

**VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA
DETERMINACIÓN DE PLOMO EN TEXTILES Y CALZADO POR
ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA – HORNO DE GRAFITO**

CARLOS ALBERTO ADARME DURÁN

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2014

**VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA
DETERMINACIÓN DE PLOMO EN TEXTILES Y CALZADO POR
ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA – HORNO DE GRAFITO**

CARLOS ALBERTO ADARME DURÁN

Trabajo de grado para optar el título de:

Químico

DIRECTORA

M.Sc. LUZ YOLANDA VARGAS FIALLO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2014

AGREDECIMIENTOS

A Dios como fuente de sabiduría, a mis padres, Alberto y Gloria, por sus enseñanzas y apoyo a lo largo de mi vida.

A mis hermanos, Jhon y Edward, quienes han contribuido en mi crecimiento personal.

A la profesora Luz Yolanda Vargas por su guía y consejos en el desarrollo de este trabajo y mi formación como profesional.

Al Laboratorio Químico de Consultas Industriales por el apoyo necesario para la realización de este trabajo.

A mis amigos del LQCI, Alexander R., Jhonis P., Claudia D., Sandra F., Johanna R., Amparo, Yami y Xiomara quienes contribuyeron con la terminación de esta etapa.

A Giohanna Santos, con quien compartí momentos inolvidables, por su compañía y apoyo incondicional.

A mis amigos, Keyla, Juliana, Luis Carlos, Mayra, Javier B., Alex, William y todos aquellos que hicieron de esta etapa una de las mejores de mi vida.

Al jurado calificador por su disposición para la revisión y calificación de este proyecto.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	16
1 MARCO TEÓRICO	18
1.1 GENERALIDADES DEL PLOMO	18
1.2 PLOMO EN EL MEDIO AMBIENTE	18
1.2.1 Migración natural	19
1.2.2 Plomo atmosférico	19
1.2.3 Plomo en suelos	19
1.2.4 Plomo en aguas	20
1.3 EL PLOMO EN LA INDUSTRIA TEXTIL	20
1.4 TOXICIDAD DEL PLOMO	21
1.4.1 Exposición	21
1.4.2 Saturnismo	22
1.5 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PLOMO	22
1.5.1 Espectrofotometría de absorción atómica	23
1.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	25
1.6.1 Validación interna	26
1.6.2 Figuras de mérito	26
1.6.2.1 Límite de detección	26
1.6.2.2 Límite de cuantificación	26
1.6.2.3 Intervalo de trabajo	27
1.6.2.4 Precisión	27
1.6.2.5 Exactitud	27
1.6.2.6 Sensibilidad	28
1.6.3 Control analítico de la medición	28
1.6.4 Control de calidad interno	28
1.6.5 Incertidumbre en la medición analítica	28

1.6.6	Fuentes de incertidumbre	29
1.6.6.1	Medición de una masa	29
1.6.6.2	Medición de un volumen	31
1.6.6.3	Diluciones	32
1.6.7	Estimación de la incertidumbre	33
1.6.8	Incertidumbre combinada	34
1.6.9	Expresión de la incertidumbre	34
1.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
1.7.1	Datos atípicos	35
2	METODOLOGÍA	36
2.1	PREVALIDACIÓN	36
2.1.1	Reactivos	36
2.1.2	Material de referencia certificado	36
2.1.3	Material de laboratorio e instrumentación	36
2.1.4	Revisión de procedimientos	37
2.1.4.1	Plomo extraíble en textiles	38
2.1.4.2	Plomo total en calzado (cuero)	38
2.1.5	Verificación de materiales, reactivos e instrumentación	39
2.1.5.1	Verificación de la instrumentación	40
2.1.5.2	Verificación de material volumétrico	40
2.2	VALIDACIÓN	40
2.2.1	Optimización de variables instrumentales	40
2.2.1.1	Optimización de la temperatura de calcinado y atomización	40
2.2.1.2	Concentración de modificador	41
2.2.1.3	Optimización de la etapa de extracción	41
2.2.2	Intervalo de trabajo	41
2.2.3	Curva de calibración	42
2.2.4	Linealidad	42
2.2.5	Diseño experimental	43
2.2.6	Figuras de mérito	43

2.2.6.1	Límite de detección y cuantificación	43
2.2.6.2	Precisión	44
2.2.6.3	Exactitud	44
2.3	ELABORACIÓN DE LAS CARTAS DE CONTROL	44
2.3.1	Carta de control para textiles y calzado	44
2.4	ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE	44
2.4.1	Caracterización de las fuentes de incertidumbre	44
2.4.1.1	Fuentes de incertidumbre en la determinación de plomo total en calzado	44
2.4.1.2	Fuentes de incertidumbre en la determinación de plomo extraíble en textiles	46
3	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	47
3.1	PREVALIDACIÓN	47
3.1.1	Verificación de reactivos	47
3.1.2	Verificación del material volumétrico	47
3.2	VALIDACIÓN	48
3.2.1	Optimización de variables instrumentales.	48
3.2.1.1	Optimización de la temperatura de calcinado y atomización.	48
3.2.1.2	Estabilización de la señal (concentración del modificador)	50
3.2.1.3	Comparación de métodos para la extracción de plomo total en calzado	50
3.2.2	Plomo extraíble en textiles	51
3.2.3	Figuras de mérito – Plomo total en calzado	53
3.2.3.1	Curva de calibración	54
3.2.3.2	Linealidad	55
3.2.3.3	Límite de detección y cuantificación	56
3.2.3.4	Precisión y exactitud	56
3.3	ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA CUANTIFICACIÓN DE PLOMO TOTAL EN CALZADO Y TEXTILES	58
3.3.1	Incertidumbre por la pesada de muestra	58

3.3.2	Incertidumbre por aforo en un balón de 100 mL	59
3.3.2.1	Incertidumbre estándar relativa por aforo, balón de 100 mL	61
3.3.3	Incertidumbre estándar derivada de la curva de calibración	61
3.3.3.1	Incertidumbre estándar debida a la preparación de la solución stock (primer factor de dilución)	61
3.3.3.2	Incertidumbre debida a la preparación de los estándares de calibración (segundo factor de dilución)	64
3.3.3.3	Incertidumbre estándar relativa a los patrones de calibración	66
3.3.3.4	Incertidumbre estándar debida a la respuesta del equipo	67
3.3.3.5	Incertidumbre relativa a la curva de calibración	68
3.4	INCERTIDUMBRE COMBINADA DEL MÉTODO	68
3.5	INCERTIDUMBRE EXPANDIDA DEL MÉTODO	69
3.6	INCERTIDUMBRE EXPANDIDA EN LA CONCENTRACIÓN DEL ANALITO	69
3.7	EXPRESIÓN DEL RESULTADO	69
3.8	CARTA DE CONTROL	70
4	CONCLUSIONES	71
5	RECOMENDACIONES	72
	BIBLIOGRAFÍA	78

