al jurado calificador por su disponibilidad para la revisión y calificación de este documento.

A la familia del Laboratorio Químico de Consultas Industriales, por su apoyo, colaboración, y su amistad sincera e incondicional.

A la profesora Luz Yolanda Vargas Fiallo por dirigir éste trabajo de grado y apoyarme siempre y guiarme en mi aprendizaje diario de mi vida profesional.

A todos mis amigos, colegas químicos que me apoyaron y que me brindaron una muy bonita amistad, especialmente Andrea Gélvez, Carlos Adarme, Sergio, Xiomara González, Claudia Durán, Johanna Riveros, Jhonis Pérez, Sandra Franco, Maritza.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION .....	17
1. MARCO TEORICO.....	19
1.1. GENERALIDADES DEL SELENIO .....	19
1.1.1 Selenio en suelos .....	19
1.1.2 Selenio en aguas.....	21
1.2 TOXICIDAD DEL SELENIO .....	21
1.3 CUANTIFICACIÓN DE SELENIO TOTAL EN AGUAS Y SUELOS.....	22
1.3.1 Determinación De Selenio Por El Método: Absorción Atómica-Generación De Hidruros-Hgaas .....	22
1.3.1.1 Fundamento Teórico .....	22
1.3.1.2 Técnica de generación de hidruros .....	23
1.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	24
1.4.1 Validación Interna.....	25
1.4.2 Figuras De Mérito Analíticas [11] .....	25
1.4.2.1 Límite de detección (LDM) .....	25
1.4.2.2 Límite de cuantificación (LDC) .....	25
1.4.2.3 Linealidad .....	25
1.4.2.4 Exactitud.....	26
1.4.2.5 Precisión del método analítico.....	26
1.4.2.6 Adición estándar.....	26
1.4.2.7 Estándares de verificación .....	27
1.4.2.8 Cartas de control .....	27
1.5 INCERTIDUMBRE EN LAS MEDIDAS ANALÍTICAS “U” .....	27
1.5.1 Fuentes De Incertidumbre En Las Medidas Analíticas .....	28
1.5.1.1 Pesada de una muestra en la balanza. ....	28
1.5.1.2 Corrección por flotación.....	28
1.5.1.3 Efectos de la temperatura .....	28
1.5.1.4 División de escala de la balanza .....	29

1.5.1.5 Medición de un volumen.....	29
1.5.1.6 Tolerancia del material volumétrico.....	29
1.5.1.7 Efecto de la temperatura sobre la medición del volumen.....	29
1.5.1.7 Durante una dilución.....	30
1.5.1.8 Construcción de una curva de calibración.....	30
1.6 EVALUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE .....	31
1.6.1 Combinación .....	31
1.6.2 Expresión de la incertidumbre .....	32
1.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO [15] .....	32
1.7.1 Errores aleatorios .....	32
1.7.2 Errores sistemáticos .....	32
1.7.3 Propagación de errores en los cálculos aritméticos .....	32
1.7.4 Análisis de varianza (ANOVA) [15].....	33
2.METODOLOGÍA.....	34
2.1 ETAPA PRELIMINAR A LA VALIDACIÓN .....	34
2.1.1 Verificación de patrones y reactivos.....	34
2.1.2 Chequeo de procedimientos.....	35
2.1.2.1 Modificación del método.....	35
2.1.2.2 Selenio total en suelos .....	36
2.1.2.3 Selenio total en aguas .....	37
2.1.2.4 Selenio disuelto en aguas .....	38
2.1.2.5 Preparación de la muestra. Reducción del selenio .....	38
2.1.3 Equipos Y Material .....	38
2.1.3.1 Balanza analítica .....	39
2.1.3.2 Espectrofotómetro de absorción atómica .....	39
2.1.4 Verificación Del Material Volumétrico [10].....	39
2.2 PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN.....	39
2.2.1 Optimización de variables instrumentales .....	40
2.2.1.1 Optimización del método de generación del hidruro .....	40
2.2.1.2 Proporción aire- acetileno.....	40
2.2.1.3 Tiempo de pre-lectura de la muestra.....	40

2.2.2 Curva de calibración.....	41
2.2.3 Intervalo de validación.....	41
2.2.4 Linealidad.....	42
2.2.5 Diseño experimental.....	42
2.2.6 Descripción de soluciones y patrones.....	42
2.2.7 Figuras de mérito.....	43
2.2.7.1 El límite de detección.....	43
2.2.7.2 El límite de cuantificación.....	43
2.2.7.3 Precisión.....	43
2.2.7.4 Exactitud.....	44
2.3 ELABORACIÓN DE LAS CARTAS DE CONTROL.....	44
2.3.1 Carta de control para suelos.....	44
2.3.2 Carta de control para aguas.....	44
2.4 CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE.....	44
2.4.1 Caracterización de las fuentes individuales de incertidumbre.....	44
2.4.1.1 Incertidumbre en la determinación de selenio total en suelos.....	45
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	47
3.1 PREVALIDACIÓN.....	47
3.1.1 Verificación de Patrones.....	47
3.1.2 Verificación de Material Volumétrico.....	47
3.2 VALIDACIÓN [22].....	49
3.2.1 Optimización de variables instrumentales.....	49
3.2.1.1 Proporción Aire -Acetileno.....	50
3.2.1.2 Tiempo de pre-Lectura de la muestra.....	51
3.2.2 Curva de calibración.....	51
3.2.3 Intervalo de validación.....	53
3.2.4 Linealidad.....	53
3.2.5 Diseño experimental.....	54
3.2.5.1 Diseño experimental para el análisis de selenio total en suelos.....	54
3.2.5.1.1 Límite de detección y límite de Cuantificación.....	55
3.2.5.1.2 Precisión del Método.....	55

3.2.5.1.3 Exactitud del Método .....	56
3.2.5.2 Diseño experimental para la determinación de selenio total en aguas.....	57
3.2.5.2.1. Límite de detección y límite de Cuantificación.....	58
3.2.5.2.2 Precisión del Método .....	58
3.2.5.2.3 Exactitud del método .....	59
3.3 DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA CUANTIFICACIÓN DE SELENIO TOTAL EN SUELOS.....	59
3.3.1 Pesada de las muestras.....	60
3.3.1.1 Incertidumbre estándar en la división de la escala de la balanza.....	60
3.3.1.2 Incertidumbre estándar en la calibración de la balanza.....	60
3.3.1.3 Incertidumbre combinada en la pesada de las muestras .....	60
3.3.1.4 Incertidumbre estándar relativa para la pesada de las muestras. ....	60
3.3.2 Incertidumbre por dilución de muestras en un balón aforado de 100 mL.....	61
3.3.2.1 Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.....	61
3.3.2.2 Incertidumbre estándar por la repetibilidad del balón de 100 mL.....	61
3.3.2.3 Incertidumbre estándar por la tolerancia del balón de 100 mL.....	61
3.3.2.4 Incertidumbre combinada por dilución de las muestras en un balón de 100 mL.....	62
3.3.2.5 Incertidumbre estándar relativa por dilución de las muestras en un balón de 100 mL.....	62
3.3.3 Incertidumbre por dilución de muestras en un balón aforado de 25 mL.....	62
3.3.3.1 Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.....	62
3.3.3.2 Incertidumbre estándar por la repetibilidad del balón de 25 mL.....	62
3.3.3.3. Incertidumbre estándar por la tolerancia del balón de 25 mL.....	63
3.3.3.4 Incertidumbre combinada por dilución de las muestras en un balón de 25 mL.....	63
3.3.3.5 Incertidumbre estándar relativa por dilución de las muestras en un balón de 25 mL.....	63
3.3.4 Incertidumbre estándar por alícuota de 10 ml, para preparación de la muestra.....	63
3.3.4.1 Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.....	64

3.3.4.2 Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta de 10 mL .....	64
3.3.5.3 Incertidumbre estándar por la tolerancia de la pipeta de 10mL.....	64
3.3.5.4 Incertidumbre combinada por alícuota tomada por la pipeta de 10mL. ....	64
3.3.5.5 Incertidumbre estándar relativa por alícuota tomada por la pipeta de 10mL .....	64
3.3.6 Incertidumbre combinada del pesaje de las muestras y dilución de la digestión y preparación de las muestras. ....	65
3.3.7 Incertidumbre debida al primer factor de dilución (preparación de la solución patrón intermedio en la curva de calibración).....	65
3.3.8 Incertidumbre generada por la micropipeta de 10-100 $\mu$ L.....	65
3.3.8.1 Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la micropipeta. ....	65
3.3.8.2 Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura. ....	66
3.3.8.3 Incertidumbre estándar por la tolerancia de la micropipeta de 10- 100 $\mu$ L. 66	
3.3.8.4 Incertidumbre combinada de la micropipeta de 10-100 $\mu$ L.....	66
3.3.8.5 Incertidumbre Estándar Relativa de micropipeta de 10-100 $\mu$ L.....	66
3.3.9 Incertidumbre generada por el balón de 25 mL (aforo) .....	66
3.3.10 Incertidumbre estándar relativa del primer factor de dilución. ....	66
3.4 INCERTIDUMBRE DEBIDA AL SEGUNDO FACTOR DE DILUCIÓN (PREPARACIÓN DE LOS PATRONES A PARTIR DE LA SOLUCIÓN PATRÓN INTERMEDIO).....	67
3.4.1 Incertidumbre generada por la micropipeta de 100-1000 $\mu$ L.....	67
3.4.1.1. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la micropipeta de 100-1000 $\mu$ L. ....	67
3.4.1.2 Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura. ....	67
3.4.1.3 Incertidumbre estándar por la tolerancia de la micropipeta de 100- 1000 $\mu$ L. .....	68
3.4.1.4 Incertidumbre combinada de la micropipeta de 100-1000 $\mu$ L.....	68
3.4.1.5 Incertidumbre estándar relativa de la micropipeta de 100-1000 $\mu$ L.....	68
3.5 INCERTIDUMBRE GENERADA POR EL BALÓN DE 25 ML (AFORO) .....	68
3.6 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA DEL SEGUNDO FACTOR DE DILUCIÓN. ....	68

3.7 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DEBIDA AL MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO CON EL CUAL SE PREPARÓ LA CURVA DE CALIBRACIÓN...	69
3.7.1 Incertidumbre combinada del material de referencia.....	69
3.7.2 Incertidumbre estándar material de referencia .....	69
3.7.3 Incertidumbre estándar relativa material de referencia .....	69
3.8 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DEBIDA A LA RESPUESTA DEL EQUIPO AL LEER LA ABSORBANCIA DE LOS PATRONES.....	69
3.9 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA DEBIDA A LA RESPUESTA DEL EQUIPO AL LEER LA ABSORBANCIA DE LOS PATRONES.....	72
3.10 INCERTIDUMBRE COMBINADA DEL MÉTODO.....	72
3.11 INCERTIDUMBRE EXPANDIDA.....	73
3.12 EXPRESIÓN DEL RESULTADO.....	73
4. DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA CUANTIFICACIÓN DE SELENIO TOTAL EN AGUAS.....	74
4.1 MEDIDA DEL VOLUMEN DE LA MUESTRA, AFORO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	74
4.1.1 Incertidumbre estándar de la pipeta de 25mL, efecto de la temperatura .....	74
4.1.1.1. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta de 25 mL.....	74
4.1.1.2 Incertidumbre estándar por la tolerancia de la pipeta de 25 mL.....	75
4.1.1.3 Incertidumbre combinada por alícuota tomada por la pipeta de 25 mL.....	75
4.1.1.4 Incertidumbre estándar relativa por alícuota tomada por la pipeta de 25mL.....	75
4.2 INCERTIDUMBRE POR DILUCIÓN EN UN BALÓN DE 50 ML.....	75
4.2.1 Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.....	75
4.2.2 Incertidumbre estándar por la repetibilidad del balón de 50 mL.....	76
4.2.3 Incertidumbre estándar por la tolerancia del balón de 50 mL.....	76
4.2.4 Incertidumbre combinada por dilución de las muestras en un balón de 50 mL.....	76
4.2.5 Incertidumbre estándar relativa por dilución de las muestras en un balón de 50 mL.....	76

4.3 INCERTIDUMBRE POR DILUCIÓN DE MUESTRAS EN UN BALÓN AFORADO DE 25 ML.....	76
4.4 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA POR ALÍCUOTA TOMADA POR LA PIPETA DE 10ML .....	77
4.5 INCERTIDUMBRE COMBINADA.....	77
4.6 INCERTIDUMBRE DEBIDA AL PRIMER FACTOR DE DILUCIÓN (PREPARACIÓN DEL DISOLUCIÓN PATRÓN INTERMEDIA EN LA CURVA DE CALIBRACIÓN).....	77
4.7 INCERTIDUMBRE DEBIDA AL SEGUNDO FACTOR DE DILUCIÓN (PREPARACIÓN DE LOS PATRONES A PARTIR DE LA SOLUCIÓN PATRÓN INTERMEDIO).....	78
4.8 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DEBIDA AL MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO CON EL CUAL SE PREPARÓ LA CURVA DE CALIBRACIÓN...	78
4.9 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DEBIDA A LA RESPUESTA DEL EQUIPO AL LEER LA ABSORBANCIA DE LOS PATRONES. ....	78
4.10 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA DEBIDA A LA RESPUESTA DEL EQUIPO AL LEER LA ABSORBANCIA DE LOS PATRONES.....	79
4.11 INCERTIDUMBRE COMBINADA DEL MÉTODO. ....	79
4.12 INCERTIDUMBRE EXPANDIDA.....	80
4.12.1 Cálculo de la incertidumbre expandida en la concentración del analito .....	80
4.12.2 Expresión del resultado .....	80
5. CARTAS CONTROL .....	81
5.1 CARTA DE CONTROL PARA SUELOS.....	81
5.2 CARTA DE CONTROL PARA AGUAS.....	81
CONCLUSIONES.....	83
RECOMENDACIONES .....	85
<b>REFERENCIA BIBLIOGRAFICA</b> .....	86
BIBLIOGRAFIA .....	89

## LISTA DE FIGURAS

Tabla 1. Errores en los cálculos aritméticos.....	33
Tabla 2. Modificación del método .....	35
Tabla 3. Fuentes de incertidumbre selenio total en suelos.....	45
Tabla 4. Fuentes de incertidumbre selenio total en aguas. ....	46
Tabla 5. Verificación de material volumétrico .....	48
Tabla 6. Optimización con concentraciones de reductor para generación del hidruro de selenio .....	49
Tabla 7. Proporción aire -acetileno .....	50
Tabla 8. Promedio de la Absorbancia de los patrones en los diferentes días evaluados.....	52
Tabla 9 Lectura de patrones de selenio.....	52
Tabla 10. Blancos enriquecidos en la matriz de suelo .....	54
Tabla 11. Promedio de blanco enriquecido para la determinación de selenio en suelo.....	55
Tabla 12. Límite de detección y límite de cuantificación para la determinación de selenio en suelos. ....	55
Tabla 13. Determinación de la Precisión en la determinación de selenio en suelos. ....	56
Tabla 14. Exactitud del método en la determinación de selenio en suelos .....	56
Tabla 15. Blancos enriquecidos para determinación de selenio en aguas.....	57
Tabla 16. Promedio blanco enriquecido para determinación de selenio en aguas.....	58
Tabla 17. Límite de detección y límite de cuantificación para determinación de Se en aguas.....	58
Tabla 18. Precisión del Método para la determinación de Se en aguas. ....	59
Tabla19 Exactitud Método para determinación de selenio en aguas. ....	59
Tabla 20. Diseño experimental para incertidumbre debida a la respuesta del equipo .....	70

## LISTA DE TABLAS

Figura 1. Generador de Hidruros .....	23
Figura 2. Fuentes de incertidumbre, selenio total en suelos.....	45
FIG 3. Fuentes de incertidumbre, selenio total en Aguas.....	46
Figura 4. Verificación volumétrica del balón de 50 MI .....	48
Figura 5. Concentración de Reductor Vs Absorbancia .....	50
Figura 6. Tiempo de pre-lectura de las muestras.....	51
Figura 7. Curva de calibración de selenio .....	53
Figura 8. Carta de control para suelos.....	81
Figura 9. Carta de control para aguas.....	82

## RESUMEN

**TÍTULO:**

**ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN INTERNA DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA DETERMINACIÓN DE SELENIO EN AGUAS Y SUELOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA-GENERACIÓN DE HIDRUROS (HGAAS).\***

**AUTOR:**

**ALEXANDER RODRIGUEZ MANTILLA\*\***

**PALABRAS CLAVE:**

Selenio, validación, generación de hidruros.

El selenio es un elemento que en condiciones naturales en matrices como agua y suelo se encuentra a nivel de trazas, pero por fuentes antropogénicas y de contaminación ambiental, la concentración de éste elemento puede superar los límites permitidos y se convierte en un agente altamente tóxico para los seres vivos.

Según los requisitos técnicos de la NTC ISO/IEC 17025, la validación permite dar un criterio de confianza a un método analítico en particular. La metodología empleada para la cuantificación de selenio en matrices de agua y suelo se sometió a este proceso de validación, con lo cual al obtener resultados de análisis poder reportar unos datos confiables y que cumplen con criterios de alta calidad nacionales e internacionales.

El planeamiento de validación de la metodología consistió en analizar muestras de aguas y suelos utilizando las como referencia el SM para aguas y EPA 3050 para suelos. Se utilizaron muestras de agua natural para los análisis y se evaluaron los porcentajes de recuperación en estas muestras. Para suelos se usó un material de referencia suministrado por el IDEAM, en el alcance de la validación para las metodologías, Se evaluaron los parámetros analíticos: Limite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, exactitud, precisión, y se calculó la incertidumbre de las concentraciones reportadas con las metodologías validadas.

Finalmente los datos obtenidos por la metodología validada fueron exactos y precisos, con lo cual la metodología para la cuantificación de selenio en las dos matrices puede ser implementada en el Laboratorio químico de consultas industriales de la universidad Industrial de Santander.

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Yolanda Vargas Fiallo. Químico M. Sc

## ABSTRACT

**TITLE:**

**STANDARIZATION AND INTERNAL VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHODOLOGY FOR THE DETERMINATION OF SELENIUM IN WATERS AND SOILS BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY- HYDRIDE GENERATION (HGAAS).\***

**AUTHOR:**

**ALEXANDER RODRIGUEZ MANTILLA\*\***

**KEY WORDS:**

Selenium, Validation, Hydride Generation.

Selenium is an element that in natural conditions in matrices of waters and soils, it's found in trace levels, but by anthropogenic sources and environmental pollution, the concentration of this element, may exceed the permitted levels and it's becomes in a highly toxic agent to living beings.

According to the technical requirements of the NTC ISO / IEC 17025, validation allows for a confidence standard to a particular analytical method. The methodology that was used to quantify selenium in matrices of water and soils, was validated, to obtain reliable data, and to satisfy national and international standards.

The validation plan was to analyze water by the SM and soil samples using EPA 3050 methodologies. Water samples were used for analysis and natural percentages were evaluated recovery in these samples. For soils used a reference material supplied by IDEAM. In the scope of validation methodologies, Analytical parameters were evaluated: Limit of detection, limit of quantification, sensitivity, accuracy, precision, and uncertainty was calculated concentrations reported with validated methodologies.

Finally, the data obtained by the validated methodology were accurate and precise, so that the methodology for quantification of selenium in the two matrices can be implemented in the chemical laboratory of industrial consultations in the Industrial University of Santander.

\* Degree Project.

\*\* Faculty of Science. School of Chemistry. Directora: Yolanda Vargas Fiallo. Químico M. Sc

## INTRODUCCION

Una de las obligaciones que exige la **NTC ISO/IEC 17025** es que en los laboratorios donde se efectúen análisis se deben aplicar métodos apropiados, los cuales deben estar normalizados y fundamentados en una norma que obliga a implementar estos procedimientos normalizados o de otra manera procedimientos que no estén normalizados pero que se hayan validado satisfactoriamente, para que así el resultado que entregue el laboratorio sea confiable y trazable. La validación de un método permite establecer y confirmar la certeza de una metodología para un uso específico de análisis y a su vez sea implementado por el laboratorio [16].

El selenio es un elemento traza que al superar el máximo nivel tolerable se convierte en elemento tóxico para los seres vivos, aunque la presencia de algunos metales, incluyendo metales traza, son imprescindibles para el normal desarrollo de la vida biológica, y la ausencia de cantidades suficientes de ellos podría limitar algunos de estos procesos biológicos, también su presencia en cantidades excesivas o por encima del nivel máximo tolerable, interferirán con gran número de usos de aguas y suelos. Por tanto surge la necesidad de desarrollar una metodología que permita cuantificar estas concentraciones con un nivel de confianza aceptable.

En Colombia existen pocos laboratorios que tengan implementada una metodología acreditada para el análisis traza del selenio en matrices de aguas y suelos, y el objetivo de este proyecto es estandarizar, implementar y acreditar una nueva metodología, que cumpla con todos los estándares de calidad en el país, utilizando la técnica de Absorción Atómica-Generación de Hidruros, para con esto poder ofrecer un mejor servicio a la comunidad y clientes del laboratorio que lo requieran, y se les brinden resultados válidos, exactos y confiables.

Desarrollar nuevas metodologías con resultados más confiables que permitan cuantificar trazas de selenio en matrices de agua y suelo son de gran importancia en la salud y la industria, porque facilitan un seguimiento de control sobre la contaminación de este elemento traza que elevado su contenido se convierte en tóxico.

Para poder realizar este trabajo se utilizó la técnica analítica de Absorción Atómica con Generación de Hidruros, la cual facilitó éste análisis ya que esta técnica es muy utilizada y muy eficaz en la determinación de este tipo de elementos, se establecieron los criterios apropiados para orientar la validación de la metodología analítica determinando las principales figuras de mérito como: Límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad para especificar los parámetros de calidad de la metodología empleada y obtener unos porcentajes de recuperación altos y límites de detección alrededor de (0,1-0,5 µg/L) de selenio en cada matriz.

Se tiene como meta en el Laboratorio de Consultas Industriales implementar el método validado dentro de su sistema de gestión de calidad, y poder asegurar a sus clientes que se reportan datos confiables y satisfacer la necesidad de los clientes que requieren este análisis en diferentes muestras provenientes de diferentes industrias locales y nacionales

## 1. MARCO TEORICO

### 1.1. GENERALIDADES DEL SELENIO

El selenio (Se) es el tercer elemento en el grupo VI A de la tabla periódica. La abundancia promedio de selenio en la corteza terrestre es de 0,2 ppm, en suelos es de 0,27 a 0,74 ppm, en arroyos es de 0,2 µg/L, y en aguas subterráneas es de < 0,1 mg/L [2]. El selenio es empleado en electrónica, cerámica, shampoos, fábricas de vidrio, pesticidas, gomas y semi-conductores. El selenio es considerado un elemento traza no esencial para la mayoría de las plantas, pero es un nutriente traza esencial para la mayoría de animales, y son bien conocidas las enfermedades por deficiencia de selenio en la medicina veterinaria. Por encima de los niveles traza, la ingestión de selenio es tóxica para los animales y puede ser tóxica para los humanos. El agua que drena por suelos seleníferos puede causar contaminación ambiental y toxicidad en la fauna [3].

En Colombia, para aguas, la legislación actual establece unos niveles máximos permisibles para las concentraciones de selenio, 0,01 mg Se/L en aguas para consumo humano [3] y de 0,5 mg Se/L, para el control de carga contaminante en efluentes. Aunque para suelos no existe normatividad colombiana, otros países como Canadá y Estados Unidos establecen estas máximas concentraciones permisibles por ejemplo en Canadá la concentración máxima es de 0,01 mg/L en suelos [4], a partir de las cuales se recomienda la remediación de los suelos.

#### 1.1.1 Selenio en suelos

La abundancia de selenio en la corteza terrestre se encuentra entre 0,05 y 0,09 mg/Kg. El selenio es un elemento calcófilo, el cual se asocia con depósitos de sulfuros y en relación al azufre tiene una proporción de 1:6.000 (Se/S). Aunque el selenio se encuentra en muchos materiales geológicos, frecuentemente está enriquecido en rocas sedimentarias de grano muy fino (shales negros) y en concentraciones que alcanzan hasta 675 mg/Kg. Altas cantidades de selenio en

shales, y en restos carbonosos de areniscas, se pueden atribuir a la precipitación de selenio bajo condiciones reductoras que son inducidas por la presencia de materia orgánica en el momento de la formación de la roca; puesto que en condiciones reductoras y en presencia de iones sulfuro se produce la precipitación de selenio. El selenio también se encuentra en altas concentraciones en roca fosfórica, las cuales oscilan entre 1-300 mg/Kg. La ocurrencia de minerales independientes de Se no ha sido reportada [11].

Dentro del manto de la Tierra el selenio y el azufre son compañeros geoquímicos; sin embargo, en procesos que ocurren cerca o en la superficie, estos elementos siguen diferentes caminos geoquímicos. Esto se debe a que el sulfuro se oxida fácilmente a sulfatos solubles y puede migrar rápidamente, en cambio el selenio necesita fuertes condiciones oxidantes para formar seleniatos solubles. En suelos, el contenido de selenio se debe principalmente a la meteorización del material parental, aunque no se descartan fuentes exógenas relacionadas con actividades antropogénicas o condiciones ambientales específicas. En un ambiente natural, concentraciones elevadas de selenio se asocian, por lo general, con materiales volcánicos, mineralizaciones de sulfuros, shales negros y areniscas carbonosas. La intensidad de meteorización y los procesos de lavado de estos materiales parentales son los que definen la composición de selenio asociado a los suelos. Es importante anotar que la concentración de selenio en suelos no siempre es continua y uniforme, ya que es afectada por la topografía y el material parental [21].

En general, los principales procesos que controlan la distribución de selenio en los suelos son actividad volcánica, meteorización, transporte de aguas profundas, precipitación de minerales, adsorción en minerales, reducción y oxidación química y biológica, fijación y liberación por los microorganismos del suelo y el quemado de combustibles fósiles

### 1.1.2 Selenio en aguas

Las concentraciones típicas de Se en aguas ambientales son  $<1$  mg/L en ausencia de fuentes directas de Se. La concentración de fondo de Se de las aguas marinas es de  $0,02 - 0,04 \mu\text{g} / \text{L}$ , pero no ha sido determinada de manera sistemática. En las aguas bajo el impacto de las emisiones antropogénicas o geogénicas las concentraciones están típicamente en el rango de  $1-10 \mu\text{g/L}$ , y ocasionalmente puede exceder  $100$  microgramos/L en casos excepcionales. El selenio en los efluentes industriales puede superar los  $1.000$  mg / L [4].

En las aguas superficiales oxidadas, el selenio se encuentra normalmente en forma de dos especies principales: los oxianiones selenita ( $\text{HSeO}_4^-$ ; estado de oxidación +IV) y selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ; estado de oxidación +VI). Termodinámicamente, la selenita es inestable y se predice que se convierten en selenato con el tiempo, pero en la práctica, la cinética de esta reacción es lenta y no se produce en las aguas ambientales, a menos que los microorganismos estén involucrados. No obstante, las aguas bien oxidadas tienden a contener en su mayoría selenato. Por el contrario la selenita se adsorbe fuertemente a la superficie de Fe y Mn, por lo que se puede perder de la fase acuosa.

Algunas pruebas también sugieren que otras especies inorgánicas solubles de selenio, además de selenito y selenato pueden formarse durante la reacción de reducción cuando hay presencia de compuestos de azufre. [2].

## 1.2 TOXICIDAD DEL SELENIO

El selenio es un elemento esencial para el ser humano, y la ingesta diaria recomendada para adultos se sitúa alrededor de  $1 \mu\text{g/kg}$  de peso corporal. Se ha comprobado que los compuestos de selenio son genotóxicos en sistemas in vitro con activación metabólica, pero no en personas. No se obtuvieron pruebas de efectos teratógenos en monos. La toxicidad a largo plazo en ratas se caracteriza por la inhibición del crecimiento y trastornos hepáticos. En personas, los efectos

tóxicos de la exposición prolongada al selenio se manifiestan en las uñas, el cabello y el hígado. Datos obtenidos en China indican que aparecen signos clínicos y bioquímicos con una ingesta diaria mayor que 0,8 mg. La ingesta diaria de niños venezolanos que presentaban signos clínicos era de 0,7 mg aproximadamente; esta cifra se calculó a partir de sus concentraciones sanguíneas y de los datos sobre la relación entre la concentración sanguínea y la ingesta obtenidos en China. En un pequeño grupo de pacientes con artritis reumatoide a los que se administró selenio a razón de 0,25 mg al día, además de la aportación procedente de los alimentos, también se observaron efectos en la síntesis de una proteína hepática. En un estudio realizado en un grupo de 142 personas con una ingesta media diaria de 0,24 mg (0,72 mg como máximo) procedente de los alimentos, no se observaron signos clínicos o bioquímicos de toxicidad por selenio [8].

### **1.3 CUANTIFICACIÓN DE SELENIO TOTAL EN AGUAS Y SUELOS**

Para una confiable cuantificación de los niveles de selenio que puede estar presente en los suelos, los sedimentos y diversas fuentes hídricas, es necesario desarrollar técnicas analíticas y una validación de los métodos que permitan determinar con certeza, exactitud y reproducibilidad cantidades traza de este elemento.

#### **1.3.1 Determinación De Selenio Por El Método: Absorción Atómica-Generación De Hidruros-Hgaas**

1.3.1.1 Fundamento Teórico. La técnica de espectroscopía de absorción atómica se basa en la medición de la cantidad de luz que es absorbida por los átomos del analito a la longitud de onda resonante. La luz incidente (de las longitudes de onda específicas a las cuales absorben los átomos del analito) es emitida por una lámpara de cátodo hueco o de descarga sin electrodo y es absorbida por la solución que es interceptada por el haz de luz incidente [7].

### 1.3.1.2 Técnica de generación de hidruros

Figura 1. Generador de Hidruros

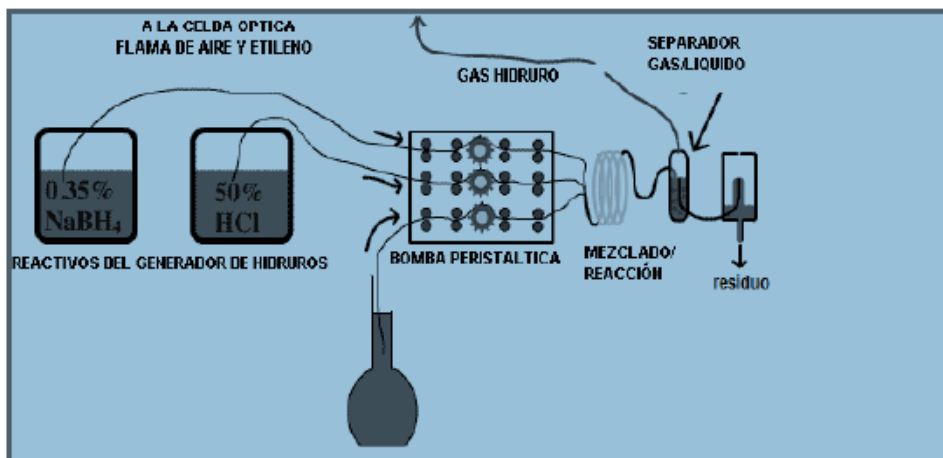
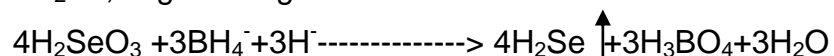


Figura 1. Generador de Hidruros

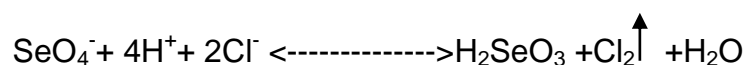
Fuente: HENRY JOHNSON. Determination of Selenium in Solid Waste. Environmental Science and Technology. 1970.

La técnica de generación de hidruros es apropiada para la determinación de selenio por conversión a sus respectivos hidruros mediante reacción con Borohidruro de sodio. Por la convencional espectrofotometría de llama directa, la sensibilidad de este elemento es muy baja, mientras que por la generación de hidruros se pueden obtener límites de detección de alrededor de 1 µg/L [7]. Para el desarrollo del método, este elemento previamente debe estar en forma inorgánica y en el estado de oxidación Se (IV). El ácido selenioso formado reacciona rápidamente con el agente reductor borohidruro de sodio formando el hidruro volátil H<sub>2</sub>Se, según la siguiente reacción:



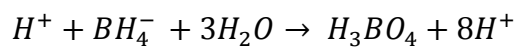
Éste hidruro formado es transportado, por una corriente de nitrógeno, hacia el atomizador de un equipo de absorción atómica, donde son analizados, por

liberación del metal de su respectivo hidruro formado que se descompone por acción de la temperatura. Este método permite determinaciones rápidas y sensibles de éste elemento. El ácido selénico, estado de oxidación (VI), no es reducido en forma medible por el borohidruro de sodio. Para determinar el selenio total, se reduce el selenio formado por digestión ácida que pasa totalmente del estado de oxidación Se (VI) a Se (IV). La eficiencia de la reducción depende de la temperatura, el tiempo de reacción y la concentración de ácido clorhídrico [8], la reacción de ésta reducción es:

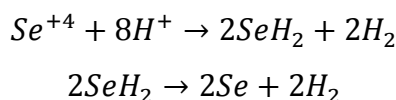


Para la generación de hidruros los ácidos más utilizados han sido los ácidos minerales fuertes, en especial el HCl, por su facilidad de manejo y la ausencia de reacciones secundarias.

El mecanismo de formación de los hidruros es:



Los hidruros volátiles del selenio ( $\text{SeH}_2$ ) son transportados por un gas inerte de arrastre como nitrógeno o argón a una celda de cuarzo, que está previamente calentada por una llama de aire-acetileno con una temperatura tal que permita producir la atomización del analito. Cuando los gases pasan a través de esta celda ocurre una descomposición térmica, y se liberan los átomos de selenio:



#### 1.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Los métodos utilizados en un laboratorio de análisis químicos han de ser evaluados y sometidos a prueba para asegurarse de que producen unos resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, es decir, han de ser

validados. La validación o la verificación de un método se realiza mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su exactitud, precisión, etc. El proceso que ha de seguirse para ello debe constar por escrito como procedimiento normalizado de trabajo. Una vez validados o verificados los métodos, su utilización habitual en el laboratorio debe ser autorizada formalmente por la persona responsable, por ejemplo, el director del mismo [13].

#### **1.4.1 Validación Interna**

Es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. [10].

#### **1.4.2 Figuras De Mérito Analíticas [11]**

Las figuras de mérito o también llamadas características de fiabilidad, son aquellas que demuestran la capacidad de un método analítico de mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación.

1.4.2.1 Límite de detección (LDM). Es aquella concentración que proporciona una señal instrumental significativamente diferente de la señal de una muestra blanco, o la señal de fondo.

1.4.2.2 Límite de cuantificación (LDC). Cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable.

[10]

1.4.2.3 Linealidad. Habilidad (dentro de un ámbito dado) del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

1.4.2.4 Exactitud. Para comprobar la exactitud del análisis se requiere un material de referencia certificado, una muestra de control preparada en el laboratorio u otro material estándar. A los materiales de referencia, controles o estándares se les realiza el mismo tratamiento, análisis y lecturas en el equipo que las muestras. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Los resultados obtenidos deben estar dentro de los límites de control establecidos. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites aceptables, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis. Los límites de control se verifican anualmente o si se realizan modificaciones en el método. La muestra de control se analiza cada 15 días [10].

1.4.2.5 Precisión del método analítico. En el caso del análisis de una serie de muestras, se debe realizar un duplicado después de cada 10 muestras de un mismo lote. El porcentaje de la desviación promedio relativa (RPD) no debe ser mayor del 10%. Sólo para los duplicados cuyas concentraciones se encuentren en el orden de 1 y 5 veces el límite de detección del método (LDM), el porcentaje RPD puede ser menor o igual a 20%.

De no cumplirse esta regla, se debe repetir el análisis de la muestra y su duplicado. En caso contrario, se debe repetir el lote de muestras analizadas.