LISTADO DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Pigmentos con plomo.	20
Tabla 2. Técnicas instrumentales para la determinación de metales.	22
Tabla 3. Límites de detección en <i>ng/mL</i> para algunos elementos.	23
Tabla 4. Matriz de experimentos.	41
Tabla 5. Soluciones estándar de calibrado.	42
Tabla 6. Etapas que aportan incertidumbre en el método para determinación de plomo en calzado.	45
Tabla 7. Fuentes de incertidumbre en el método para la determinación de plomo en textiles.	46
Tabla 8. Análisis de los reactivos para las metodologías analíticas.	47
Tabla 9. Verificación del material.	47
Tabla 10. Señales obtenidas en el estudio del programa de temperaturas.	49
Tabla 11. Optimización de la temperatura de atomización.	49
Tabla 12. Resultados para el estudio de la optimización de la señal.	50
Tabla 13. Resultados para la comparación de métodos.	50
Tabla 14 Efecto del sudor ácido artificial en la lectura por horno de grafito.	51
Tabla 15. Señal observada para diferentes concentraciones de nitrato de amonio.	53
Tabla 16. Absorbancia de patrones en la curva de calibración.	54
Tabla 17. Curva de calibración.	54
Tabla 18. Límites de detección y cuantificación.	56

Tabla 19. Determinación de la precisión y exactitud del método.	57
Tabla 20. Determinación de la precisión en muestras reales.	57
Tabla 21. Porcentajes de recuperación y el estadístico t en calzado y textiles.	58

LISTADO DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. a) Sección transversal del horno de grafito. b) plataforma de L'vov y su posición en el horno de grafito, [Skoog <i>et al.</i> , 2005].	24
Figura 2. Efecto de la precisión y el sesgo en la exactitud.	27
Figura 3. Espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito, <i>Agilent Technologies</i> .	37
Figura 4. Diagrama causa-efecto para determinación de la incertidumbre en calzado.	45
Figura 5. Diagrama causa-efecto para determinación de la incertidumbre en textiles.	46
Figura 6. Verificación del balón de 25 mL	48
Figura 7. Diagrama Log C – pH para Pb (II) 10^{-2} M [CONDE, <i>et. al.</i> , 2001].	52
Figura 8. Curva de calibración Pb.	55
Figura 9. Contribución de cada fuente de incertidumbre.	69
Figura 10. Gráfico de la carta de control para calzado y textiles.	70

LISTADO DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Valores de la distribución t de <i>student</i> , contraste de 2 colas.	74
Anexo B. Resultados de la matriz de experimentos.	75
Anexo C. Cálculo del estadístico R^2 .	76
Anexo D. Valores de t para los porcentajes de recuperación.	77

RESUMEN

TÍTULO: VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLOMO EN TEXTILES Y CALZADO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA-HORNO DE GRAFITO.*

AUTOR: CARLOS ALBERTO ADARME DURÁN**

PALABRAS CLAVE: Plomo, validación, horno de grafito.

El plomo es un metal tóxico que debido a fuentes naturales y antropogénicas se encuentra ampliamente distribuido sobre la corteza terrestre, aumentando así la posibilidad de entrar en contacto con los seres vivos, y causar efectos adversos sobre la salud humana y el medio ambiente si se superan los límites máximos permisibles. Con la validación de la metodología para la determinación de plomo en textiles y calzado, según los lineamientos de la norma NTC ISO/IEC 17025:2005 se consiguió la evidencia objetiva que permite ofrecer el servicio y el reporte de resultados veraces y confiables.

El desarrollo de la metodología consistió en analizar muestras de textiles y calzado de acuerdo con la norma UNI EN ISO 105-E04 para plomo extraíble en textiles y el método EPA 3050B para plomo total en textiles y calzado. Se utilizaron blancos de muestra y blancos de muestra fortificados con un material de referencia certificados para determinar el límite de detección y de cuantificación, la linealidad, la precisión, la exactitud y la estimación de la incertidumbre.

Con los resultados obtenidos, se adquirió la evidencia objetiva para declarar la idoneidad del método EPA 3050B para la determinación de plomo total en textiles y calzado por espectrofotometría de absorción atómica - horno de grafito en el Laboratorio Químico de Consultas Industriales y contribuir con información para la validación de la metodología para la determinación de plomo extraíble en textiles y calzado.

*Trabajo de grado

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

ABSTRACT

TITLE: VALIDATION AND IMPLEMENTATION OF THE METHODOLOGY FOR THE DETERMINATION OF LEAD IN TEXTILES AND FOOTWEAR BY GRAPHITE FURNACE ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY (GFAAS).*

AUTHOR: CARLOS ALBERTO ADARME DURÁN**

KEY WORDS: Lead, Validation, Graphite Furnace.

Lead is a toxic metal that due to natural and anthropogenic sources is widely distributed over the earth's crust, increasing the possibility of coming into contact with living beings, causing adverse effects on human health and the environment if the maximum permissible limits are exceeded. The validation of the methodology for the determination of lead in textiles and footwear, according to the guidelines of the norm NTC ISO/IEC 17025:2005 the objective evidence that allows to offer the service and the report of veracious and reliable results was obtained.

The development of the methodology consisted in analyzing samples of textiles and footwear in agreement with the norm UNI IN ISO 105-E04 for removable lead in textiles and the method EPA 3050B for total lead in textiles and footwear. Sample blanks and fortified blanks of sample were used and fortified with a material of reference certified to determine the limit of detection and limit of quantification, linearity, precision, accuracy and the estimation of the uncertainty.

With the obtained results, the objective evidence was acquired to declare the suitability of the EPA 3050B method for the determination of total lead in textiles and footwear by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry in the Chemical Laboratory of Industrial Consultations and to contribute with information to the validation of the methodology for determining the removable lead in textiles and footwear.

*Degree Project

**Faculty of Science. School of Chemistry. Director: Yolanda Vargas Fiallo. M.Sc

INTRODUCCIÓN

La implementación de políticas a nivel global con el fin de proteger a las personas de sustancias químicas que pueden ser nocivas para la salud humana, se aplican en todos los campos de la industria.

Agencias gubernamentales como la CPSC (*Consumer Product Safety Commission*), han establecido límites permisibles de sustancias tóxicas presentes en ciertos tipos de productos de uso cotidiano, y se han extendido a entidades privadas, que buscan garantizar la calidad y seguridad de sus productos obteniendo certificados, como la etiqueta ecológica “Eco-Label” para prendas de vestir, que asegura una concentración mínima de sustancias nocivas.