1.4.2.6 Adición estándar. Para cada lote de muestras, se analiza una muestra por duplicado y al duplicado se le agrega una solución de una concentración conocida de la sustancia a analizar. El porcentaje de recuperación del estándar debe estar entre 90 y 110%. De no cumplirse esta regla, se debe repetir el análisis de la muestra y su duplicado con la adición. En caso de que no se logre la recuperación, se debe repetir el lote de muestras analizadas.

1.4.2.7 Estándares de verificación .La curva de calibración se verifica con 2 estándares de concentración conocida, preferiblemente que estén en el rango de la curva de calibración. Los estándares de verificación se preparan a partir de una solución madre diferente a la utilizada para la preparación de la curva de calibración. El valor obtenido no debe diferir de  $\pm 15\%$  del valor del estándar. En caso contrario, se debe preparar una nueva curva de calibración. Si es necesario realizar acciones correctivas, éstas deben estar documentadas.[13]

1.4.2.8 Cartas de control.Se deben calcular los límites de control y advertencia, y construir la carta de control como se indica en el manual de control de calidad analítica del laboratorio. Inmediatamente después de analizar las muestras control, graficar el valor en la carta de control. Se debe tomar una acción correctiva en los siguientes casos:

- ✓ Si el valor determinado está fuera de los límites de control, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis.
- ✓ Si 2 de 3 valores determinados sucesivamente están fuera de los límites de advertencia, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis.
- ✓ Si 7 de 8 valores determinados sucesivamente se encuentran al mismo lado de la línea promedio, se debe revisar el procedimiento.

## **1.5 INCERTIDUMBRE EN LAS MEDIDAS ANALÍTICAS “U”**

En la búsqueda de resultados confiables los analistas descubren que una muestra analizada un número definido de veces proporciona diferentes valores aunque cada una de las determinaciones se realice bajo condiciones de trabajo idénticas. Los resultados oscilarán dentro de un rango, esto es debido a los errores que se pueden cometer durante el análisis. Cada paso a seguir durante el análisis tiene asociado un error inherente, al cometer dichos errores, las medidas realizadas no serán verdaderas, oscilarán dentro de un rango llamado incertidumbre, por ello es necesario identificar cada una de las fuentes de incertidumbre, evaluarlas y

finalmente estimar el aporte de cada fuente a la incertidumbre total del análisis.[12]

### 1.5.1 Fuentes De Incertidumbre En Las Medidas Analíticas

Un análisis en particular su procedimiento está conformado por varias etapas donde cada una de ellas tiene asociado un valor de incertidumbre que se debe identificar y cuantificar, con el fin de reportar la incertidumbre referida a las metodologías empleadas.

1.5.1.1 Pesada de una muestra en la balanza. La balanza es un instrumento esencial en todos los laboratorios de ensayo, la mayoría de los análisis incluyen la pesada dentro de sus procedimientos, ya sea pesando las muestra para el análisis o los reactivos que hacen parte de la metodología.

1.5.1.2 Corrección por flotación. Un error por flotación afectará los datos si la densidad del objeto que se pesa difiere significativamente de los pesos estándar. El origen de este error es la diferencia de la fuerza de flotación ejercida por el medio (aire) sobre el objeto y los pesos estándar. La corrección para la flotación se obtiene por:

(Ecuación 1)

$$W_1 = W_2 + W_2 \left( \frac{d_{aire}}{d_{objeto}} - \frac{d_{aire}}{d_{peza}} \right)$$

1.5.1.3 Efectos de la temperatura. Los intentos para pesar un objeto cuya temperatura es diferente de la del ambiente darán como resultado un error significativo. La causa más común de este problema es el tiempo necesario para que el objeto que se ha calentado regrese a la temperatura ambiente. Los errores debidos a la diferencia de temperatura tienen dos fuentes. Primero, las corrientes de convección dentro de la balanza ejercen un efecto de flotación sobre el platillo y el objeto. Segundo, el aire caliente atrapado en el recipiente cerrado pesa menos que el mismo volumen a menor temperatura.

1.5.1.4 División de escala de la balanza. El modelo de la balanza usada, depende de la división de la escala, es decir con cuantos decimales se obtiene el valor de pesada, luego el último número en la escala es un decimal incierto, ésta será una fuente de incertidumbre en la medida, como también lo es el reporte de calibración llamado error máximo y la precisión de la balanza. Estas fuentes de incertidumbre deben ser calculadas y evaluadas de acuerdo a la ley de propagación de errores para encontrar la incertidumbre durante la pesada de una sustancia.

1.5.1.5 Medición de un volumen. La medición precisa del volumen es tan importante para muchos métodos analíticos como la medición precisa de la masa. Existen en general dos clases de material volumétrico: De llenado *in*, volumen preciso en el interior del recipiente como en el caso de matraces aforados; y de volumen *ex*, volumen preciso una vez descargado el recipiente como en el caso de pipetas. El fabricante del material reporta las condiciones bajo las cuales se calibró el material y la tolerancia de la medida

1.5.1.6 Tolerancia del material volumétrico. Son los límites de aceptación que se han elegido para un producto, esto depende de la capacidad de llenado.

1.5.1.7 Efecto de la temperatura sobre la medición del volumen. El volumen ocupado por una determinada masa de un líquido varía con la temperatura, lo mismo que sucede con el recipiente que contiene al líquido durante la medición. La mayor parte de dispositivos para mediciones volumétricas se fabrica con vidrio, que tiene un pequeño coeficiente de expansión. En consecuencia, para el trabajo analítico no se debe tener presente como una fuente de incertidumbre en la medida.

Las mediciones volumétricas se deben referir a una temperatura estándar, este punto de referencia por lo general es de 20°C, por tanto se debe usar una corrección en las medidas de volumen que fueron medidos a temperaturas diferentes, dicho factor de corrección se describe en la ecuación 2.

$$\pm(V * \Delta T * Z) \quad (\text{Ecuación 2})$$

En donde  $V$  es el volumen medido,  $\Delta T$  la diferencia entre la temperatura de calibración y la experimental y  $Z$  el factor de compresibilidad del agua.

1.5.1.7 Durante una dilución. El factor de dilución normalmente se emplea cuando se miden elementos químicos en muestras de concentración de masa ( $\mu\text{g/L}$ ) mayor al intervalo de trabajo del método. El factor de dilución se obtiene a partir de un proceso de dilución y pueden llevarse a cabo  $n$  diluciones de la muestra. El modelo matemático de una dilución está dado por la ecuación 3.

$$F_{d_n} = \frac{V_2}{V_1} \quad (\text{Ecuación 3})$$

En donde,  $F_{d_n}$  es el factor de dilución  $n$ ,  $V_2$  es el volumen de aforo y  $V_1$  el volumen de la alícuota. En el proceso de una dilución se identifican dos fuentes de incertidumbre, el  $V_2$  de aforo y el  $V_1$  de la alícuota de la muestra. La estimación de incertidumbre estándar relativa del factor de dilución ( $UF_{d_n}$ ), se realiza combinando las incertidumbres de ambas mediciones: volumen de la alícuota de muestra y volumen de aforo, de forma relativa y cuadrática, de acuerdo a la ecuación:

(Ecuación 4)

$$\frac{UF_{d_n}}{F_{d_n}} = \sqrt{\left(\frac{UV_1}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{UV_2}{V_2}\right)^2}$$

1.5.1.8 Construcción de una curva de calibración. Muchas metodologías necesitan la elaboración de una curva de calibración para determinar el contenido del analito de interés, esta supone la elaboración de una serie consecutiva de patrones a los cuales se mide una propiedad (absorbancia, transmitancia, fluorescencia, etc.), el diseño experimental, supone una correlación entre la concentración ( $\alpha$  y la propiedad medida ( $\gamma$ )). Dicha relación en la mayoría de las ocasiones es lineal y se describe mediante la ecuación:

$$\gamma = m\alpha + b \quad (\text{Ecuación 5})$$

La construcción de esta curva de calibración y la interpolación de los patrones y muestra genera un valor de incertidumbre el cual debe ser combinado con la incertidumbre de la preparación de los patrones para evaluar la incertidumbre en la curva de calibración.

## 1.6 EVALUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

En esta etapa se deben cuantificar todas las fuentes de incertidumbre identificadas y las dos formas de determinarlas son:

- Experimentalmente, es decir, haciendo replicados en el laboratorio. Tipo A
- Usando información disponible: certificados de calibración, tolerancias del material volumétrico, manuales de instrumentos, etc. Tipo B

Es importante señalar que todas las componentes de incertidumbre deben expresarse como incertidumbre estándar. En el caso de que la incertidumbre se determine experimentalmente, la incertidumbre estándar se obtiene calculando la desviación estándar de los replicados. Si se utiliza información previa, la incertidumbre estándar se suele obtener dividiendo por  $\sqrt{3}$  el intervalo proporcionado por el fabricante (con lo que se asume que el intervalo de confianza sigue una distribución rectangular).

### 1.6.1 Combinación

Una vez que se han calculado todas las fuentes de incertidumbre, éstas deben combinarse siguiendo la ley de propagación de errores. De esta forma, se obtiene una incertidumbre estándar combinada,  $U_c$ . El último paso, consiste en calcular la incertidumbre expandida,  $U$ . Para ello, debe multiplicarse la incertidumbre estándar por un factor de cobertura,  $k$ , ( $U=k \cdot u$ ). Normalmente,  $k$  es igual a 2. De esta forma, se obtiene un intervalo donde existe aproximadamente un 95% de probabilidad de que se encuentre el valor verdadero.

### **1.6.2 Expresión de la incertidumbre**

En informes de rutina es suficiente presentar el valor de la incertidumbre expandida. El resultado debe ir junto con la incertidumbre expandida  $U$ , como se indica a continuación.

$$\text{Resultado} = X \pm U \text{ (unidades)}$$

## **1.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO [15]**

El análisis estadístico tiene como objetivo identificar fuentes de error en un conjunto de datos; los errores pueden ser de dos tipos, aleatorios ó sistemáticos.

### **1.7.1 Errores aleatorios**

Los errores aleatorios o indeterminados se manifiestan cuando se efectúa una medición, y se deben a numerosas variables no controladas que son parte inevitable de toda medición física o química.

### **1.7.2 Errores sistemáticos**

Los errores sistemáticos tienen un valor definido, una causa conocida y una magnitud semejante a la que tienen las mediciones repetidas efectuadas en la misma forma. Estos errores dan lugar a una tendencia en la técnica de medición, tiene un signo y afecta por igual a todos los datos de un conjunto. Existen tres tipos de errores sistemáticos: Los que se deben al instrumento de medida, ya sea porque tiene pequeños defectos o por inestabilidad de sus componentes; los errores del método que surgen del comportamiento químico o físico no ideal de los sistemas analíticos y los errores personales que se deben al mal manejo del analista por falta de precaución o experiencia.

### **1.7.3 Propagación de errores en los cálculos aritméticos**

Con frecuencia es necesario estimar la desviación estándar de un resultado calculado a partir de dos o más datos experimentales, donde cada uno tiene una

desviación estándar conocida. Como se muestra en la tabla 1 La forma de hacer estos estimados depende del tipo de operaciones aritméticas empleadas.

Tabla 1. Errores en los cálculos aritméticos

Tipo de cálculo	Ejemplo	Desviación estándar de y
Sumas y restas	$y = a + b - c$	$S_y = \sqrt{S_a^2 + S_b^2 + S_c^2}$
Multiplicaciones o divisiones	$y = \frac{(a \times b)}{c}$	$\frac{S_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{S_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{S_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{S_c}{c}\right)^2}$
Exponenciales	$y = a^x$	$\frac{S_y}{y} = x \frac{S_a}{a}$
Logaritmos	$y = \log_{10} a$	$S_y = 0.434 \frac{S_a}{a}$
Antilogaritmos	$y = \text{anti log}_{10} a$	$\frac{S_y}{y} = 2.303 S_a$

Fuente: MILLER, J.N. Miller, J.C. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ª ed. 2002. Pearson Prentice may, pp. 79

#### 1.7.4 Análisis de varianza (ANOVA) [15]

El análisis de varianza se puede utilizar para separar la variación debida al error aleatorio del error sistemático. También se puede emplear en situaciones donde hay más de una fuente de variación aleatoria o factor. Las variaciones pueden ser controladas por el operador con el fin de diseñar experimentos intencionalmente que permitan identificar y evaluar las fuentes de variación en una metodología. Al variar un factor estamos hablando de un ANOVA de un factor, si se varían dos factores el ANOVA es de dos factores, y se mostrará si los resultados son significativamente diferentes al variar un factor.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 ETAPA PRELIMINAR A LA VALIDACIÓN

Se fundamentó en una serie de pasos que permitieron obtener la mayor información relevante y orientar el proceso de validación y poder verificar que todos los equipos y reactivos necesarios para la validación estén en condiciones óptimas y poder así garantizar que la estandarización de la metodología para la determinación de selenio total y disuelto en aguas y suelos se lleve a cabo con éxito.

#### 2.1.1 Verificación de patrones y reactivos

El proceso de validación requiere del uso de patrones de referencia con certificado de pureza o de incertidumbre, esto permite dar certeza a las medidas realizadas. Se hizo una lista de los reactivos a utilizar en la validación de las metodologías, la lista de reactivos aplica para todas las metodologías empleadas. Utilizar sustancias grado analítico en todos los métodos. Otros grados podrán utilizarse, siempre que sea comprobado previamente que el reactivo es de una pureza suficientemente alta para permitir su uso sin disminuir la exactitud de la determinación. Si la pureza de un reactivo es cuestionable, analizar el reactivo para determinar el nivel de impurezas. El blanco de reactivo debe ser inferior para poder ser usado.

- *Agua destilada*. El agua empleada debe estar libre de interferencias.
- *Ácido nítrico concentrado, HNO<sub>3</sub>*. El ácido debe ser analizado para determinar el nivel de impurezas. Si el blanco del método es <LDM, el ácido puede ser utilizado.
- *Ácido clorhídrico (concentrado), HCl*. El ácido debe ser analizado para determinar el nivel de impurezas. Si el blanco del método es <LDM, el ácido puede ser utilizado.

- Peróxido de hidrógeno (30%), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este oxidante debe ser analizado para determinar el nivel de impurezas. Si el blanco del método es <LDM, el peróxido puede ser utilizado.
- Soluciones estándar stock. La solución stock corresponde a una solución comercial de una concentración de 1000 mg Se/L.
- Úrea.
- Borohidruro de sodio
- NaOH

### 2.1.2 Chequeo de procedimientos

Para cada una de las metodologías se revisaron los procedimientos propuestos, se hicieron algunas modificaciones según los ensayos realizados y posteriormente se utilizaron para validar e implementar.

2.1.2.1 Modificación del método. Al realizar el montaje del método se encontró que para este análisis se realizó una modificación en el sistema de digestión la cual se llevó a cabo en forma cerrada y no en sistema abierto como sugería el método. Este cambio fue realizado debido a que se obtuvieron mejores porcentajes de recuperación en la digestión con tubo cerrado respecto al sistema abierto, lo que permitió concluir que las pérdidas en el sistema cerrado eran menores por la existencia de algunos compuestos de selenio volátiles.

A continuación se presentan los datos obtenidos en la implementación de la digestión con tubo abierto y cerrado así como el análisis estadístico de estos datos:

Tipo de digestión	medida 1	medida 2	Medida 3	medida 4	Medida 5	Promedio	Desviación estándar	CV	Error relativo
Cerrada	8,41	8,11	8,72	8,11	8,27	8,324	0,2543	3,05	4,05
Abierta	6,85	6,86	6,49	5,94	6,4	6,51	0,3793	5,83	23.4

Tabla 2. Modificación del método

Al analizar los porcentajes de recuperación obtenidos con el error relativo se obtienen mayores porcentajes de recuperación y menores errores relativos con el método de digestión de tubo cerrado lo que conllevó a la adopción de esta modificación en el método.

2.1.2.2 Selenio total en suelos. Se modificó e implementó el método de la EPA, Environmental Protection Agency [SW 846, On-line]. Method 3050B: Acid digestion of sediments, sludge and soils. United States, 1996. [Revision 2]. Pesar entre 1-2 g de muestra (peso húmedo) ó 0,25 a 1,0 g de muestra (peso seco) y transferir al recipiente donde se va a realizar la digestión. Para las muestras con alto contenido de líquido, puede utilizarse una mayor cantidad de muestra siempre y cuando se complete la digestión, ésta digestión se debe llevar a cabo en un sistema cerrado.

Agregar 3 mL de  $\text{HNO}_3$ , agitar y tapar los frascos de tapa rosca. Calentar la muestra durante 15 a 20 minutos evitando la ebullición o a ebullición suave. Si se generan humos de color marrón, que indica la oxidación de la muestra por el  $\text{HNO}_3$ , repetir este paso (adición de 5 ml de  $\text{HNO}_3$  concentrado por 30 minutos más) hasta que no haya desprendimiento de humo marrón, lo que indica la reacción completa con el  $\text{HNO}_3$ .

Una vez se ha completado la digestión y la muestra se ha enfriado, añadir 2,0ml de agua destilada y 3,0ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%. Este procedimiento se hace añadiendo 1 mL de Peróxido cada 5 minutos consecutivamente hasta completar el volumen de 3 mL (no añadir más de un total de 4 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% por muestra.). Tapar el recipiente y colocarlo para realizar la digestión sobre la fuente de calor para calentamiento y así empezar la reacción con el peróxido. Se debe evitar que se produzca la pérdida de muestra debido a la excesiva efervescencia. Calentar la muestra hasta que desaparezca la efervescencia y enfriar el recipiente (aproximadamente 95 °C).

Luego de que la efervescencia sea nula se deja enfriar el recipiente y se le adicionan 5 ml de HCl concentrado ( $\approx 37\%$ ) y se calienta aproximadamente 15 minutos para completar así el proceso de digestión. Para la lectura en el equipo de Absorción atómica se hace la respectiva reducción de la especie de selenio + VI a Se +IV descrita en el numeral 2.1.2.4

2.1.2.3 Selenio total en aguas. La metodología empleada para la determinación de Selenio total en Aguas fue la siguiente: STANDARD METHODS for the Examination of Water and Wastewater, APHA/ AWWA/ WEF, 21st edition, 2005. American Public Health Association 1015 Fifteenth Street, NW. Washington, D.C. Part 3030F "Nitric acid-hydrochloric acid digestion.