En la industria textil, parte de los controles están destinados a regular la concentración de metales pesados, como el plomo [CPSC, 2008], que afecta diversos órganos y puede causar daños neurológicos, renales, gastrointestinales y hematológicos [UNEP, 2011]. En los niños, se han reportados casos de problemas de aprendizaje y trastornos mentales.

Estas políticas de protección se han convertido en barreras de entrada a países en todo el mundo, afectando la exportación de los productos textiles y de calzado colombianos, ya que el país no cuenta con laboratorios acreditados que brinden el servicio.

El primer paso, para mejorar la dinámica textil y aumentar la participación de Colombia en el mercado mundial, es validar e implementar una metodología para la determinación de plomo en textiles y calzado. De tal forma que satisfaga las necesidades de los clientes, brindando resultados veraces y confiables.

Siguiendo los lineamientos establecidos por la norma NTC ISO/IEC 17025:2005, se asegura que la validación de la metodología cumple con los requisitos generales para los laboratorios de ensayo, y se garantiza un servicio eficaz, ya que cuenta con un control analítico, donde cada método tiene una serie de condiciones establecidas para la toma de muestras, preservación, tratamiento y tiempo de análisis.

La realización del presente trabajo permitió validar la metodología para la determinación de plomo total en textiles y calzado, por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, en el Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander, y se contribuyó con

información preliminar para la puesta a punto de la determinación de plomo extraíble con una solución de sudor ácido artificial.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 GENERALIDADES DEL PLOMO

El plomo (Nº CAS 007439-92-1), ubicado en el grupo IV A y el periodo 6 de la tabla periódica, es un metal pesado que se presenta de forma natural en la corteza terrestre [Landis *et al.*, 2005]. Aunque se encuentra en pequeñas cantidades, está ampliamente distribuido, como resultado de actividades mineras e industriales principalmente. Es considerado como un elemento no esencial, cuyas altas dosis pueden provocar efectos adversos en los seres vivos [ATSDR, <http://www.atsdr.cdc.gov/>], razón por la cual a lo largo de los años se han generado regulaciones a nivel mundial, que buscan proteger la salud humana y el medio ambiente.

1.2 PLOMO EN EL MEDIO AMBIENTE

La distribución del plomo en la corteza terrestre se debe tanto a fuentes naturales como antropogénicas. La actividad volcánica y mineralización de rocas contribuye con la deposición de plomo en la naturaleza. Sin embargo, las emisiones asociadas con la actividad humana se han convertido a lo largo de los años en la principal fuente de contaminación ambiental.

Desde hace cientos de años, el plomo ha sido empleado por los humanos y desempeña un rol importante en la economía de los países industrializados. Uno de sus principales usos y que actualmente está prohibido, fue como antidetonante en combustibles. Otras fuentes importantes en la industria son: tuberías, pinturas, soldaduras, vidrio, esmaltes de cerámica, caucho, plásticos, e insecticidas.

Las tres formas químicas de plomo son: el plomo metálico, compuestos inorgánicos de plomo y compuestos orgánicos de plomo. El plomo metálico es poco abundante en la naturaleza y representa solo un 0,0013 % de la corteza terrestre. La forma mineral más común del plomo es un sulfuro conocido como la galena (PbS), y le siguen sus productos de meteorización, un carbonato (cerusita, PbCO_3) y un sulfato (anglesita, PbSO_4) [Rico *et al.*, 2012]. En cuanto a sus compuestos orgánicos, el tetraetilo de plomo $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_4\text{Pb}$ y el tetrametilo de plomo $(\text{CH}_3)_4\text{Pb}$ representan el uso más común de esta forma química del plomo [UNEP, 2011].

1.2.1 Migración natural

La distribución natural del plomo sobre el agua superficial y subterránea no es apreciable, cualquier plomo disuelto a partir de minerales de sulfuro primarios tiende a combinarse con iones carbonato o sulfato formando compuestos insolubles en agua. La desintegración mecánica y el transporte de estos compuestos de plomo insoluble, pueden retirar el metal de la superficie del mineral y dispersarla en cierta medida, al igual que la lixiviación producida por aguas ácidas ricas en materia orgánica, donde el plomo forma compuestos orgánicos solubles. De esta forma puede ser absorbido por las plantas y entrar en la cadena alimentaria, aunque son escasos los ejemplos [Lovering, 1976].

1.2.2 Plomo atmosférico

Las fuentes de plomo en el medio ambiente incluyen: fundidoras de plomo, la quema de materiales que contienen plomo, partículas retiradas del suelo por el viento y la combustión de la gasolina con plomo. Las emisiones gaseosas de fundiciones y procesos de refinación pueden aportar cantidades significativas de plomo en el aire. Sin embargo, hasta hace pocos años la principal fuente de contaminación atmosférica eran los automóviles. La introducción del tetraetilo de plomo como agente antidetonante de la gasolina incrementó drásticamente la contaminación ambiental [Landis *et al.*, 2005]. Entre los años 1950 y 1990, se presentó el mayor incremento, reflejando así el aumento del uso de gasolina con plomo a nivel mundial. Para el año 1979, las emisiones de plomo atmosférico fueron de 94.6 millones de kilogramos en EE. UU. y en 1989 disminuyó reportando un valor de 2.2 millones de kilogramos, cuando la EPA limitó el uso de gasolina con plomo [ATSDR, 2007].

En la atmósfera el plomo se encuentra principalmente en forma de partículas, lo que genera gran preocupación por su capacidad de viajar miles de kilómetros arrastrados por el viento, aumentando la distribución y contaminación a nivel global.

1.2.3 Plomo en suelos

El suelo es contaminado con plomo por deposición desde el aire contaminado, meteorización y polvo de pinturas a base de plomo. Según el entorno del suelo, la fuente principal varía; el suelo al lado de carreteras se contamina principalmente por el escape de los automóviles y en las ciudades las emisiones de automóviles y la pintura a base de plomo en edificios, puentes, y casas incrementan la

deposición en el suelo, además de la eliminación de productos que contienen plomo (e.g., baterías).

1.2.4 Plomo en aguas

Las aguas superficiales pueden contener cantidades significativas de plomo, por ejemplo: resultado de perdigones de plomo que quedan en lagos y lagunas como se ha visto en el norte de América, desechos generados por la actividad industrial, o de la migración desde tuberías de plomo o soldaduras cuando entran en contacto con agua ácida o “blanda”.

1.3 EL PLOMO EN LA INDUSTRIA TEXTIL

La presencia del plomo en la industria textil, es el resultado de la etapa de teñido de fibras durante la producción de prendas de vestir y calzado. Proviene de dos tipos de sustancias; pigmentos y mordientes. La **Tabla 1**, contiene algunos ejemplos de pigmentos con plomo.

Tabla 1. Pigmentos con plomo.

Color	Pigmento
Blanco	Blanco de plomo (carbonato de plomo)
Amarillo	Amarillo real (óxido de plomo)
Rojo	Rojo Saturno (tetraóxido de plomo)

Por su parte, los mordientes son sustancias que permiten una mejor fijación del color, y pueden ser de origen natural o sintético. Actualmente se utilizan sales solubles de metales como aluminio, cromo, cobre, hierro y plomo (e.g., acetato de plomo).

El mordentado de la fibra se realiza agregando en agua caliente la fibra y el mordiente, y según su finalidad puede realizarse antes o después del teñido. Si se realiza en la parte final del teñido permiten variar la tonalidad del color.

Al colocar el mordiente en agua caliente, se disocia y el metal queda como catión metálico que se une a la fibra textil y forma un complejo con la molécula colorante aumentando así la resistencia o fijación del color.

Además, el tipo de metal que forma parte del complejo determina la tonalidad del color, es decir, para un mismo tipo de fibra y colorante, el uso de diferentes mordientes producirá diferentes tonalidades o colores.

1.4 TOXICIDAD DEL PLOMO

El plomo es un metal tóxico a bajos niveles de exposición y puede presentar efectos agudos o crónicos según el escenario de exposición. Debido a su toxicidad sistemática, una vez que entra en la sangre es distribuido en el cuerpo y puede causar efectos adversos neurológicos, cardiovasculares, renales, gastrointestinales, hematológicos y reproductivos. A través de la interacción con las células del cerebro se afecta el sistema nervioso central y pueden aparecer síntomas como encefalopatía, convulsiones y delirio [UNEP, 2011].

En los niños la intoxicación con plomo puede tener consecuencias graves. Si el grado de intoxicación es elevado, ataca el cerebro y el sistema nervioso central, provocando un coma, convulsiones o incluso la muerte. Además una intoxicación grave puede generar secuelas como retraso mental o trastornos en el comportamiento [WHO, 2013].

No existe un nivel de concentración de plomo en sangre que se considere exento de riesgo, incluso concentraciones en sangre que no superan los 5 µg/dL (nivel hasta hace poco considerado seguro) puede causar disminución de la inteligencia del niño, así como problemas de comportamiento y dificultades de aprendizaje [WHO, 2013].

1.4.1 Exposición

La exposición se da a través de la inhalación de partículas de polvo contaminadas y la ingestión de comida y agua. La inhalación es una importante vía de exposición en las proximidades de fuentes puntuales como: industrias de fundición de plomo, países que todavía utilizan gasolina con plomo y zonas donde se queman residuos de productos con plomo. Dentro de los hogares, a parte de la ingestión de plomo a través de la comida, se da la inhalación de partículas de plomo producto del desgaste de la pintura a base de plomo. Además, algunos estudios han demostrado la presencia de plomo en leche materna [Hermeza *et al.*, 2006].

La exposición al plomo se puede medir mediante un análisis de sangre; sin embargo, este enfoque no refleja con exactitud en grado de intoxicación del individuo, debido a la deposición del plomo en los huesos en donde sustituye al

calcio. Se estima que el 90 % del plomo se deposita en los huesos [Landis *et al.*, 2005].

1.4.2 Saturnismo

El saturnismo es el envenenamiento agudo o crónico, debido al plomo y se caracteriza por provocar trastornos gastrointestinales y mentales, además de producir anemia, es decir, déficit de hemoglobina en la sangre; donde interfiere con la síntesis del grupo hemo, al inhibir la actividad de la enzima ALA-D [Macarulla *et al.*, 1994].

1.5 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PLOMO

Actualmente se cuenta con diversas herramientas para la determinación de metales, y se realizan estudios que buscan mejorar aspectos como: la sensibilidad, rápida preparación de la muestra, bajos costos y todo aquello que conlleve a la obtención de resultados confiables. En la **Tabla 2** se presenta un listado con las técnicas analíticas para la determinación de metales.

Tabla 2. Técnicas instrumentales para la determinación de metales.

No	Técnica instrumental
1	Espectrometría de absorción atómica AAS
2	Espectrometría de emisión atómica AES
3	Espectrometría de fluorescencia atómica AFS
4	Espectrometría de masas atómica
5	Espectrometría atómica de rayos X

Teniendo en cuenta las características fisicoquímicas del analito se debe escoger con detenimiento la técnica analítica a usar, considerando además la sensibilidad que se desee, ya que unas técnicas son más sensibles que otras. En la **Tabla 3**, se pueden apreciar la sensibilidad para algunas técnicas analíticas instrumentales y algunos elementos [Skoog *et al.*, 2005].

Tabla 3. Límites de detección en *ng/mL* para algunos elementos.

Elemento	AAS Llama	AAS electrotérmico	AES Llama	AES ICP	AFS Llama
As	100	0,02	0,0005	40	100
Cd	1	0,0001	800	2	0,01
Mg	0,1	0,00002	5	0,05	1
Na	2	0,0002	0,1	0,2	-
Pb	10	0,002	100	2	10
V	20	0,1	300	30	50
Zn	2	0,00005	0,0005	2	0,02