Transferir un volumen medido (se recomienda un volumen de 25- 50 mL) de muestra al recipiente de digestión. Añadir 1,5 ml de  $\text{HNO}_3$  concentrado. Realizar la digestión en frascos tapa rosca de tal forma que la digestión se realice a través de un sistema cerrado. Llevar a ebullición lenta hasta completar un tiempo de 45 minutos, dejar enfriar y volver a añadir 2,5 mL de  $\text{HNO}_3$  dejando que su digestión sea completa por un tiempo de 45 minutos. (solución de color claro).

Dejar enfriar la solución anterior y adicionar 5 ml de HCl 1:1, Llevar a ebullición lenta hasta que la digestión se haya completado.

Dejar enfriar y enjuagar las paredes del recipiente de reacción y la tapa con agua destilada. Filtrar con papel Whatman No. 41, para eliminar posibles residuos sólidos, en un balón aforado de 50 mL ó un balón aforado de volumen deseado. Aforar con agua destilada y agitar vigorosamente la solución.

Tomar las porciones necesarias para la determinación de Selenio y continuar con la actividad del numeral 2.1.2.4 del presente procedimiento para la reducción del Selenio y la determinación por espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros.

2.1.2.4 Selenio disuelto en aguas. **Los análisis se realizaron a las mismas muestras de agua recolectadas para la determinación de Selenio total, pero éstas fueron sometidas a un proceso de filtración, por tanto, las verificaciones, protocolos, intervalo de aplicación, método de referencia y demás factores son los que se enunciaron anteriormente.**

Para el análisis de Selenio disuelto es necesaria una filtración previa de la muestra colectada y sin acidificar. Se toma un filtro de membrana con porosidad de 0.45  $\mu\text{m}$  y se coloca en el equipo de filtración al vacío. El filtro debe ser lavado con agua desmineralizada antes de utilizarlo en el método. Se filtra un volumen aproximado de 100 mL de la muestra sin acidificar. Después, de la etapa de filtrado se sigue la etapa de reducción de selenio en la muestra del numeral 2.1.2.5.

2.1.2.5 Preparación de la muestra. Reducción del selenio. Transferir una alícuota digerida de 10 ml a un balón aforado de 25 ml y agregar 10 ml de ácido clorhídrico concentrado (~37%) de tal forma que la concentración final sea de 40% (v/v). Posteriormente, añadir 1,0 ml de solución de úrea al 100 % (p/v), de tal forma que la concentración final de úrea sea del 4% (p/v);.Dejar en reposo entre 12–24 horas para permitir la reducción de las especies de Selenio a Se (IV). Alternativamente, se puede calentar en un sistema cerrado por 30 minutos sin permitir la ebullición y finalmente llevar a volumen antes de la lectura en el equipo de FLAA/GH. Justo antes de la lectura en el equipo FLAA/GH se afora al volumen de muestra deseado, para este caso a 25 mL; y se agita fuertemente para garantizar una solución homogénea.

### **2.1.3 Equipos Y Material**

Se realizó una listado de equipos utilizados en la validación de selenio, los cuales se les realizó un mantenimiento preventivo correspondiente, el cual garantizará

óptimas condiciones de funcionamiento y posteriormente un buen resultado de análisis.

2.1.3.1 Balanza analítica. La empresa Metrolabor Ltda. Entidad que tiene autorización para realizar calibración de balanzas, verificó y calibró la balanza analítica del Laboratorio de Consultas Industriales, expidiendo el correspondiente certificado de calibración.

2.1.3.2 Espectrofotómetro de absorción atómica. Marca Agilent Technologies, modelo AA240FS, que cuenta con un Generador de Hidruros, marca Agilent Technologies, modelo VGA77. Estos equipos fueron revisados, probados y calibrados por la empresa Agilent (México) una vez instalados en el Laboratorio de Consultas Industriales.

#### **2.1.4 Verificación Del Material Volumétrico [10]**

Se realizó todo el listado del material volumétrico necesario para desarrollar la validación de las metodologías, identificando así el material aforado que necesita ser verificado. Se llevó a cabo el procedimiento interno del laboratorio para la verificación de todo el material volumétrico usado para la validación de los métodos, el material utilizado es igual para las metodologías de Se total y disuelto en aguas y Se total en suelos.

#### **2.2 PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN**

Una vez se ha garantizado que los equipos funcionan en condiciones óptimas, se procede a la optimización de variables instrumentales, la curva de calibración, la linealidad, el intervalo de trabajo, el diseño experimental, la evaluación de las figuras de mérito y el cálculo de la Incertidumbre que será igual para los métodos de Se total y disuelto en aguas, y Se total en suelos.

### **2.2.1 Optimización de variables instrumentales**

Se verificaron y evaluaron todas las condiciones instrumentales, para garantizar estos parámetros y tener la certeza de que los resultados de las lecturas de los patrones y muestras en el equipo fueran confiables y exactos. En el equipo el fabricante sugiere algunos parámetros para la optimización de variables, las cuales se sometieron a un estudio con base en esa información.

2.2.1.1 Optimización del método de generación del hidruro. Antes de comenzar la optimización del Generador se realizaron ajustes en la posición de la lámpara y la altura del mechero con la celda de cuarzo para que el valor de la señal fuera la de una mayor absorbancia, se ajustó el cero y se procedió a evaluar las concentraciones de Borohidruro con una solución de 0,4% de NaOH en una solución de 5M de HCl.

Se evaluaron diferentes concentraciones del reductor teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante y otras citadas en artículos científicos. 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 1.5, todos en porcentaje peso-volumen (%p/v) de NaBH<sub>4</sub> en la solución de NaOH. Utilizando un patrón de 8,5 µg Se/L, el cual debe dar una absorbancia de 0.2, haciendo la lectura con la longitud de onda  $\lambda=196$  nm.

2.2.1.2 Proporción aire- acetileno. Se verificó la proporción más adecuada de la concentración de Aire-Acetileno en la llama para obtener mejores resultados de absorbancia, para esto se utilizó un patrón de 8,5 µg Se/L, haciendo la lectura con la longitud de onda  $\lambda=196$  nm.

2.2.1.3 Tiempo de pre-lectura de la muestra

Se optimizaron los valores de pre- lectura de la muestra, el tiempo en el cual el generador toma la muestra, la lleva directamente a la llama y se produce la lectura en el equipo los valores evaluados según el método fueron 35,40 y 45 segundos, respectivamente.

### **2.2.2 Curva de calibración**

Solución estándar de trabajo de 1000 µg Se/L, de la cual se toman respectivamente 25 µL de la solución stock de selenio y se diluyen a 25 mL. Con esta solución estándar de trabajo se prepara la respectiva curva de calibración. A todos los patrones de la curva de calibración se les adiciona HCl concentrado cuya concentración final debe ser al 10%(v/v).

La preparación de los distintos patrones de la curva de calibración se hizo de acuerdo con las siguientes indicaciones:

- 3 µg Se/L: Se tomaron 75 µL del patrón de 1000 µg Se/L y se diluyeron a 25 mL.
- 6 µg Se/L: Se tomaron 150 µL del patrón de 1000 µg Se/L y se diluyeron a 25 mL.
- 8 µg Se/L: Se tomaron 200 µL del patrón de 1000 µg Se/L y se diluyeron a 25 mL.
- 10 µg Se/L: Se tomaron 250 µL del patrón de 1000 µg Se/L y se diluyeron a 25 mL.
- 12 µg Se/L: Se tomaron 300 µL del patrón de 1000 µg Se/L y se diluyeron a 25 mL.
- 15 µg Se/L: Se tomaron 375 µL del patrón de 1000 µg Se/L y se diluyeron a 25 mL.

### **2.2.3 Intervalo de validación.**

Según la curva de calibración descrita en el numeral anterior, el intervalo escogido de validación es de 0 a 15 µg Se/L. Y también se observó por medio gráfico que patrones que superan esta concentración se encuentran por fuera del rango lineal. Teniendo en cuenta los ítems descritos por el manual del equipo de absorción atómica se asegura una buena linealidad dentro de este rango de concentraciones.

#### 2.2.4 Linealidad

Se comprobó la linealidad con la ayuda de la prueba de *t* de *student* a la recta de mínimos cuadrados y así verificar que estos valores estaban dentro del rango de validación. Fue necesario utilizar una prueba estadística adecuada para ver si el coeficiente de correlación era realmente significativo, considerando el número de pares de valores usados en su cálculo. El método más simple fue calcular el valor *t* usando la ecuación:

$$t_{cal} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde *r* es el coeficiente de correlación y *n* el número de pares usados para calcular *r*. El valor calculado de *t* se compara con el tabulado al nivel de significación deseado, usando una prueba *t* de dos colas y (*n*-2) grados de libertad. La hipótesis nula en este caso es que no existe correlación entre X y Y. Si el valor calculado de *t* es mayor que el tabulado la hipótesis nula se rechaza y se concluye que existe una correlación significativa.

#### 2.2.5 Diseño experimental

Se tomaron y siguieron los aspectos fijados de validación que tiene implementado el Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander, para la verificación y validación de métodos analíticos. Las diferentes muestras se analizaron en orden aleatorio por un periodo de 6 días que pudieron ser consecutivos o no.

- Blancos Enriquecidos
- Soluciones Estándar (Material certificado para Suelos IDEAM año 2010) para evaluación de la exactitud.
- Soluciones para la evaluación de la precisión.

#### 2.2.6 Descripción de soluciones y patrones

Como primera medida se prepararon blancos enriquecidos para Se total en aguas y suelos, para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación de los métodos. Para el estándar de suelo se utilizó un Material de Referencia Certificado

(MRC) del IDEAM (2010), cuya concentración de Selenio es 304 mg/Kg. Para esto, se tomaron pesos de muestras para que la concentración se registrara en un punto a mitad de la curva y para la carta de control, se analizó una concentración de aproximadamente a 0.6 C, y para la evaluación de la precisión se prepararon soluciones de 0.09C y 0.9C, donde, C es la concentración tope de la curva de calibración.

Para aguas se preparó una solución estándar y se analizó esta muestra para que la concentración se registrara a mitad de la curva (0.6C) e igualmente patrones de 0.09C y 0.9C para la evaluación de precisión en la metodología de Se total y disuelto en aguas.

## 2.2.7 Figuras de mérito

### 2.2.7.1 El límite de detección

Con los datos de los blancos enriquecidos se determinó el límite de detección, calculando la desviación estándar y aplicando la ecuación:

$$\mathbf{LDM} = X_{prom} + 3s \quad (\text{Ecuación 7})$$

$X_{prom}$  es el valor medio de las determinaciones y S es la desviación estándar de las medidas.

### 2.2.7.2 El límite de cuantificación

Con el valor medio y desviación estándar de las medidas usadas en el cálculo del límite de detección se calculó el límite de cuantificación utilizando la ecuación:

$$\mathbf{LCM} = X_{prom} + 10s \quad (\text{Ecuación 8})$$

$X_{prom}$  es el valor medio de las determinaciones y S es la desviación estándar.

### 2.2.7.3 Precisión

La precisión del método se estimó mediante el cálculo del coeficiente de variación obtenido de las soluciones preparadas de 0.09C y 0.9C.

#### 2.2.7.4 Exactitud

Se calculó el porcentaje de recuperación para el MRC del IDEAM (Suelos) y el patrón de 0.6C para aguas.

### 2.3 ELABORACIÓN DE LAS CARTAS DE CONTROL.

#### 2.3.1 Carta de control para suelos

Se pesó una cantidad promedio en 0,030 gramos del MRC del IDEAM, para que diera una lectura cercana a 0.6C de la curva de calibración. Con esas medidas se elaboró la carta de control para suelos.

#### 2.3.2 Carta de control para aguas

Se monitoreó por un intervalo de 10 días la concentración de un patrón de 7 µg Se/L para aguas, con estos datos se elaboró la carta de control analítico identificando los límites:

**LCS=** Límite de control superior

**LAS=** Límite de advertencia superior

**LAI=** Límite de advertencia inferior

**LCI=** Límite de control inferior

### 2.4 CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE.

El cálculo de la incertidumbre se realizó para las técnicas validadas tanto en matrices de agua como suelo.

#### 2.4.1 Caracterización de las fuentes individuales de incertidumbre.

En cada uno de los diferentes pasos de las metodologías validadas se identificaron las diversas fuentes de incertidumbre las cuales deben ser cuantificadas, combinadas y expandidas para lograr estimar la incertidumbre total de la metodología.

2.4.1.1 Incertidumbre en la determinación de selenio total en suelos. Se identificaron como fuentes individuales de incertidumbre en la determinación de Selenio en suelos los siguientes factores: a) la pesada, b) la dilución de muestra, c) la preparación de los patrones y d) la lectura de la curva de calibración.

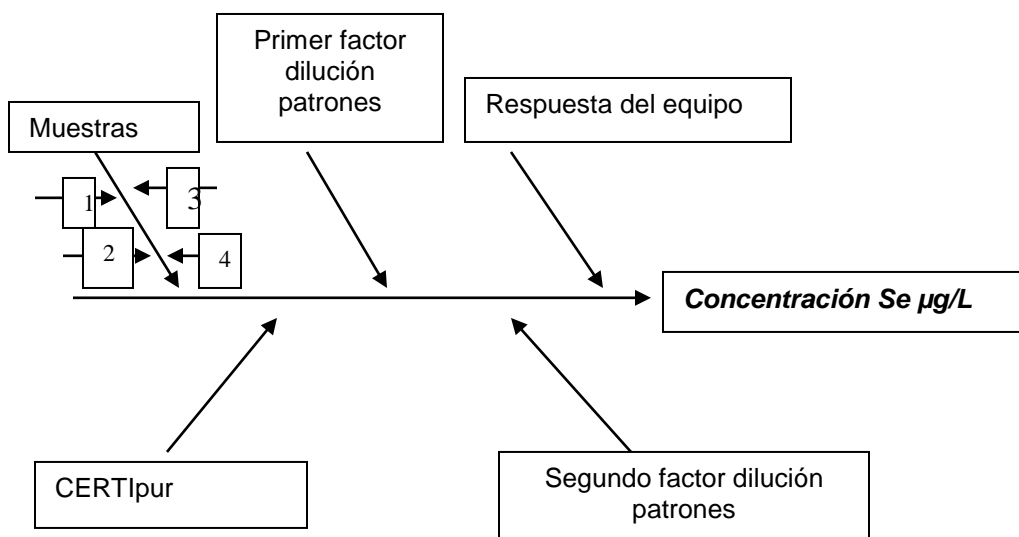


Figura 2. Fuentes de incertidumbre, selenio total en suelos.

<b>MUESTRAS</b>
1. Pesada de las muestras.
2. Aforo en un balón de 100 mL.
3. Alícuota de la muestra ya previamente digerida 10 mL.
4. Aforo de la alícuota en balón de 25 mL.
certiPUR Se
Incertidumbre asociada al patrón de Se
Preparación de la solución patrón
Incertidumbre asociada a la preparación de la solución de trabajo 1000 µg Se/L
Preparación de los patrones de la curva
Incertidumbre debida a las preparaciones de las soluciones de los patrones de la curva
Respuesta del equipo
Incertidumbre debida a la lectura del equipo

Tabla 3. Fuentes de incertidumbre selenio total en suelos

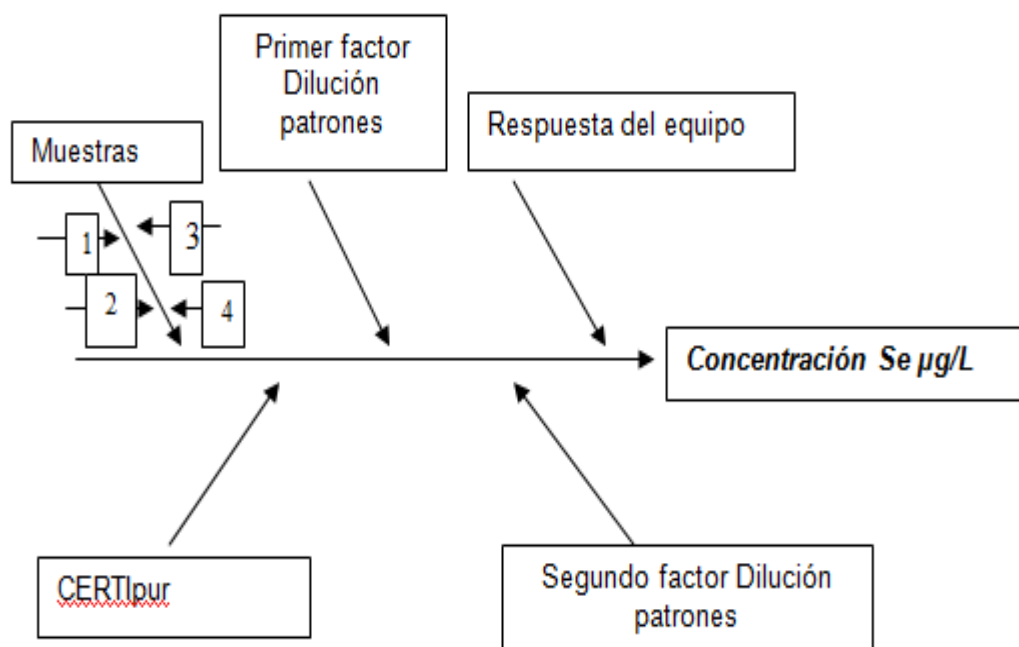


FIG 3. Fuentes de incertidumbre, selenio total en Aguas.

<b>MUESTRAS</b>
1. Toma de muestra pipeta de 25 mL
2. Aforo en un balón de 50 mL.
3. Alícuota de la muestra ya previamente digerida 10 mL.
4. Aforo de la alícuota en balón de 25 mL.
certiPUR Se
Incertidumbre asociada al patrón de Se
Preparación de la solución patrón
Incertidumbre asociada a la preparación de la solución de trabajo 1000 µg Se/L
Preparación de los patrones de la curva
Incertidumbre debida a las preparaciones de las soluciones de los patrones de la curva
Respuesta del equipo
Incertidumbre debida a la lectura del equipo

Tabla 4. Fuentes de incertidumbre selenio total en aguas.