1.5.1 Espectrofotometría de absorción atómica

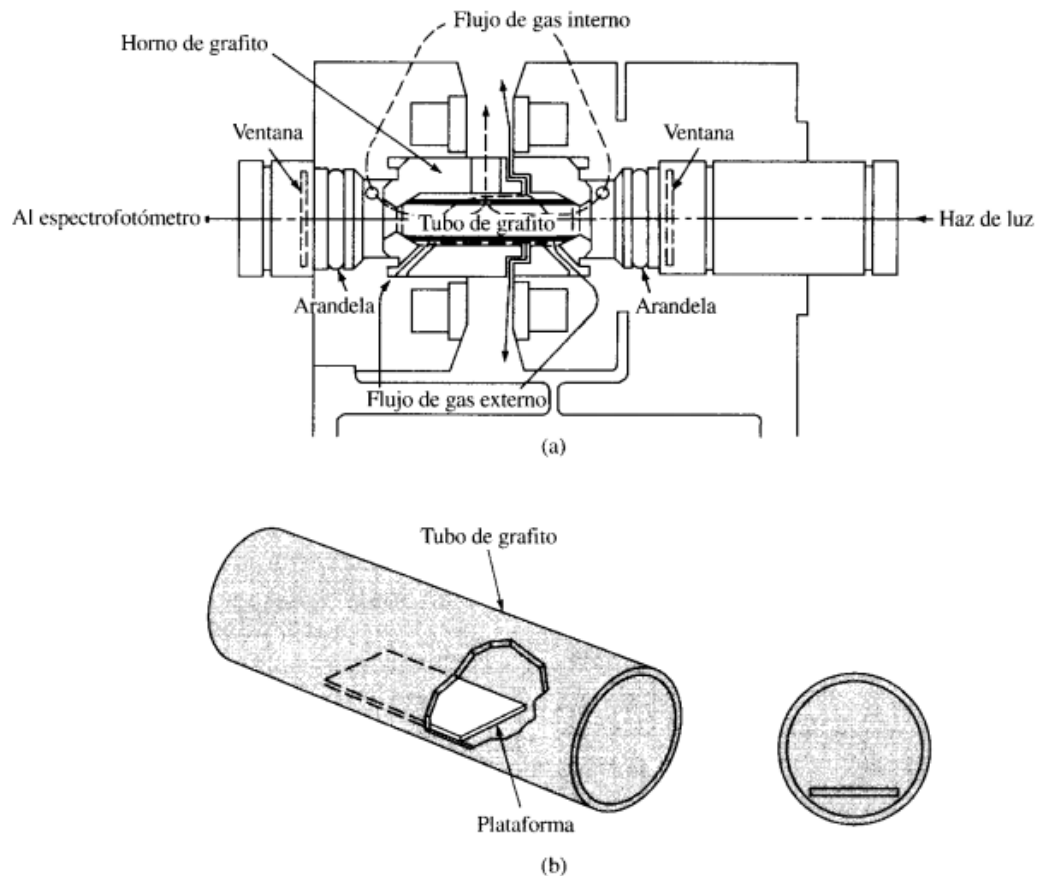
Actualmente la espectrofotometría de absorción atómica es la técnica instrumental más utilizada para la determinación de metales, ya que ofrece la posibilidad de analizar una gran cantidad de metales, y según el método de atomización, se pueden alcanzar mejores niveles de sensibilidad.

La espectroscopia de absorción atómica se basa en la absorción de radiación por parte de átomos en estado basal y fase vapor. En primer lugar, la muestra se divide en finas gotas a través de un nebulizador neumático (generalmente), para luego ser atomizadas. Los métodos principales de atomización son la atomización con llama y electrotérmica. Esta última se conoce también como horno de grafito y es más sensible que la llama directa, ya que los átomos o iones formados en la llama pueden perderse por su volatilidad, mientras que en el horno quedan atrapados permitiendo que sean detectados en concentraciones más pequeñas. Generalmente se utilizan volúmenes entre 0.5 y 10 μL que permiten los límites de detección en el intervalo de $10^{-10} - 10^{-13}$ g de analito.

En la **Figura 1.a**, se observa la sección transversal de un atomizador electrotérmico. En este sistema la atomización tiene lugar en un tubo de grafito de unos 5 cm de largo y 1 cm de diámetro interno, el cual se ajusta a un par de contactos eléctricos cilíndricos de grafito, que se ubican a ambos extremos del tubo y permiten calentar unos pocos microlitros de muestras ubicados sobre la plataforma de L'vov (**Figura 1.b**) para evaporarlos a baja temperatura. Luego se calcinan a una temperatura más alta y por último la corriente se incrementa rápidamente a varios cientos de amperios generando una temperatura de 2000 a 3000°C, que provoca la atomización de la muestra en unos pocos milisegundos a segundos. Los vapores generados a partir de la matriz de la muestra durante las

dos primeras etapas de calentamiento, son desalojados por un flujo de gas inerte (flujo interno). Además, se cuenta con un flujo de gas externo que evita la entrada de aire desde el exterior y la consiguiente incineración del tubo [Skoog *et al.*, 2005].

Figura 1. a) Sección transversal del horno de grafito. b) plataforma de L'vov y su posición en el horno de grafito, [Skoog *et al.*, 2005].



Después de obtenerse los átomos, se hace incidir radiación electromagnética de una fuente externa de luz, que emite la(s) línea(s) espectral(es) correspondiente(s) a la energía necesaria para una transición electrónica del estado normal o basal a un estado excitado. La elección de la lámpara o fuente de luz se hace de acuerdo al metal que se desea analizar. Existen diversas fuentes, una de ellas es la lámpara de cátodo hueco la cual consiste en un ánodo de tungsteno y un cátodo cilíndrico, sellado en un tubo de gas lleno de neón o argón a una presión de 1- 5 torr. El cátodo está construido con el metal cuyo espectro se desea obtener o bien sirve como soporte para una película de dicho metal. La ionización del gas se

produce cuando se aplica un potencial a través de los electrodos lo que da lugar a una corriente de 5-10 mA a medida que los iones migran hacia los electrodos.

Si el potencial es lo suficientemente grande, los cationes gaseosos adquieren la suficiente energía cinética para desalojar algunos átomos metálicos de la superficie del cátodo y producir una nube atómica. Una parte de los átomos dispersados se encuentran en estado excitado y emiten radiación característica en forma usual [Maroto. 2002] con la que se excita el analito. Finalmente el haz atenuado llega a un detector fotomultiplicador y produce una señal que es procesada mediante un software especializado.

Según el elemento a analizar, debe elegirse una configuración adecuada para el proceso de atomización. Por ejemplo, para el análisis de mercurio debe utilizarse un generador de hidruros y atomizar la muestra en vapor frío. La elección del tipo de llama también debe realizarse cuidadosamente. Por ejemplo, para el análisis de vanadio se recomienda la llama de óxido nitroso/acetileno que alcanza temperaturas más altas, permitiendo una mejor disociación del átomo. Si se considera la sensibilidad, se recomienda el uso de la atomización electrotérmica ya que permite obtener límites de detección más bajos. Entonces resulta importante planear la configuración del método, ya que influye directamente en la obtención de los resultados analíticos.

1.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Los resultados emitidos por parte de un laboratorio de análisis químico, requieren un grado de confianza con respecto a la veracidad y exactitud del valor reportado, de tal forma que satisfaga las necesidades previstas para dicho análisis y se garantice la fiabilidad del método empleado. Con la validación de la metodología analítica se demuestra que la medición realizada cuenta con las características previamente mencionadas.

La validación es la confirmación a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico [NTC-ISO/IEC 17025:2005]. Y debe ser tan rigurosa que satisfaga las necesidades y requisitos para el fin previsto. Además es considerada como una aplicación del ciclo Deming o ciclo PHVA (Planear, Hacer, Verificar, Ajustar) interpretado como una aplicación del método científico [Lazos, 2004], que caracteriza el proceso para evaluar los parámetros de desempeño del método.