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 3.1 PREVALIDACIÓN

#### 3.1.1 Verificación de Patrones

- *Agua destilada.*
- *Ácido nítrico concentrado, HNO<sub>3</sub>.*
- *Ácido clorhídrico (concentrado),*
- *Peróxido de hidrógeno (30%)*

Se revisaron los certificados de análisis por parte de los proveedores de cada reactivo, se hizo una verificación de los reactivos a utilizar, para descartar cualquier contaminación de selenio en cada uno de estos, los resultados fueron menores al límite de detección de los métodos, lo que indica que se comportan como blancos.

#### 3.1.2 Verificación de Material Volumétrico

El material usado para la validación de los métodos fue verificado, mediante el método de medir el volumen de agua y obtener los valores y compararlos con la tolerancia de cada material, pipeta aforada de 10 y 25 mL balones de 25, 50 y 100 mL, pipetas aforadas de 10 y 25 mL, y las micropipetas de 10-100µL y 100-1000µL respectivamente.

MEDIDAS	PIPETA 10 mL	PIPETA 25 mL	BALON 25 mL	BALON 50 mL	BALON 100 mL	MICROPIPET A 10-100 $\mu$ L	MICROPIPE T 100-1000 $\mu$ L
1	10.0137	25.0151	25.0517	49.9588	99.9076	0.1008	1004
2	9.9938	24.9971	25.0205	49.9625	99.9372	0.1007	1007
3	9.9875	24.9671	24.9700	49.9353	99.8500	0.1005	1005
4	9.9988	24.9695	25.0717	49.9153	99.9058	0.1003	1003
5	10.0094	24.9651	25.0786	50.0074	99.9176	0.1008	1008
6	9.9980	24.9760	25.0610	49.9563	99.9147	0.1002	1002
7	10.0000	24.9710	25.0599	49.9688	99.9360	0.1010	1010
8	9.9966	24.9526	25.0567	49.8720	99.9460	0.0998	998
9	10.0078	24.9582	25.0745	49.9315	99.9305	0.1004	1004
10	10.0064	24.9381	25.0631	49.9495	99.9070	0.1012	1012
Promedio	10.0012	24.9710	25.0508	49.9457	99.6426	0.1004	1006
Corrección	-0.0012	-0.0289	-0.0508	-0.0054	-0.0848	0.0006	0,0053
s	0.008	0.022	0.0326	0.036	0.0270	0.0004	0,0041
Tolerancia	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$	$\pm 0,04$	$\pm 0,06$	$\pm 0,1$	$\pm 0,08$	$\pm 0,08$

Tabla 5. Verificación de material volumétrico

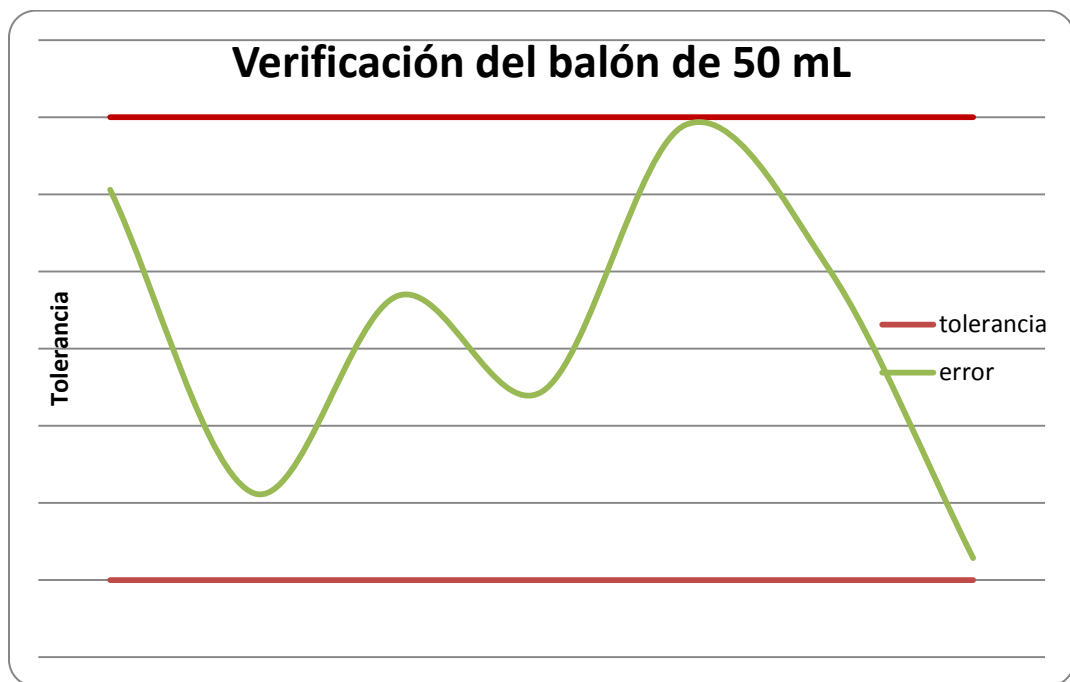


Figura 4. Verificación volumétrica del balón de 50 MI

## 3.2 VALIDACIÓN [22]

### 3.2.1 Optimización de variables instrumentales

#### Optimización de la Generación del Hidruro

NaBH <sub>4</sub> (%p/V)	NaOH (%p/V)	Absorbancia
0,2	0,4	0,2042
0,3	0,4	0,2411
0,4	0,4	0,2018
0,5	0,4	0,1963
1	0,4	0,1832
1,5	0,4	0,1711

Tabla 6. Optimización con concentraciones de reductor para generación del hidruro de selenio

Como se ilustra en la tabla 6, observamos los valores de concentración de borohidruro utilizados en la optimización, el valor que mejor reportó absorbancia para el patrón de 8,5µg Se/L fue la concentración utilizada de 0,3 (%p/v), concentraciones de reductor mayores a este valor reportan menor absorbancia, esto es debido a que se genera una mayor efervescencia que causa interferencia en la separación líquido-gas del reactor del generador de hidruros.

Gráficamente podemos observar el comportamiento de la absorbancia frente a la concentración del agente reductor. El uso de concentraciones altas de reductor también ha sido asociado con curvas de calibración no lineales, con coeficientes de correlación ( $R^2$ ) bajos.

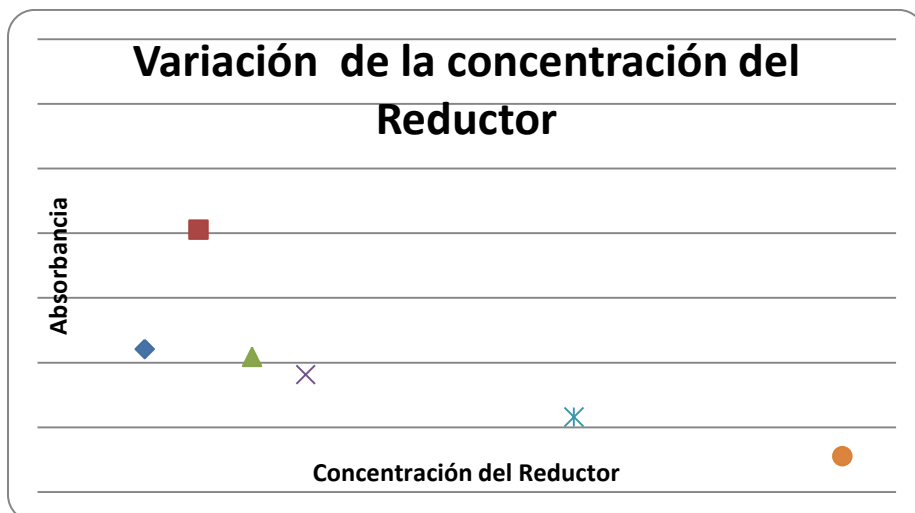


Figura 5. Concentración de Reductor Vs Absorbancia

3.2.1.1 Proporción Aire –Acetileno. Cada elemento que es capaz de formar fácilmente un hidruro tiene una temperatura específica de atomización, las concentraciones de aire y acetileno suministradas a la llama fueron sometidas a estudios para lograr la mayor eficiencia. Los resultados de estos estudios se presentan en la tabla 7.

Aire (L/min)	Acetileno (L/min)	Absorbancia
13,4	3,1	0,1876
12,0	2,5	0,2132
11,5	2,0	0,2312
11,0	1,5	0,2431

Tabla 7. Proporción aire -acetileno

La relación estequiométrica óptima en la reacción de combustión es 2 moles de Acetileno por 5 moles de Oxígeno, los cálculos realizados para la relación de máxima absorbancia Aire/Acetileno= 7,3 (L/min) como resultado que esa cantidad de acetileno (1,5 L/min) debe reaccionar con aproximadamente (11,0 L/min) de Aire. Esto quiere decir que la combustión de la llama es completa y permite que el hidruro se atomice totalmente en la celda.

3.2.1.2 Tiempo de pre-Lectura de la muestra. En la figura 6 se observa que la absorbancia máxima se alcanza después de los 45 segundos de estar en contacto la muestra con los reactivos del proceso de generación del hidruro en el equipo. Con este intervalo de tiempo se garantiza que la muestra ya ha culminado el ciclo por el generador y la atomización dentro de la celda de cuarzo y poder así hacer la respectiva lectura. Para la limpieza del reactor del generador se dejó un tiempo aproximado de 50 segundos entre el paso de muestras para evitar el efecto memoria e introducir error en medidas.

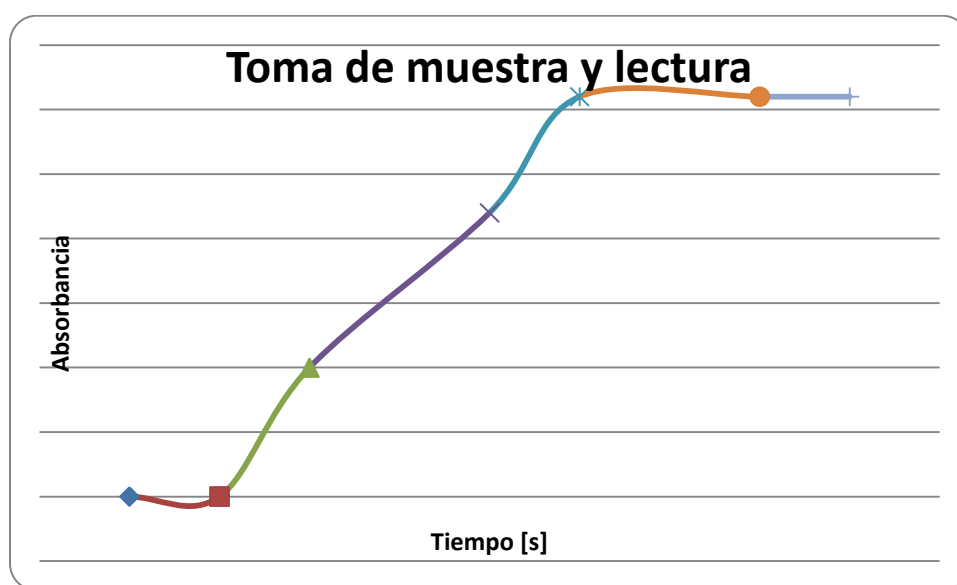


Figura 6. Tiempo de pre-lectura de las muestras.

### 3.2.2 Curva de calibración

Según los parámetros que recomienda la compañía fabricante del equipo, ilustran en el manual de funcionamiento que la curva de calibración para Selenio es lineal aproximadamente hasta un valor de  $15\mu\text{g Se/L}$ . Se tomó este rango de referencia para hacer la validación ya que los coeficientes de correlación se ajustan dentro de los parámetros aceptados los cuales deben ser mayores a 0,995.

Concentración (µg/L)	Absorbancia
0	-0,009
3	0,0789
6	0,165
8	0,2359
10	0,2798
12	0,3306
15	0,4207

Tabla 8. Promedio de la Absorbancia de los patrones en los diferentes días evaluados

Tomando estos valores se hizo la respectiva gráfica y se observó el coeficiente de correlación, el cual se ajusta a un comportamiento lineal  $R^2 = 0,9993$ . Lo que demuestra la linealidad del intervalo de concentraciones utilizada. Se leyeron estos patrones de Selenio por 7 días diferentes, en la tabla 9 se ilustran las lecturas de los patrones.

Patrón µg/L	día 1	día 2	día 3	día 4	día 5	día 6	día 7	Promedio
<b>0</b>	0	0,001	0,0004	0,0011	0,0028	0,0021	0	0,0010
<b>3</b>	0,0749	0,0724	0,0765	0,069	0,1036	0,1065	0,1045	0,0867
<b>6</b>	0,1575	0,1549	0,1626	0,1254	0,2052	0,2087	0,2045	0,1741
<b>8</b>	0,2171	0,2045	0,2209	0,1816	0,2714	0,2735	0,2718	0,2344
<b>10</b>	0,277	0,2618	0,2742	0,2303	0,3326	0,3347	0,3306	0,2916
<b>12</b>	0,3339	0,3176	0,332	0,2863	0,3906	0,3947	0,3917	0,3495
<b>15</b>	0,4238	0,3868	0,4106	0,3643	0,4682	0,4691	0,4679	0,4272
<b>r</b>	0,9990	0,9992	0,9997	0,9962	0,9972	0,9965	0,9970	0,9978
<b>m</b>	0,0284	0,0262	0,0276	0,0242	0,0314	0,0314	0,0315	0,0286
<b>b</b>	0,0074	0,0019	0,0022	0,0072	0,0116	0,0013	0,0103	0,0059

Tabla 9 Lectura de patrones de selenio

Con los valores promedio se construyó la curva de calibración que aparece en la figura 7.

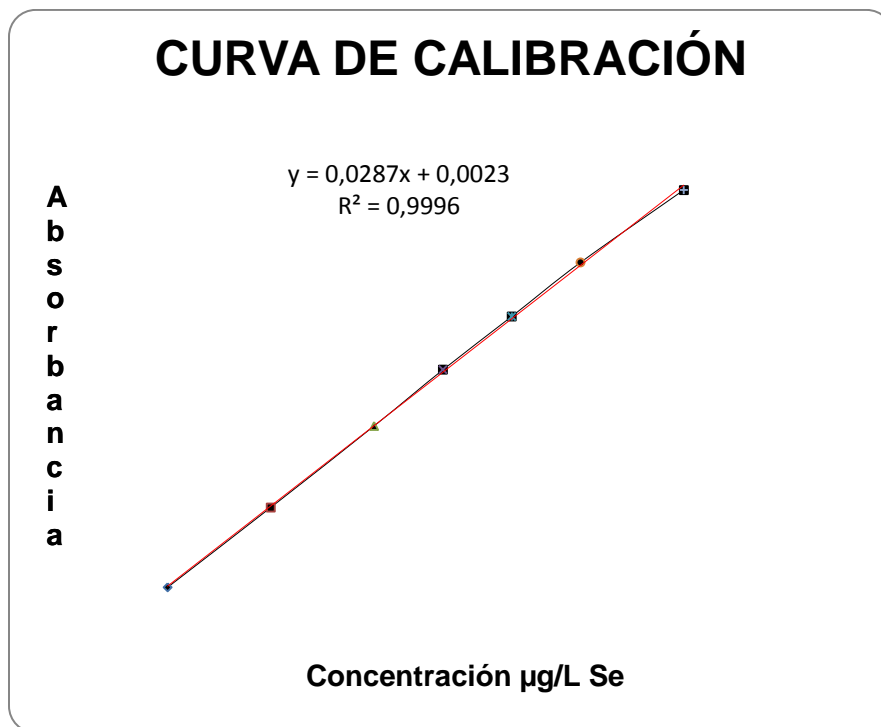


Figura 7. Curva de calibración de selenio

### 3.2.3 Intervalo de validación.

Con los datos obtenidos de la curva de calibración, se escoge como intervalo de validación el rango de concentraciones de 0 a 15µg Se/L. Con las pruebas realizadas se puede observar la correlación lineal y por tanto validar la metodología implementando éstas concentraciones.

### 3.2.4 Linealidad

Se realizó la prueba *t* de *Student* a la recta de mínimos cuadrados para comprobar la linealidad dentro del rango de validación. Esta prueba permite verificar estadísticamente si los datos tienen correlación lineal.

El valor calculado *t* con la ecuación 6, se compara con el valor tabulado, se propone una hipótesis nula, en este caso que no existe correlación entre *Y* y *X*. Si el valor calculado es mayor que el tabulado la hipótesis nula se rechaza y se concluye que hay una relación significativa.

Hipótesis Nula: No existe correlación entre *Y* y *X*.

$t_{cal} = 79,03$  reemplazando  $r$  en Ec.1.6 con  $n=7$

$t_{tab} = 2,57$  con Intervalo de confianza del 95% y 4 grados de libertad.

Como  $t_{cal} > t_{tab}$  se rechaza la hipótesis y si hay correlación entre  $Y$  y  $X$ .

### 3.2.5 Diseño experimental

3.2.5.1 Diseño experimental para el análisis de selenio total en suelos. En la metodología de validación de Selenio total en suelos se utilizaron blancos enriquecidos para poder determinar el parámetro del límite de detección del método y el límite de cuantificación. Para esto se usó un suelo que contenía poca materia orgánica suministrado por el Laboratorio de Consultas Industriales.

Se evaluó este suelo para cuantificar la concentración de Selenio presente en sistema de digestión abierto y cerrado, de lo anterior se obtuvo mejores resultados al implementar el sistema cerrado, con lo cual se comprueba su mayor eficiencia en comentarios posteriores. (ver numeral 3.2.5.1.4).

Fueron preparados los blancos del suelo y blancos enriquecidos sometiéndose al proceso de digestión descrito en el numeral 2.1.2.1, a los cuales se les evaluó el criterio de porcentaje de coeficiente de variación, para poder así determinar el valor de concentración diferente al blanco y cuáles de estos valores eran los más adecuados a los porcentajes de recuperación, las concentraciones de los blancos enriquecidos de eran de 0,1, 0,3 y 0,4  $\mu\text{g/L}$ .

MUESTRA	LECTURA EQUIPO $\mu\text{g/L}$	%CV
BLANCO SUELO	0	75,46
0,1	0,05	51,2
0,3	0,24	38,2
0,4	0,37	12,5

Tabla 10. Blancos enriquecidos en la matriz de suelo

Se puede observar en la tabla 10, que las concentraciones de 0,1, 0,3  $\mu\text{g/L}$  tienen un alto valor en el coeficiente de variación y se deduce que las muestras con esas

concentraciones se comportan como blancos. El valor del blanco enriquecido 0,4 µg Se/L, tiene un coeficiente de variación menor, por lo cual su valor para la determinar el límite de detección del método es más adecuado.

CONCENTRACIÓN BLANCO ENRIQUECIDO 0,4µg Se/L	
	0,383
	0,367
	0,372
	0,401
	0,359
Promedio	0,375
Desviación Estándar	0,046

Tabla 11. Promedio de blanco enriquecido para la determinación de selenio en suelo

### 3.2.5.1.1 Límite de detección y límite de Cuantificación.

Utilizando las ecuaciones 1.7 y 1.8, podemos calcular el límite de detección y de cuantificación. Los datos se encuentran reportados en la siguiente tabla. El valor de concentración debe expresar en mg/Kg de suelo, por eso se multiplica por 0,1L que es el volumen del aforo y se divide en el peso promedio del suelo con el que se hicieron los análisis 1g. Con este valor promedio se calculó el límite de detección y el límite de cuantificación.

METAL	$X_{\text{promedio}}$ (mg/Kg)	Desviación estándar (s) (mg/Kg)	Coeficiente de variación (%)	Límite de detección del método (LDM) (mg/Kg)	Límite de cuantificación del método (LCM) (mg/Kg)
Selenio (Se)	0,037	0,0046	12,5	0,052	0,084

Tabla 12. Límite de detección y límite de cuantificación para la determinación de selenio en suelos.

### 3.2.5.1.2 Precisión del Método

La precisión del método se evaluó en términos del coeficiente de variación obtenido durante la evaluación de dos muestras reales (M1, M2) durante 7 días. En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos.

Muestra	Medida 1 (µg/l)	Medida 2 (µg/l)	Medida 3 (µg/l)	Medida 4 (µg/l)	Medida 5 (µg/l)	Medida 6 (µg/l)	Medida 7 (µg/l)	Promedio (µg/l)	CV (%)
M1	3,39	3,46	4,15	3,72	3,73	3,56	4,17	3,74	8,36
M2	11,11	10,21	13,02	12,23	11,71	10,71	10,75	11,39	8,63

Tabla 13. Determinación de la Precisión en la determinación de selenio en suelos.

El coeficiente de variación obtenido es del 8,36 % valor que se encuentra dentro del valor aceptado (20%) dado que la muestra analizada presenta una baja concentración aproximada de (3.74 µg/L). Así mismo el coeficiente de variación de la muestra M2 es 8,63% valor que cumple el criterio de aceptación para muestras de rango alto (10%).

#### 3.2.5.1.3 Exactitud del Método

La exactitud se evaluó en % Error relativo, mediante el análisis del material de referencia certificado (MRC) empleado en las pruebas interlaboratorios con el IDEAM del año 2010. La exactitud se evaluó en tres puntos del rango de validación: Rango bajo (P1) (~0,09% de la concentración), rango medio (P2) (~0,5 % de la concentración) y rango alto (P3), (~0,9% de la concentración). Se empleó el mismo MRC, pero utilizando pesos de muestra diferentes. En la tabla 14 se presentan los resultados obtenidos.

Muestra	Concentración obtenida (µg/l)	Valor de referencia a MRC (mg/Kg)	Valor MRC obtenido promedio (mg/Kg)	Desviación estándar, S (mg/Kg)	CV (%)	Error Relativo (%)
Rango bajo (P1)	2,16	304	246,9	6,4	2,59	18,8
Rango medio (P2)	8,37		301,9	23,0	7,63	0,70
Alto rango (P3)	12,7		338,63	37,58	11,1	11,4

Tabla 14. Exactitud del método en la determinación de selenio en suelos

Los valores obtenidos están dentro del rango de aceptación reportado en los resultados de las pruebas de evaluación desempeño del IDEAM en el año 2010.

La variación de estos valores pudo ser debido a la gran cantidad de metales que presentaba esta muestra, algunos elementos pueden reaccionar ocasionando interferencias, pero no son significativas ya que los valores se encuentran dentro de los límites especificados.

### 3.2.5.2 Diseño experimental para la determinación de selenio total en aguas

Para la validación de Selenio total en aguas al igual que en la matriz de suelo se utilizaron blancos enriquecidos para determinar los parámetros como, el límite de detección y el límite de cuantificación. Se utilizaron muestras de agua natural suministradas por el Laboratorio de Consultas Industriales, y se hicieron adicionados de concentraciones bajas de Selenio, se evaluaron los coeficientes de variación de los blancos enriquecidos y el valor elegido fue 0,4 µg/L, ya que este valor presenta un %CV que es aceptable para rango bajo de concentración.

MUESTRA	LECTURA EQUIPO µg/L	%CV
BLANCO AGUA	0	97,6
0,08	0	71,2
0,15	0,028	28,2
0,4	0,31	30,5
0,5	0,55	7,12

Tabla 15. Blancos enriquecidos para determinación de selenio en aguas.

Utilizando este valor como concentración para el blanco enriquecido se realizaron análisis por 7 días y los resultados obtenidos se ilustran en la tabla.

CONCENTRACIÓN BLANCO ENRIQUECIDO 0,5µg/L Se	
	0,63
	0,55
	0,56
	0,58
	0,54
	0,57
Promedio	0,55
S	0,039

Tabla 16. Promedio blanco enriquecido para determinación de selenio en aguas.

3.2.5.2.1. Límite de detección y límite de Cuantificación. Con la ecuación calculamos el límite de cuantificación y el límite de detección para el método de selenio total en aguas, en la tabla 18, se pueden observar los valores de estas figuras de mérito y el coeficiente de variación de las medidas.

METAL	$X_{prom}$ (µg/L)	Desviación estándar, s (µg/L)	CV (%)	Límite de detección del método (LDM) (µg/L)	Límite de cuantificación del método (LCM) (µg/L)
Selenio (Se)	0,55	0,040	7,12	0,68	0,97

Tabla 17. Límite de detección y límite de cuantificación para determinación de Se en aguas.

El valor de los límites es un poco mayor que los suelos debido a las matrices y a los tratamientos de las muestras, en aguas, el tratamiento de la muestra en el ataque con ácido puede ser una fuente de pérdidas y la variación en concentraciones más bajas que en suelo es mayor.

3.2.5.2.2 Precisión del Método. La precisión del método se evaluó en términos del coeficiente de variación obtenido durante la evaluación de una muestra real. En la tabla No 19 se presentan los resultados obtenidos.

Muestra	Medida 1 (µg/l)	Medida 2 (µg/l)	Medida 3 (µg/l)	Medida 4 (µg/l)	Medida 5 (µg/l)	Medida 6 (µg/l)	Medida 7 (µg/l)	Promedio (µg/l)	CV (%)
M1	1,4	1,35	1,23	1,0	0,99	1,05	1,02	1,15	15,2

Tabla 18. Precisión del Método para la determinación de Se en aguas.

El coeficiente de variación obtenido es del 15,2% valor que se encuentra dentro del valor aceptado (20%) dado que la muestra analizada presenta una baja concentración aproximadamente (1.2 µg/l).

3.2.5.2.3 Exactitud del método. La exactitud se evaluó en términos del error relativo y las interferencias por matriz se evaluaron en términos del porcentaje de recuperación del analito (Se), mediante el análisis de la misma muestra real empleada para evaluar la precisión y en tres puntos del rango de validación: Rango bajo (P1) (~0,09% de la concentración), rango medio (P2) (~0,5% de la concentración) y rango alto (P3), (~0,9% de la concentración). En la tabla No.20 se presentan los resultados obtenidos.

Muestra	Valor esperado en concentración del adicionado (µg/l)	Valor obtenido en concentración del adicionado (µg/l)	Desviación estándar, S (µg/l)	CV (%)	% Recuperación
Rango bajo (P1)	1,35	1,33	0,090	6,79	98,3
Rango medio (P2)	8	7,97	0,418	5,24	99,7
Alto rango (P3)	13,5	13,6	0,67	4,94	100,53

Tabla19 Exactitud Método para determinación de selenio en aguas.

### 3.3 DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA CUANTIFICACIÓN DE SELENIO TOTAL EN SUELOS.

Se identificaron todas las fuentes de incertidumbre en la metodología validada de cuantificación de Selenio en suelos y se cuantificó la incertidumbre para el resultado final.

### 3.3.1 Pesada de las muestras.

En la pesada de cada muestra se reportan dos fuentes de incertidumbre, las cuales son: a) La incertidumbre dada por la división de la escala de la balanza y b) La incertidumbre en la calibración de la balanza.

3.3.1.1 Incertidumbre estándar en la división de la escala de la balanza. La mínima medida registrada por la balanza, es la división de escala de la misma, la incertidumbre estándar será: División= 0.0001g

$$U_{a1} = 0,0001 / \sqrt{3} = 0,000058$$

3.3.1.2 Incertidumbre estándar en la calibración de la balanza.

El certificado de calibración de la balanza emitido por MetroLabor presenta el siguiente valor de incertidumbre:  $U = 2,646 \times 10^{-4} + 1,55112 \times 10^{-6} * w$  Donde  $w$  es el peso de muestra. Para la metodología se pesó alrededor de 0.0340 gramos de muestra, por tanto la incertidumbre será:

$$U = 2,646 \times 10^{-4} + 1,55112 \times 10^{-6} * (0,0340) = 0,00026465$$
$$U_{a2} = 0,00026465 / \sqrt{3} = 1,527 \times 10^{-5}$$

3.3.1.3 Incertidumbre combinada en la pesada de las muestras.

$$U_{ac} = \sqrt{(U1)^2 + (U2)^2} = \sqrt{(0,000058)^2 + (1,527 \times 10^{-5})^2} = 0,0000581$$

3.3.1.4 Incertidumbre estándar relativa para la pesada de las muestras.

El cociente entre la incertidumbre combinada de la pesada de las muestras y el peso de muestra usado en la metodología, nos da el valor de la incertidumbre estándar relativa.

$$U_{ERBa} = Uac / 0.0117 = 0,0000581 / 0.0340 = 0.00172$$

### 3.3.2 Incertidumbre por dilución de muestras en un balón aforado de 100 mL.

Al transferir la muestra digerida de selenio en el balón de 100ml, se tiene en cuenta la contribución de la incertidumbre dada por el efecto de la temperatura, la repetibilidad y tolerancia del balón de 100 mL en este paso de la metodología.

#### 3.3.2.1 Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.

Esta fuente de incertidumbre está dada por la ecuación  $Ub1 = (4 * 2e^{-4} - 4 * V) / \sqrt{3}$ , donde V es el volumen del material usado en este caso, el balón de 100ml, se supone una distribución rectangular de los datos.

$$Ub1 = (4 * 2e^{-4} - 4 * 100) / \sqrt{3} = 0.0462$$

#### 3.3.2.2 Incertidumbre estándar por la repetibilidad del balón de 100 mL.

En la verificación del material volumétrico que se hizo para la metodología de Selenio, se calcula la desviación estándar y ésta se divide en el número de mediciones hechas en la verificación.  $Ub2 = s / \sqrt{n}$  Donde n es el número de réplicas.

$$Ub2 = 0.0270 / \sqrt{10} = 0.0085$$

#### 3.3.2.3 Incertidumbre estándar por la tolerancia del balón de 100 mL.

El fabricante del balón usado para la dilución de las muestras reporta un valor de tolerancia de  $\pm 0.1$  mL y se asume una distribución rectangular, por tanto la incertidumbre está dada por:

$$Ub3 = Tolerancia / \sqrt{3} = 0.1 / \sqrt{3} = 0.0577$$

3.3.2.4 Incertidumbre combinada por dilución de las muestras en un balón de 100 mL.

$$U_{bc} = \sqrt{(U_{b_1})^2 + (U_{b_2})^2 + (U_{b_3})^2} = \sqrt{(0,0462)^2 + (0,0087)^2 + (0,0577)^2} = 0,0496$$

3.3.2.5 Incertidumbre estándar relativa por dilución de las muestras en un balón de 100 mL.

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre  $U_{bc}$  y el volumen de aforo (100mL).

$$U_{ERBb} = U_{bc}/100 = 0.057/100 = 0.000570$$

3.3.3 Incertidumbre por dilución de muestras en un balón aforado de 25 mL.

Al diluir la muestra ya digerida del suelo para su preparación y posterior lectura en el equipo en un balón de 25 mL, se tiene en cuenta la contribución de la incertidumbre dada por el efecto de la temperatura, la repetibilidad y tolerancia del balón de 25 mL en este paso de la metodología.

3.3.3.1 Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura. Esta fuente de incertidumbre está dada por la ecuación  $U_{b_{25}} = (4 * 2e^{-4} - 4 * V) / \sqrt{3}$  y el volumen del material usado en este caso, el balón de 25 ml, se supone una distribución rectangular de los datos.

$$U_{b_{25}_1} = (4 * 2e^{-4} - 4 * 25) / \sqrt{3} = 0,0115$$

3.3.3.2 Incertidumbre estándar por la repetibilidad del balón de 25 mL.

En la verificación del material volumétrico usado en la metodología de suelos para Selenio, se calcula la desviación estándar y esta se divide en el número de mediciones hechas en la verificación.  $U_{b2} = s / \sqrt{n}$  Donde n es el número de réplicas.

$$Ub25_2 = 0,0326/\sqrt{10} = 0,0103$$

3.3.3.3. Incertidumbre estándar por la tolerancia del balón de 25 mL.

El fabricante del balón usado para la dilución de las muestras reporta un valor de tolerancia de  $\pm 0.04$  mL y se asume una distribución rectangular, por tanto la incertidumbre está dada por:

$$Ub25_3 = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0.04 / \sqrt{3} = 0.023$$

3.3.3.4 Incertidumbre combinada por dilución de las muestras en un balón de 25 mL.

$$Ub25c = \sqrt{(Ub25_1)^2 + (Ub25_2)^2 + (Ub25_3)^2} = \sqrt{(0,0115)^2 + (0,010)^2 + (0,023)^2} = 0,0121$$

3.3.3.5 Incertidumbre estándar relativa por dilución de las muestras en un balón de 25 mL.

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre  $Ub25c$  y el volumen de aforo (25 mL).

$$U_{ERB25} = Ub25c/25 = 0.0121/25 = 0.000484$$

### **3.3.4 Incertidumbre estándar por alícuota de 10 ml, para preparación de la muestra.**

Al tomar una alícuota de la muestra digerida del suelo con la pipeta de 10 ml, esta se afora en un balón de 25 ml, se tiene en cuenta la contribución de la incertidumbre dada por el efecto de la temperatura, la repetibilidad y tolerancia de la pipeta de 10 mL en este paso de la metodología.

### 3.3.4.1 Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.

Esta fuente de incertidumbre está dada por la ecuación  $U_{p10_1} = 4 * 2e^{-4} - 4 * V)/\sqrt{3}$  y el volumen del material usado en este caso, la pipeta de 10 mL, se supone una distribución rectangular de los datos.

$$U_{b10_1} = (4 * 2e^{-4} - 4 * 10)/\sqrt{3} = 0,0081$$

### 3.3.4.2 Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta de 10 mL.

En la verificación del material volumétrico usado en la metodología, se calcula la desviación estándar y esta se divide en el número de mediciones hechas en la verificación.  $U_{b2} = s / \sqrt{n}$ , Donde n es el número de réplicas.

$$U_{b10_2} = 0,008/\sqrt{10} = 0,00256$$

### 3.3.5.3 Incertidumbre estándar por la tolerancia de la pipeta de 10mL.

El fabricante del balón usado para la dilución de las muestras reporta un valor de tolerancia de  $\pm 0.02$  mL y se asume una distribución rectangular, por tanto la incertidumbre está dada por:

$$U_{b10_3} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0.02 / \sqrt{3} = 0.011$$

### 3.3.5.4 Incertidumbre combinada por alícuota tomada por la pipeta de 10mL.

$$U_{b10c} = \sqrt{(U_{b10_1})^2 + (U_{b10_2})^2 + (U_{b10_3})^2} = \sqrt{(0,0081)^2 + (0,025)^2 + (0,011)^2}$$

### 3.3.5.5 Incertidumbre estándar relativa por alícuota tomada por la pipeta de 10mL

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre  $U_{10c}$  y el volumen de aforo (10mL).

$$U_{ERB10} = U_{b10c}/10 = 0.0082/10 = 0.00082$$

### **3.3.6 Incertidumbre combinada del pesaje de las muestras y dilución de la digestión y preparación de las muestras.**

Para este cálculo se tienen en cuenta la contribución de la incertidumbre estándar relativa del pesaje de las muestras, del balón de 100 mL, del balón de 25 mL y de la pipeta de 10mL.

$$UA_S = \sqrt{(U_{ERBa})^2 + (U_{ERBb})^2 + (U_{ERB25})^2 + (U_{ERB10})^2} = 0,00172$$

### **3.3.7 Incertidumbre debida al primer factor de dilución (preparación de la solución patrón intermedio en la curva de calibración).**

En la metodología empleada en la validación se mencionó que para preparar los patrones de la curva de calibración primero se preparó una solución madre de 1000 µg Se/L a partir de la Solución CERTIpur certificado de 1000 ± 10 mg Se/L, midiendo 25 µL del estándar y aforando a 25 mL, para el cálculo de la incertidumbre se tiene en cuenta el aporte debido a la micropipeta de 10-100 µL y al balón de 25 mL

### **3.3.8 Incertidumbre generada por la micropipeta de 10-100µL.**

Se tiene en cuenta el aporte de la repetibilidad de la medida de 10-100µL, el efecto de la temperatura y la tolerancia de la pipeta.