1.6.1 Validación interna

El laboratorio debe aplicar métodos que sean apropiados para los ensayos dentro de su alcance, y que estén debidamente validados. Por tal razón se debe realizar pruebas experimentales bajo las condiciones del laboratorio, y obtener los valores de los parámetros que servirán como criterios de confianza del método analítico [Coy, 1999]. Así mismo, se debe documentar toda la evidencia adquirida según el sistema de gestión de calidad del laboratorio y constar por escrito que dicho proceso está validado y autorizado por el director del laboratorio para su aplicación.

1.6.2 Figuras de mérito

Las figuras de mérito son los parámetros que caracterizan el desempeño de un método de análisis, definiendo su adecuación en una situación de prueba dada [INAB, 2012]. Son consideradas las siguientes características de fiabilidad: límite de detección, límite de cuantificación, linealidad/intervalo de trabajo, precisión, exactitud y sensibilidad.

1.6.2.1 Límite de detección

El límite de detección se define sobre la base de evitar atribuir erróneamente una señal que no corresponde al analito (falso positivo) y al mismo tiempo evitar reportar como “no detectado” un “especimen” correspondiente al analito (falso negativo). Se define entonces como la mínima cantidad de un parámetro analítico (concentración) que puede ser detectado con un nivel definido de confianza utilizando un método específico [INAB, 2012].

Según ISO, el límite de detección es la concentración neta verdadera o la cantidad del analito en el material a analizarse que tiene una probabilidad de $(1-\beta)$ de ser distinguido del blanco de muestra. Donde β es la probabilidad de un falso negativo (IUPAC recomienda un valor de 0,05 para β) [Mocak *et al.*, 1997].

1.6.2.2 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel adecuado de precisión y exactitud. Indicando así el nivel más bajo para el rango de medición [INAB, 2012].

1.6.2.3 Intervalo de trabajo

Todo método cuantitativo requiere la determinación del intervalo de concentraciones sobre los cuales puede aplicarse el método. Dentro del cual puede existir un intervalo lineal, que se caracteriza por presentar una respuesta directamente proporcional a la concentración de analito, en relación con la formulación de la curva de calibración [INAB; 2012]. Dicho intervalo se ve afectado en su extremo inferior por el límite de detección y el límite de cuantificación y en su extremo superior por efectos que depende del sistema de respuesta del analito [EURACHEM, 1998].

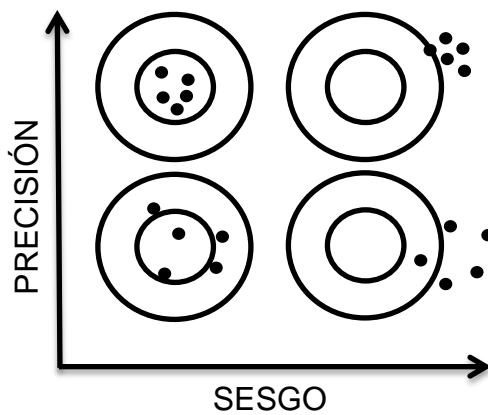
1.6.2.4 Precisión

La precisión es una medida del grado de concordancia entre los análisis múltiples de una muestra dada [APHA, 1992]. Estadísticamente se especifica mediante la desviación estándar, la varianza o el coeficiente de variación bajo determinadas condiciones caracterizando de esta forma la dispersión de las mediciones.

1.6.2.5 Exactitud

La exactitud es el grado de concordancia entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando que es imposible de conocer en la práctica; en su lugar se utiliza un valor aceptado como verdadero. Normalmente la exactitud se expresa en términos de precisión y de veracidad, esta última especificada mediante el sesgo. La veracidad expresa la cercanía de la media de un conjunto de resultados respecto al valor aceptado como real [EURACHEM, 1998; VIM, 2008]. La relación entre la precisión y sesgo se muestra en la **Figura 2**, encontrándose para una precisión alta y bajo sesgo un resultado exacto.

Figura 2. Efecto de la precisión y el sesgo en la exactitud.



1.6.2.6 Sensibilidad

La sensibilidad es el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito. En relación con la curva de calibración se determina como la pendiente del rango lineal, que depende del equipo y su optimización [INAB, 2012].

1.6.3 Control analítico de la medición

Luego de realizar la validación de la metodología analítica, se debe llevar a cabo el seguimiento de las operaciones analíticas particulares (como parte de su control de calidad interno), para verificar que el método se está desempeñando de acuerdo con lo esperado. El análisis de muestras de contenido conocido durante el uso rutinario de lotes de muestras, implica un control adecuado que permite al analista deducir si la variedad en las respuestas analíticas reflejan cambios inesperados e indeseados en el desempeño del método.

1.6.4 Control de calidad interno

El control de calidad interno, incluye la utilización de muestras para el control de la calidad, suficientemente estables y homogéneas. Comúnmente se realiza un seguimiento del valor analizado de la muestra de control, graficándolo en una carta de control, para la cual se han establecido límites de advertencia y límites de control; convencionalmente los límites de advertencia corresponden a $\pm 2\sigma$ (2 desviaciones estándar) del valor de la media y los límites de control a $\pm 3\sigma$ (3 desviaciones estándar) del valor de la media.

1.6.5 Incertidumbre en la medición analítica

Como resultado de la variabilidad inherente a la naturaleza y la imperfección en la realización de las mediciones, el valor exacto de una magnitud no se puede determinar; sólo se puede asignar un valor aceptado como verdadero al mensurando. Además, cabe señalar que toda medición puede tener asociados errores aleatorios (que pueden ser minimizados) y errores sistemáticos (que pueden ser eliminados) afectando así la medición y generando una duda sobre resultado obtenido.

El vocabulario internacional de metrología define la incertidumbre de la medición como un parámetro que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos al mensurando [VIM, 2008], a partir de la información que se utiliza. La incertidumbre

está compuesta de contribuciones de diversas fuentes, cuyos efectos deben ser evaluados y estimar su aporte a la incertidumbre total.

1.6.6 Fuentes de incertidumbre

Toda metodología analítica requiere el desarrollo de un procedimiento compuesto de varios pasos, que implican una contribución de incertidumbre asociada a la medición. Por lo tanto debe identificarse que pasos afectan significativamente el valor atribuido al mensurando y “cuantificar” dicho efecto.

Las fuentes de incertidumbre provienen de diversos factores involucrados en la medición, por ejemplo de los resultados de calibración, la incertidumbre del patrón, la repetibilidad de lecturas y la reproducibilidad de las mediciones entre otras [Lazos, 2000].