3.3.8.1 Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la micropipeta. En la verificación del material volumétrico se obtuvo la desviación estándar de 10 mediciones de volumen, asumiendo una distribución normal, la incertidumbre está dada por:  $U_{mp1} = s / \sqrt{n}$  Donde n es el número de medidas.

$$U_{mp1} = 0.0004 / \sqrt{10} = 0.00013$$

3.3.8.2 Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura. Esta contribución se obtiene multiplicando: variación de la temperatura (4°C), el coeficiente de expansión del agua ( $2e^{-4}$ ) y el volumen del material volumétrico (10 mL) y una distribución rectangular.

$$U_{mp_2} = (4 * 2e^{-4} * 10) / \sqrt{3} = 0,0082$$

3.3.8.3 Incertidumbre estándar por la tolerancia de la micropipeta de 10- 100µL. El fabricante de la pipeta usada para la toma de la alícuota reporta un valor de tolerancia de  $\pm 0.08 \mu\text{L}$  y se asume una distribución rectangular, por tanto la incertidumbre está dada por:

$$U_{mp_3} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0.08 / \sqrt{3} = 0.046$$

3.3.8.4 Incertidumbre combinada de la micropipeta de 10-100µL.

$$U_{mpc} = \sqrt{(U_{mp_1})^2 + (U_{mp_2})^2 + (U_{mp_3})^2} = \sqrt{(0,00013)^2 + (0,0082)^2 + (0,046)^2} = 0,00231$$

3.3.8.5 Incertidumbre Estándar Relativa de micropipeta de 10-100µL

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre  $U_{mpc}$  y el volumen de la micropipeta (10-100µL).

$$U_{mpER} = U_{mpc} / 10 = 0.00023 / 10 = 0.000023$$

### 3.3.9 Incertidumbre generada por el balón de 25 mL (aforo)

Esta incertidumbre ya fue calculada en el apartado 3.3.3.5 En donde se obtuvo el valor de la incertidumbre estándar relativa.  $U_{ERB25} = 0.000484$

3.3.10 Incertidumbre estándar relativa del primer factor de dilución.

Se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa de la micropipeta de 10-100µL ( $U_{mpER}$ ) y la incertidumbre estándar relativa del balón de 25mL ( $U_{ERB25}$ )

$$U_{FD} = \sqrt{(U_{mpER})^2 + (U_{ERB25})^2} = \sqrt{(0,000023)^2 + (0,000484)^2} = 0,000023$$

### 3.4 INCERTIDUMBRE DEBIDA AL SEGUNDO FACTOR DE DILUCIÓN (PREPARACIÓN DE LOS PATRONES A PARTIR DE LA SOLUCIÓN PATRÓN INTERMEDIO)

Ya con la solución patrón intermedia preparada se prosigue a evaluar la incertidumbre generada durante el segundo factor de dilución, en donde a partir de la solución intermedia se tomaron las diversas alícuotas con una micropipeta de 100-1000  $\mu\text{L}$  y se aforaron en un balón de 25 mL para obtener los patrones de la concentración deseada.

#### 3.4.1 Incertidumbre generada por la micropipeta de 100-1000 $\mu\text{L}$ .

Siempre se tienen en cuenta los tres aportes para el material volumétrico: Repetibilidad de la micropipeta, efecto de la temperatura y tolerancia de la micropipeta para éste cálculo.

3.4.1.1. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la micropipeta de 100-1000  $\mu\text{L}$ . En la verificación del material volumétrico se calculó la desviación estándar de 10 mediciones de volumen de la micropipeta de 100-1000  $\mu\text{L}$ , con la cual se calcula la incertidumbre estándar. Asumiendo una distribución normal de los datos.

$U_{1MP} = S/\sqrt{n}$  Siendo n el número de mediciones.

$$U_{1MP} = 0,2856/\sqrt{10} = 0,0903$$

3.4.1.2 Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura. Esta contribución se obtiene multiplicando: variación de la temperatura ( $4^{\circ}\text{C}$ ), el coeficiente de expansión del agua ( $2E^{-4}$ ) y el volumen del material volumétrico (1000  $\mu\text{L}$ ) y una distribución rectangular.

$$U_{mp_2} = (4 * 2e^{-4} - 4 * 1000) / \sqrt{3} = 0,5196$$

3.4.1.3 Incertidumbre estándar por la tolerancia de la micropipeta de 100- 1000 µL. El fabricante de la micropipeta de 100-1000 µL usada para la toma de las alícuotas reporta un valor de tolerancia de ±0.08 µL y se asume una distribución rectangular, por tanto la incertidumbre está dada por:

$$U_{mp_3} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0.08 / \sqrt{3} = 0.0461$$

3.4.1.4 Incertidumbre combinada de la micropipeta de 100-1000 µL.

$$U_{mpc} = \sqrt{(U_{mp_1})^2 + (U_{mp_2})^2 + (U_{mp_3})^2} = \sqrt{(0,0903)^2 + (0,5196)^2 + (0,0461)^2} = 0,3024$$

3.4.1.5 Incertidumbre estándar relativa de la micropipeta de 100-1000 µL. La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre  $U_{mpER}$  y el volumen de aforo (1000 µL).

$$U_{mpER} = U_{mpc} / 1000 = 0.362 / 1000 = 0.000362$$

### 3.5 INCERTIDUMBRE GENERADA POR EL BALÓN DE 25 ML (AFORO)

Esta incertidumbre ya fue calculada en el apartado 3.3.7.5. En donde se obtuvo el valor de la incertidumbre estándar relativa.  $U_{ERB25} = 0.000484$

### 3.6 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA DEL SEGUNDO FACTOR DE DILUCIÓN.

Se obtiene con incertidumbre estándar relativa del balón de 25 mL ( $U_{ER25}$ )

$$U_{2FD} = \sqrt{(U_{ERB25})^2} = 0,000484$$

### **3.7 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DEBIDA AL MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO CON EL CUAL SE PREPARÓ LA CURVA DE CALIBRACIÓN.**

Esta fuente de Incertidumbre es debida a la concentración del material certificado, solución CERTIpur certificado de  $1000 \pm 10$  mg/L de Se.

Valor Nominal 1000 mg/L de Se

#### **3.7.1 Incertidumbre combinada del material de referencia**

Corresponde al valor dado en el material de referencia 10 mg/L

$$U_{MRC} = 10$$

#### **3.7.2 Incertidumbre estándar material de referencia**

Se asume una distribución rectangular de los datos por lo tanto la U estándar será:

$$U_{MR} = U_{MRC} / \sqrt{3} = 10 / \sqrt{3} = 5,773$$

#### **3.7.3 Incertidumbre estándar relativa material de referencia**

$$U_{MRC_{ER}} = U_{MR} / 1000 = 5,773 / 1000 = 0.005773$$

### **3.8 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DEBIDA A LA RESPUESTA DEL EQUIPO AL LEER LA ABSORBANCIA DE LOS PATRONES.**

Para una ecuación de tipo  $\gamma = m\alpha + \beta$ , despejamos la componente que corresponde a la concentración como se muestra en la ecuación.

$$\alpha = \frac{\gamma - \beta}{m}$$

$\alpha$  = Concentración de masa

$\gamma$  = Respuesta del equipo

$\beta$  = La ordenada al origen

$m$  = La pendiente

En la tabla 20 se muestra un diseño experimental típico para la estimación de la Incertidumbre debida a la respuesta del equipo y para ello se realizó una curva de calibración con  $i$  concentraciones y  $j$  repeticiones con lo que se hace un arreglo  $\alpha_i, \gamma_j$ .

Tabla 20. Diseño experimental para incertidumbre debida a la respuesta del equipo

Curvas de calibración					
Concentración		$\gamma_1$	$\gamma_2$	.....	$\gamma_j$
	$\alpha_1$	$\alpha_1, \gamma_1$			
	$\alpha_2$				
	.....				
	$\alpha_i$				$\alpha_i, \gamma_j$

Fuente: MILLER, J.N. Miller, J.C. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ª ed. 2002. Pearson Prentice may, pág. 103.

Para este arreglo se realizó la regresión lineal y se calculó  $m$  y  $b$ , por ajuste de mínimos cuadrados.

$m = 0,029$      $b = 0,0023$

Con los datos que se obtuvieron, en la elaboración de la ecuación de la línea recta en la curva de calibración para la metodología, se estimó la incertidumbre, de una

concentración de masa del elemento químico a medir “ $\alpha$ ”, con base al cálculo de regresión lineal de la curva de calibración con una respuesta “ $\gamma$ ”. Como se muestra en la siguiente ecuación.

$$U_{\gamma} = \frac{S}{m} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(\alpha - \overline{\alpha_{mrc}})^2}{S_x}}$$

$U_{\gamma}$  = Incertidumbre del analíto obtenida por la respuesta del equipo

$S$  = Desviación estándar residual del cálculo de la regresión lineal

$m$  = Pendiente calculada

$P$  = Número de réplicas del analíto

$n$  = Número de puntos en la curva de calibración multiplicada por el número de réplicas  $i, j$

$\alpha$  = Concentración del analíto

$\alpha_{mrc}$  = Valor medio de las concentraciones en los patrones de calibración

$S_x$  = Suma de los cuadrados residuales de las concentraciones

$$U_{\gamma} = \frac{0,0069}{0,029} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{36} + \frac{(8-8,32)^2}{2,31}} = 0,1142$$

La desviación estándar residual se calcula mediante:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N (\gamma_j - (m\alpha + b))^2}{n-2}} = 0,0069$$

$$S_x = \sum_{j=1}^N (\alpha_j - \overline{\alpha})^2 = 2,31$$

Dónde:

$\gamma_j$  = Lecturas  $j$  observadas

$m\alpha + b$  = Lecturas  $j$  ajustadas

$\alpha_i$  = Concentraciones  $i$  usadas en la curva de calibración

$\alpha$  =Concentración media en la curva de calibración

Al ajustar por mínimos cuadrados se asume que la incertidumbre de los valores presentes en las abscisas son pequeños al ser comparados con los valores de las ordenadas. Por lo cual se refleja la incertidumbre de los valores de absorbancia.

### **3.9 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA DEBIDA A LA RESPUESTA DEL EQUIPO AL LEER LA ABSORBANCIA DE LOS PATRONES.**

Se obtiene dividiendo la incertidumbre estándar debida a la curva de calibración y el valor de concentración de la medida, (8 µg/L)

$$U_{rER} = U_y / 8 = 0,1142 / 8 = 0,0142$$

### **3.10 INCERTIDUMBRE COMBINADA DEL MÉTODO.**

Se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa debida a:

- ✓ Pesada de las muestras, Dilución en balón de 100 mL, preparación de las muestras
- ✓ Solución Patrón
- ✓ Dilución de la Solución Patrón ( Primera Dilución)
- ✓ Preparación de Patrones ( Segunda Dilución)
- ✓ Curva de Calibración

$$U_{Cmetodo} = \sqrt{(U_{AS})^2 + ((UMRC_{ER})^2 + (U_{FD})^2 + (U_{2FD})^2 + (U_{VER})^2 =$$

$$\sqrt{(0,00172)^2 + (0,00577)^2 + (0,000023)^2 + (0,000484)^2 + (0,0142)^2} = 0,00195$$

Se observa que la curva de calibración hace la mayor contribución en incertidumbre a la metodología de selenio en suelos como se muestra en la figura 6.

### 3.11 INCERTIDUMBRE EXPANDIDA.

Se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada del método por k (el factor de cobertura).

$$U_{EXP\ metodo} = \pm U_{Cmetodo} \times k = \pm 0,00195 \times 2 = 0,0039$$

### 3.12 EXPRESIÓN DEL RESULTADO

Expresión del resultado:

$$C \pm mg/Kg$$

#### 4. DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA CUANTIFICACIÓN DE SELENIO TOTAL EN AGUAS.

Se identificaron todas las fuentes de incertidumbre en la metodología de cuantificación de selenio en aguas y se calculó la incertidumbre para el resultado final.

##### 4.1 MEDIDA DEL VOLUMEN DE LA MUESTRA, AFORO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Al medir un volumen de la muestra como se mencionó en la metodología empleada para la validación de selenio total en aguas, esta aporta una incertidumbre por el material volumétrico utilizado. En este caso la pipeta de 25 mL y su posterior aforo en un balón de 50mL. De este aforo se toman 10mL y se llevan a un volumen final de 25 mL.

##### 4.1.1 Incertidumbre estándar de la pipeta de 25mL, efecto de la temperatura

Esta fuente de incertidumbre está dada por la ecuación

$U_{P25} = (4 * 2e^{-4} - 4 * V)/\sqrt{3}$  y V es el volumen del material usado en este caso, la pipeta de 25 mL, se supone una distribución rectangular de los datos.

$$UP1_{25} = (4 * 2e^{-4} - 4 * 25)/\sqrt{3} = 0,0115$$

##### 4.1.1.1. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta de 25 mL.

En la verificación del material volumétrico usado en la metodología, se calcula la desviación estándar y esta se divide en el número de mediciones hechas en la verificación.  $U_{P25} = S/\sqrt{n}$  donde n es el número de réplicas.

$$UP2_{25} = 0,022/\sqrt{10} = 0,0069$$

4.1.1.2 Incertidumbre estándar por la tolerancia de la pipeta de 25 mL.

El fabricante del balón usado para la dilución de las muestras reporta un valor de tolerancia de  $\pm 0.03$  mL y se asume una distribución rectangular, por tanto la incertidumbre está dada por:

$$Up_{3_{25}} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0.03 / \sqrt{3} = 0.0173$$

4.1.1.3 Incertidumbre combinada por alícuota tomada por la pipeta de 25 mL.

$$UC_{P_{25}} = \sqrt{(UP_{1_{25}})^2 + (UP_{2_{25}})^2 + (UP_{3_{25}})^2} = \sqrt{(0,0115)^2 + (0,00696)^2 + (0,0173)^2} = 0,0118$$

4.1.1.4 Incertidumbre estándar relativa por alícuota tomada por la pipeta de 25 mL.

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre  $U_{cp25}$  y el volumen de aforo (25 mL).

$$UER_{P_{25}} = UC_{P_{25}} / 25 = 0,0118 / 25 = 0.000472$$

## 4.2 INCERTIDUMBRE POR DILUCIÓN EN UN BALÓN DE 50 ML.

Como la muestra cuando se digiere se lleva a un volumen final de 50 ml en un balón aforado, por ello se debe tener en cuenta la contribución de la incertidumbre dada por el efecto de la temperatura, la repetibilidad y tolerancia del balón de 50 mL en este paso de la metodología.

### 4.2.1 Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.

Esta fuente de incertidumbre está dada por la ecuación  $Ub_{50} = (4 * 2e^{-4} - 4 * V) / \sqrt{3}$  y el volumen del material usado en este caso, el balón de 50 ml, se supone una distribución rectangular de los datos.

$$Ub_{25_1} = (4 * 2e^{-4} - 4 * 50) / \sqrt{3} = 0,0231$$

#### 4.2.2 Incertidumbre estándar por la repetibilidad del balón de 50 mL.

En la verificación del material volumétrico usado en la metodología de suelos para Selenio, se calcula la desviación estándar y esta se divide en el número de mediciones hechas en la verificación.  $Ub_{50} = s / \sqrt{n}$  Donde n es el número de réplicas.

$$Ub_{50_2} = 0,036 / \sqrt{10} = 0,0113$$

#### 4.2.3 Incertidumbre estándar por la tolerancia del balón de 50 mL.

El fabricante del balón usado para la dilución de las muestras reporta un valor de tolerancia de  $\pm 0.06$  mL y se asume una distribución rectangular, por tanto la incertidumbre está dada por:

$$Ub_{50_3} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0.06 / \sqrt{3} = 0.0346$$

#### 4.2.4 Incertidumbre combinada por dilución de las muestras en un balón de 50 mL.

$$Ub_{50c} = \sqrt{(Ub_{50_1})^2 + (Ub_{50_2})^2 + (Ub_{50_3})^2} = \sqrt{(0,0231)^2 + (0,0113)^2 + (0,0346)^2} = 0,0244$$

#### 4.2.5 Incertidumbre estándar relativa por dilución de las muestras en un balón de 50 mL.

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre  $Ub_{50c}$  y el volumen de aforo (50 mL).

$$U_{ERB50} = Ub_{50c} / 25 = 0.0244 / 25 = 0.000976$$

### 4.3 INCERTIDUMBRE POR DILUCIÓN DE MUESTRAS EN UN BALÓN AFORADO DE 25 ML.

Esta fuente de incertidumbre fue calculada en el numeral 3.3.3.5.

$$U_{ERB25} = Ub_{25c} / 25 = 0.0121 / 25 = 0.000484$$

#### 4.4 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA POR ALÍCUOTA TOMADA POR LA PIPETA DE 10ML

Esta fuente de incertidumbre fue calculada en el numeral 3.3.4.5

$$U_{ERP10} = Ub10c/10 = 0.0082/10=0.00082$$

#### 4.5 INCERTIDUMBRE COMBINADA

Se debe tener en cuenta la contribución de la incertidumbre estándar relativa de tomar la alícuota con la pipeta de 25 mL, del balón de 50 mL, del balón de 25 mL y de la pipeta de 10mL.

$$UAa = \sqrt{(U_{ERP_{25}})^2 + (U_{ERB_{50}})^2 + (U_{ERB_{25}})^2 + (U_{ERP_{10}})^2}$$
$$\sqrt{(0,000472)^2 + (0,000488)^2 + (0,000484)^2 + (0,00082)^2} = 0,000473$$

#### 4.6 INCERTIDUMBRE DEBIDA AL PRIMER FACTOR DE DILUCIÓN (PREPARACIÓN DEL DISOLUCIÓN PATRÓN INTERMEDIA EN LA CURVA DE CALIBRACIÓN).

Esta fuente de incertidumbre se calculó en el numeral 3.3.7.5 Se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa de la micropipeta de 10- 100 $\mu$ L ( $U_{mpER}$ ) y la incertidumbre estándar relativa del balón de 25 mL ( $U_{ERb}$ ).

$$U_{FD} = \sqrt{(U_{mpER})^2 + (U_{ERB25})^2} = \sqrt{(0,000023)^2 + (0,000484)^2} = 0,000023$$

#### 4.7 INCERTIDUMBRE DEBIDA AL SEGUNDO FACTOR DE DILUCIÓN (PREPARACIÓN DE LOS PATRONES A PARTIR DE LA SOLUCIÓN PATRÓN INTERMEDIO)

Esta fuente de incertidumbre se calculó en el numeral 3.4 Se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa de la balón de 25 mL ( $U_{ERB25}$ ).

$$U_{ER_{2FD}} = \sqrt{(U_{ERB25})^2} = 0,000484$$

#### 4.8 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DEBIDA AL MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO CON EL CUAL SE PREPARÓ LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

Esta fuente de Incertidumbre es debida a la concentración del material certificado, solución CERTIpur certificado de  $1000 \pm 10$  mg/L de Se. Esta fuente de incertidumbre se calculó en el numeral 3.7.3

$$UMRC_{ER} = UMR/1000 = 5,773/1000 = 0.005773$$

#### 4.9 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DEBIDA A LA RESPUESTA DEL EQUIPO AL LEER LA ABSORBANCIA DE LOS PATRONES.