Algunas fuentes de incertidumbre se mencionan a continuación:

1.6.6.1 Medición de una masa

La balanza es uno de los instrumentos primordiales en un laboratorio, ya que se utiliza para determinar la cantidad de masa de la muestra a analizar o de los reactivos usados en la metodología.

Es un instrumento que se debe utilizar con delicadeza, y consultar sobre los detalles para pesar según el modelo de balanza que se tenga. A continuación se mencionan las reglas generales para utilizar la balanza analítica cualquiera que sea la marca o modelo.

- Centrar la carga sobre el platillo.
- No pesar objetos calientes.
- No tomar el objeto con las manos desnudas.
- Conservar la balanza limpia.
- Consultar al instructor sobre el ajuste de la balanza.

Aun con el uso correcto de la balanza, la medida de una masa tiene un error inherente al instrumento, que proporciona un rango dentro del cual se encuentra el valor verdadero de la medición, es decir, dicho rango se ve afectado por diversos factores. Las fuentes de incertidumbre asociadas a la pesada de la muestra pueden dividirse en tres tipos; la incertidumbre de calibración, incertidumbre de la propia medida de la masa y la deriva de la balanza [Maroto, 2002].

- **Incertidumbre de calibración**

Esta incertidumbre depende de si la balanza tiene una calibración interna o externa. En el caso del laboratorio la calibración es externa por lo que se debe usar la incertidumbre reportada en el certificado de calibración emitido por el laboratorio de calibración.

- **Incertidumbre de la propia medida de la masa**

Esta incertidumbre depende de la precisión y de la resolución de la balanza, y se determina mediante la siguiente expresión:

$$u_{(medida)} = (s(m_i)^2 + (res^2)/3)^{1/2} \quad \text{Ec.1.1.}$$

Donde $s(m_i)$ es la desviación estándar y “res” la resolución de la balanza.

- **Deriva de la balanza**

La incertidumbre de la deriva considera que la balanza se descalibra con el paso del tiempo y la diferencia entre la temperatura a la que se calibra la balanza $u(d_{cal})$ y la temperatura a la que se pesa la muestra $u(d_T)$.

$$u_{(deriva)} = (u(d_{cal})^2 + u(d_T)^2)^{1/2} \quad \text{Ec.1.2.}$$

Donde $u(d_{cal})$ se obtiene calculando la deriva entre dos calibraciones sucesivas. Esta deriva se calcula como la diferencia (dif) entre las correcciones obtenidas en ambas calibraciones.

$$U(d_{cal}) = ((dif_i^2)/3)^{1/2} \quad \text{Ec.1.3.}$$

La incertidumbre debida a la diferencia de temperatura en que se calibra la balanza y se pesa la muestra debe calcularse con la siguiente expresión:

$$u(d_T) = \text{sen } \Delta T \ m_{pat,i} / 3^{1/2} \quad \text{Ec.1.4.}$$

Donde sen, es la deriva de sensibilidad debida a cambios de temperatura y viene dada en las especificaciones de la balanza, ΔT es la diferencia máxima entre la temperatura del laboratorio y la temperatura a la que se hace la calibración de la balanza (20° C) y $m_{pat,i}$ es la masa patrón de referencia.

A continuación se mencionan otras fuentes de incertidumbre.

- **Corrección por flotación**

Un error por flotación afectara los datos si la densidad del objeto que se pesa difiere de las pesas patrón. El origen de este error es la diferencia de la fuerza de flotación ejercida por el medio (aire) sobre el objeto y las pesas patrón. La corrección para las balanzas electrónicas se obtiene por medio de la ecuación

$$w_1 = w_2 + w_2 (d_{aire}/d_{obj} - d_{aire}/d_{pesa}) \quad \text{Ec.1.5.}$$

Donde w_1 es la masa corregida del objeto, w_2 es la masa del objeto, d_{obj} es la densidad del objeto, d_{pesa} es la densidad de las pesas (la mayoría de las veces se usa 8 g/cm^3), d_{aire} es la densidad del aire desplazado por ellos y d_{aire} tiene un valor de $0,0012 \text{ g/cm}^3$.

- **Efectos de la temperatura**

Al pesar un objeto cuya temperatura difiera a la del medio ambiente se genera un error significativo. La causa más común es el tiempo necesario para que un objeto que ha sido calentado regrese a la temperatura ambiente. Existen dos fuentes de errores debido a la diferencia de temperatura. El primero ocasionado por la corriente de convección del aire que ejerce un efecto de flotación. El segundo, el aire caliente atrapado en un recipiente cerrado pesa menos que el mismo volumen a menor temperatura. Ambos efectos hacen que la masa aparente del objeto sea más baja [Skoog, 2005].

1.6.6.2 Medición de un volumen

Al igual que la pesada, la medición del volumen tiene implícito un error que contribuye con la incertidumbre total del método. En el mercado se puede encontrar dos tipos de material de vidrio: Tipo A y Tipo B, encontrándose que para el material de Tipo B, las tolerancias son el doble de las del Tipo A, y son reportadas por el fabricante, ya sea impresas sobre el material o en un certificado.

Además, el material de vidrio cuenta con una clasificación de acuerdo al mecanismo de medición: material de llenado “*in*”, que provee un volumen preciso en el interior de recipiente e.g. balones aforados, y de descarga “*ex*”, que provee un volumen preciso una vez descargado el recipiente, e.g. pipetas.

- **Efecto de la temperatura**

La temperatura a la que se realiza el experimento influye en la medición de un volumen principalmente por dos razones: el equipo volumétrico se calibra

convencionalmente a 20°C, pero la temperatura del laboratorio analítico al realizar el experimento puede diferir con facilidad de ésta en varios grados. En segundo lugar, la temperatura afecta tanto al volumen del material de vidrio como a la densidad de los líquidos. El coeficiente de dilatación para disoluciones acuosas diluidas es aproximadamente del 0,025% por grado, mientras que para recipiente de vidrio borosilicatado la variación de será del 0,001% por grado. Resulta evidente que los cambios en los volúmenes debidos al material de vidrio no son representativos y no deberán ser considerados como una fuente de incertidumbre significativa, a menos que se trabaje a una temperatura muy diferente de 20°C [Skoog, 2002].

Para estimar el efecto de la temperatura sobre el volumen se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Efecto de la temperatura} = \pm (V \cdot \Delta T \cdot C) \quad \text{Ec.1.6.}$$

Donde

V: volumen medido.

ΔT : es la diferencia de temperatura, tomando como referencia 20°C.

C: es el coeficiente de expansión para el agua.