El modelo para hacer el cálculo se mostró en el numeral 3.8

$$U_{\gamma} = \frac{0,0069}{0,029} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{36} + \frac{(8-8,25)^2}{1,10}} = 0,1193$$

La desviación estándar residual se calcula mediante:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N (\gamma_j - (m\alpha + b))^2}{n-2}} = 0,0069$$

$$S_x = \sum_{j=1}^N (\alpha_j - \bar{\alpha})^2 = 1,10$$

Dónde:

$\gamma_j$  =Las  $j$  lecturas observadas

$m\alpha + b$  =Las  $j$  lecturas ajustadas

$\alpha_i$  = las  $i$  concentraciones usadas en la curva de calibración

$\alpha$  =Concentración media en la curva de calibración.

#### **4.10 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA DEBIDA A LA RESPUESTA DEL EQUIPO AL LEER LA ABSORBANCIA DE LOS PATRONES.**

Este valor se obtuvo dividiendo la incertidumbre estándar debida a la curva de calibración entre el valor de concentración de la medida, (8 µg Se/L).

$$U_{raER} = U_\gamma / 8 = 0,1193 / 8 = 0,01490$$

#### **4.11 INCERTIDUMBRE COMBINADA DEL MÉTODO.**

Esta se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa debida a:

- ✓ Toma de Alícuota , Dilución en balón de 50 mL, preparación de las muestras
- ✓ Solución Patrón
- ✓ Dilución de la Solución Patrón ( Primera Dilución)
- ✓ Preparación de Patrones ( Segunda Dilución)
- ✓ Curva de Calibración

$$U_{Cmetodo} = \sqrt{(U_{Aa})^2 + ((UMRC_{ER})^2 + (U_{FD})^2 + (U_{2FD})^2 + (U_{\gamma aER})^2) = \sqrt{(0,000473)^2 + (0,00577)^2 + (0,000023)^2 + (0,000484)^2 + (0,0193)^2} = 0,000879$$

#### 4.12 INCERTIDUMBRE EXPANDIDA.

Se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada del método por k (el factor de cobertura).

$$U_{EXP\ metodo} = \pm U_{Cmetodo} \times k = \pm 0,000879 \times 2 = 0,00175$$

##### 4.12.1 Cálculo de la incertidumbre expandida en la concentración del analito

Se obtiene multiplicando la incertidumbre expandida por la concentración determinada en la metodología.

$$U = C \mu g/l \times U_{EXP\ metodo} = \text{Donde } C \text{ es el valor de la concentración}$$

##### 4.12.2 Expresión del resultado

Expresión del resultado:

$$C \pm \mu g/L$$

## 5. CARTAS CONTROL

Se realizaron las lecturas en un periodo de 7 días, y con esas lecturas de concentración se construyó la carta de control para suelos y agua respectivamente.

### 5.1 CARTA DE CONTROL PARA SUELOS

Se pesó una cantidad promedio del MRC del IDEAM, para que diera una lectura cercana a 0.6C de la curva de calibración. En esta se observa un comportamiento aleatorio de las medidas sin ninguna tendencia, esto indica que la metodología no se encuentra sujeta a errores sistemáticos.

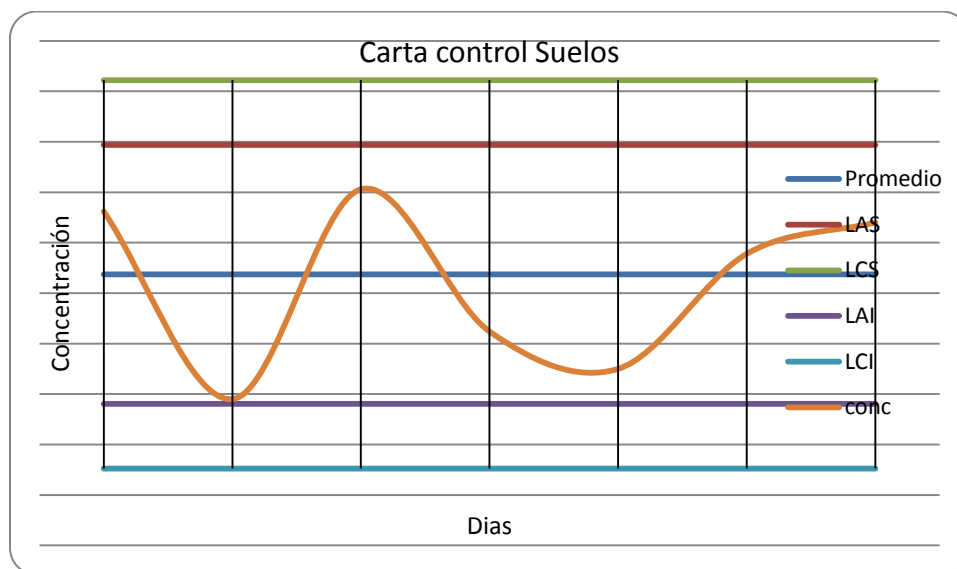


Figura 8. Carta de control para suelos

### 5.2 CARTA DE CONTROL PARA AGUAS

Se monitoreó diariamente la concentración de un patrón de 7  $\mu\text{g Se/L}$  para aguas durante diez (10) días, no se presenta ninguna tendencia especial en las medidas esto muestra que la metodología no presenta errores sistemáticos y que los

errores aleatorios se encuentran bajo control ya que ningún valor sobrepasó los límites de advertencia.

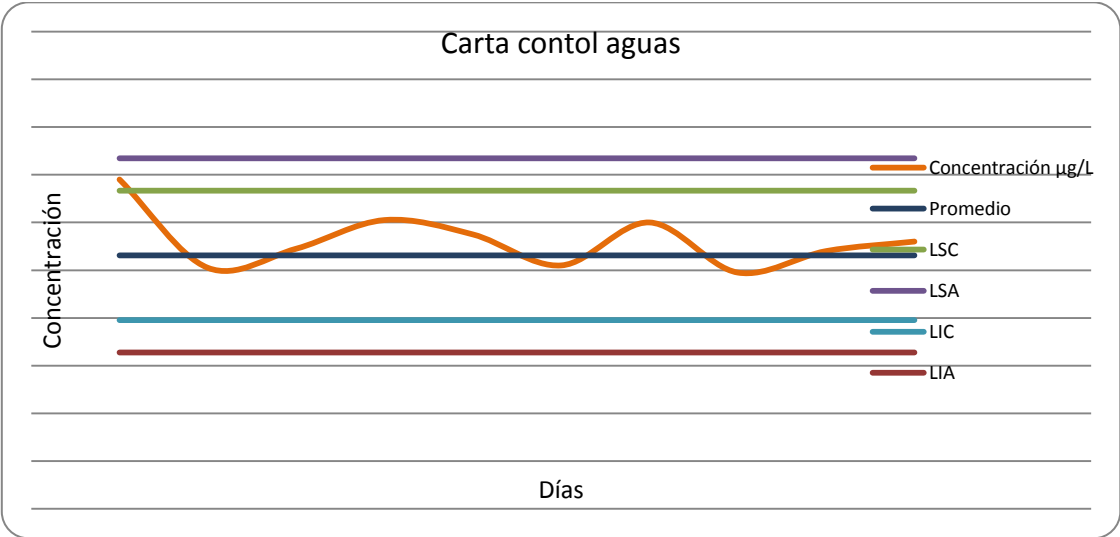


Figura 9. Carta de control para aguas

## CONCLUSIONES

En la aplicación del método de selenio total en suelos se obtuvo un coeficiente de variación de 11,1 para el rango bajo y 7,63 para el rango alto. Los coeficientes de variación obtenidos no superan los criterios de aceptación del método (10% para rango alto y 20% para rango bajo), por lo cual se considera que el método validado es preciso. Los porcentajes de recuperación obtenidos en el rango bajo fueron 81,2 y en el rango alto 111,4%, valores que se encuentran dentro de los límites establecidos como aceptables (80-120%). Finalmente se obtuvo un error relativo del 11,4 en el rango bajo y 0,70 en el rango alto, valores que se encuentran dentro de los límites establecidos como aceptables para el método, indicando que el método es exacto. Teniendo en cuenta los resultados anteriores se encuentra que el método es apto para su uso ya que es exacto, preciso y las interferencias por matriz presentadas no son significativas.

El criterio de aceptación para evaluar la precisión en el análisis de muestras rutinarias que se seleccionó fue el valor más alto obtenido del análisis de los blancos enriquecidos, muestras reales y material de referencia certificado y presentado en este trabajo. Por tanto el criterio de aceptación para precisión del método en términos del coeficiente de variación (%) es de 12,5%.

En la aplicación del método de selenio total en aguas se obtuvo un coeficiente de variación de 6,79 para el rango bajo y 4,94 para el rango alto. Los coeficientes de variación obtenidos no superan los criterios de aceptación del método (10% para rango alto y 20% para rango bajo), por lo cual se considera que el método validado es preciso. Los porcentajes de recuperación obtenidos en el rango bajo fueron 98,32 y en el rango alto 100,5%, valores que se encuentran dentro de los límites establecidos como aceptables (80-120%). Finalmente se obtuvo un error relativo del 1,48 en el rango bajo y 0,74 en el rango alto, valores que se encuentran dentro de los límites establecidos como aceptables para el método,

por lo anterior se puede decir que el método es exacto. Teniendo en cuenta los resultados anteriores se encuentra que el método es apto para su uso ya que es exacto, preciso y las interferencias por matriz presentadas no son significativas.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, el método analítico para determinación de Se total en aguas SM 3114/3030F y para Se total en suelos EPA 3050B/7020 se declara adecuado para su propósito. Por lo tanto, estas metodologías pueden ser implementadas y usadas en el Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander.

## RECOMENDACIONES

La interferencia causada por la presencia de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) en rangos de concentraciones mayores a 0,5 mg/L se elimina efectivamente con la adición de úrea, y su concentración final en la solución debe ser de 4% (p/v).

El peróxido residual del proceso de digestión también causa interferencia, debe usarse la mínima cantidad posible como se describe en la metodología lo cual significa que no exceda de 3 mL. Esta interferencia se minimiza con calentamiento cercano a sequedad en la última etapa del proceso de digestión y posterior adición de ácido clorhídrico.

Es necesario permitir la desgasificación de las muestras al adicionar la úrea, así como también dejar pasar un tiempo previo al análisis para que la desgasificación sea efectiva.

La reducción de las especies químicas de Se (VI) a Se (IV) debe ser efectiva en el proceso de pre-lectura con HCl concentrado y para ello se recomienda un tiempo de reacción mínimo de 3 horas.

## REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION and WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard methods for the examination of water & wastewater. 22<sup>nd</sup> Edition USA, 2012.
2. INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES, IDEAM. Determinación de antimonio (total o biodisponible), arsénico y selenio en aguas y sedimentos por espectrofotometría atómica generador de hidruros, espectrofotometría atómica horno de grafito y emisión por plasma. Versión 01, 2009.
3. MINISTERIO DE SALUD. Decreto 1594/84. Usos del agua y residuos líquidos, 26 de Junio de 1984.
4. CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health. Update 7.0. Canada, September 2007.
5. ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. Method 3050B. Acid digestion of sediments, sludges, and soils. Revision 02. USA, December 1996.
6. ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. Method 7742. Selenium (atomic absorption, borohydride reduction). Revision 00. USA, September 1994.
7. INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES, IDEAM. Determinación de antimonio (total o biodisponible), arsénico y selenio en aguas y sedimentos por espectrofotometría atómica

generador de hidruros, espectrofotometría atómica horno de grafito y emisión por plasma. Versión 01, 2009

8. DIRK WALLSCHLAGER. Biogeoquímica y análisis de Selenio y sus especies. Medio Ambiente y Recursos programa de ciencias y el departamento de química. Trent University. Canadá. 2005.
9. S.J HAMILTON, K.J BUHL, P.J LAMOTHE. Selenium and other trace elements in water, sediment, aquatic plants, and fish from streams in southeastern Idaho near phosphate mining operation. Columbia Environmental Research Center. June 2000.
10. ARDILA, Jorge A. Validación interna de los métodos analíticos para la cuantificación de hierro total, hierro no hemo e implementación del método para la determinación de hierro hemo en alimentos. Laboratorio Químico de Consultas Industriales, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, 2009.
11. M. VELOZA ADRIANA. Distribución Espacial de Selenio en suelos y su comportamiento Geoquímico local al oriente de los municipios de utica y villeta. Ingeominas. Bogotá Diciembre de 2001.
12. COY, Gustavo Alfonso. Protocolo estandarización de métodos analíticos. Instituto de Hidrología y estudios ambientales. Programa de Fisicoquímica ambiental. Bogotá. 1999.
13. ORTIZ, J. Peñaranda, S. Palma, R. Pardo, D. Puentes, W. Quinto Curso-Taller, Validación de Métodos Analíticos. Programa Vigilancia de la Calidad del Agua Potable, Metales y no Metales de Interés de Salud Pública, 2007, Bogota, pp. 9-39.

14. HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, L y GONZÁLEZ PÉREZ, C. Introducción al Análisis Instrumental. Edit. Ariel. Enero 2002.
15. MILLER, J.N. Miller, J.C. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ª ed. 2002. Pearson Prentice may, pp. 77-106.
16. INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS, ICONTEC. NTC ISO/IEC 17025: 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Segunda edición, 2005.
17. INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES, IDEAM. Protocolo estandarización de métodos analíticos. Programa de fisicoquímica ambiental. Versión 02, Noviembre de 1999.
18. MINISTERIO DE SALUD. Decreto 1594/84. Usos del agua y residuos líquidos, 26 de Junio de 1984.
19. J.HASSETT DAVID. Método Universal de Digestión para Análisis de Selenio. 1988.
20. S.J HAMILTON, K.J BUHL, P.J LAMOTHE. Selenium and other trace elements in water, sediment, aquatic plants, and fish from streams in southeastern Idaho near phosphate mining operation. Columbia Environmental Research Center. June 2000.
21. HENRY JOHNSON. Determination of Selenium in Solid Waste. Environmental Science and Technology. 1970.
22. YIQIANG ZHANG. N. MOORE JOHNNIE. Environmental Conditions Controlling Selenium Volatilization from a Wetland System. Department of Geology, University of Montana. 1997.

## BIBLIOGRAFIA

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION and WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard methods for the examination of water & wastewater. 22<sup>nd</sup> Edition USA, 2012.

ARDILA, Jorge A. Validación interna de los métodos analíticos para la cuantificación de hierro total, hierro no hemo e implementación del método para la determinación de hierro hemo en alimentos. Laboratorio Químico de Consultas Industriales, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, 2009.

CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health. Update 7.0. Canada, September 2007.

COY, Gustavo Alfonso. Protocolo estandarización de métodos analíticos. Instituto de Hidrología y estudios ambientales. Programa de Físicoquímica ambiental. Bogotá. 1999.

DIRK WALLSCHLAGER. Biogeoquímica y análisis de Selenio y sus especies. Medio Ambiente y Recursos programa de ciencias y el departamento de química. Trent University. Canadá. 2005.

ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. Method 3050B. Acid digestion of sediments, sludges, and soils. Revision 02. USA, December 1996.

ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. Method 7742. Selenium (atomic absorption, borohydride reduction). Revision 00. USA, September 1994.

HENRY JOHNSON. Determination of Selenium in Solid Waste. Environmental Science and Technology. 1970.

HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, L y GONZÁLEZ PÉREZ, C. Introducción al Análisis Instrumental. Edit. Ariel. Enero 2002.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS, ICONTEC. NTC ISO/IEC 17025: 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Segunda edición, 2005.

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES, IDEAM. Determinación de antimonio (total o biodisponible), arsénico y selenio en aguas y sedimentos por espectrofotometría atómica generador de hidruros, espectrofotometría atómica horno de grafito y emisión por plasma. Versión 01, 2009.

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES, IDEAM. Determinación de antimonio (total o biodisponible), arsénico y selenio en aguas y sedimentos por espectrofotometría atómica generador de hidruros, espectrofotometría atómica horno de grafito y emisión por plasma. Versión 01, 2009.

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES, IDEAM. Protocolo estandarización de métodos analíticos. Programa de fisicoquímica ambiental. Versión 02, Noviembre de 1999.

J.HASSETT DAVID. Método Universal de Digestión para Análisis de Selenio. 1988.

M. VELOZA ADRIANA. Distribución Espacial de Selenio en suelos y su comportamiento Geoquímico local al oriente de los municipios de utica y villeta. Ingeominas. Bogotá Diciembre de 2001.

MILLER, J.N. Miller, J.C. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ª ed. 2002. Pearson Prentice may, pp. 77-106.

MINISTERIO DE SALUD. Decreto 1594/84. Usos del agua y residuos líquidos, 26 de Junio de 1984.

MINISTERIO DE SALUD. Decreto 1594/84. Usos del agua y residuos líquidos, 26 de Junio de 1984.

ORTIZ, J. Peñaranda, S. Palma, R. Pardo, D. Puentes, W. Quinto Curso-Taller, Validación de Métodos Analíticos. Programa Vigilancia de la Calidad del Agua Potable, Metales y no Metales de Interés de Salud Pública, 2007, Bogota, pp. 9-39.

S.J HAMILTON, K.J BUHL, P.J LAMOTHE. Selenium and other trace elements in water, sediment, aquatic plants, and fish from streams in southeastern Idaho near phosphate mining operation. Columbia Environmental Research Center. June 2000.

S.J HAMILTON, K.J BUHL, P.J LAMOTHE. Selenium and other trace elements in water, sediment, aquatic plants, and fish from streams in southeastern Idaho near phosphate mining operation. Columbia Environmental Research Center. June 2000.

YIQIANG ZHANG. N. MOORE JOHNNIE. Environmental Conditions Controlling Selenium Volatilization from a Wetland System. Departament of Geology, University of Montana. 1997.