1.6.6.3 Diluciones

En el desarrollo de la metodología se deben utilizar diluciones cuando la muestra analizada presenta una concentración que se sale del rango lineal de trabajo y para la preparación de la curva de calibración.

La dilución se caracteriza por un parámetro conocido como factor de dilución (F_d), el cual se calcula mediante la siguiente expresión:

$$F_d = V_2/V_1 \quad \text{Ec.1.7.}$$

Donde

V_2 : es el volumen de aforo.

V_1 . Es el volumen de la alícuota.

V_1 y V_2 representan las dos fuentes de incertidumbre en el proceso de dilución, por lo que debe considerarse la contribución de ambas. Y se tiene que se ven

afectadas por la calibración de material, la temperatura y la repetibilidad, expresada como sigue [Ramírez *et al.*, 2012 y CENAM, 2008].

$$u(d) = [(u_{v1}/V_1)^2 + (u_{v2}/V_2)^2]^{1/2} \quad \text{Ec.1.8.}$$

Donde

u_{v1} : es la incertidumbre debida al aforo.

u_{v2} : es la incertidumbre de la alícuota.

1.6.7 Estimación de la incertidumbre

Identificadas todas las fuentes de incertidumbre significativas se procede a cuantificar la incertidumbre. Se distinguen dos métodos para cuantificar las fuentes de incertidumbre: el método de evaluación Tipo A, basado en el análisis estadístico de una serie de mediciones experimentales, mientras el método de evaluación Tipo B, usa la información disponible, e.g. certificados de calibración [Lazos *et al.*, 2000].

- **Evaluación tipo A**

La incertidumbre de una medición (x_i) obtenida a partir de observaciones repetidas, bajo condiciones de repetibilidad, se estima con base en la dispersión de los resultados individuales y se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$u(x_i) = s / n^{1/2} \quad \text{Ec.1.9.}$$

$u(x_i)$ es la incertidumbre estándar de la media, para n repeticiones.

- **Evaluación tipo B**

Las fuentes de incertidumbre Tipo B son cuantificadas usando información externa y de acuerdo al tipo de distribución.

Cálculo según distribución normal:

$$u(x_i) = U/k \quad \text{Ec.1.10.}$$

Donde U es la incertidumbre expandida e.g. de un certificado, y k el factor de cobertura.

Cálculo según distribución rectangular:

$$u(x_i) = (a/2) / 3^{1/2} \quad \text{Ec.1.11.}$$

Con $a = a_+ - a_-$; los limites superior e inferior respectivamente.

Cálculo según distribución triangular:

$$u(x_i) = (a/2) / 6^{1/2} \quad \text{Ec.1.12.}$$

Con $a = a_+ - a_-$; los limites superior e inferior respectivamente.

1.6.8 Incertidumbre combinada

Debido a la contribución que tiene cada una de las fuentes de incertidumbre sobre el resultado final, se establece la incertidumbre estándar combinada U_c (siguiendo la ley de propagación de errores), que contiene toda la información esencial sobre la incertidumbre del mensurando.

La contribución de cada fuente depende de la incertidumbre estándar de cada fuente y del impacto de la fuente sobre el mensurando conocido como coeficiente de sensibilidad c_i .

La expresión para la estimación de la incertidumbre estándar combinada de cada fuente es [Lazos *et al.*, 2000]:

$$U_{c_i} = u(x_i) * c_i \quad \text{Ec.1.13.}$$

Donde c_i se determina derivando parcialmente con respecto x_i .

Siguiendo la ley de propagación de errores se determina que la incertidumbre estándar combinada U_c es la raíz cuadrada de la suma cuadrática U_{c_i} .

Y finalmente, la incertidumbre expandida, con un factor de cobertura del 95%, estará dada por la ecuación:

$$U = 2U_c \quad \text{Ec.1.14.}$$

1.6.9 Expresión de la incertidumbre

Todo resultado analítico cuantitativo debe ir acompañado de la incertidumbre del mismo, ya que esta permite establecer el grado de confianza que se tiene sobre el valor obtenido. Para fines rutinarios, el valor del mensurando se expresa como sigue:

1.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de la información obtenida durante la experimentación permite establecer criterios para la aceptación de datos, además de identificar las fuentes de error aleatorio y sistemático que se pueden presentar en el desarrollo de la metodología.

Una de las herramientas del análisis estadístico es el análisis de varianza ANOVA, que resulta de gran utilidad para el control de procesos tanto en la industria como en laboratorios de análisis. Cuando se tiene una situación donde existe un factor de efecto aleatorio, el ANOVA de un factor se utiliza entonces para separar e identificar las diferentes fuentes de variación [Miller *et al.*, 2002], que pueden ser controladas por el analista con el fin de diseñar experimentos que permitan evaluarlas.

1.7.1 Datos atípicos

Cuando se tiene una serie de datos recolectados mediante la experimentación, pueden presentarse datos que no son representativos, en función del error que produjo dichos datos. Para identificar tales datos se cuenta con el estadístico T , para los valores extremos de cada grupo, calculado de la siguiente manera:

Ordenar los datos de menor a mayor

Calcular el promedio, X_{prom} , y la desviación estándar, s

Y calcular T , así:

$$T_{alto} = (X_{alto} - X_{prom})/s \quad \text{Ec.1.16.}$$

$$T_{bajo} = (X_{prom} - X_{bajo})/s \quad \text{Ec.1.17.}$$

Si el valor de T para cada caso es mayor al valor de T teórico para un nivel de confianza del 95% y n mediciones, el valor se rechaza. Si la aplicación del criterio de rechazo da positiva para más de dos datos, el ensayo debería repetirse [Coy, 1999].

2 METODOLOGÍA

2.1 PREVALIDACIÓN

En esta etapa se verificó que se cuenta con los reactivos, materiales e instrumentación necesaria para llevar a cabo el desarrollo experimental de la metodología estudiada, para la determinación de plomo en textiles y calzado.

2.1.1 Reactivos

Para la realización de este trabajo se utilizaron los siguientes reactivos:

- Agua destilada.
- Ácido nítrico: Merck, ref. 1.00456.2500.
- Cloruro de sodio: Sigma & Aldrich, ref. 31434.
- Hidróxido de sodio: Merck, ref. 1.06498.1000.
- L-Histidina monoclorhídrica monohidratada: Merck, ref. 1.04350.0025.
- Dihidrógeno fosfato de sodio monohidratado: Merck, ref. 14251.
- Ácido fosfórico: Riedel – de Haën, ref. 30417.

2.1.2 Material de referencia certificado

Se empleó como material de referencia certificado una solución de plomo de 1000 mg/L, marca Merck, ref. 1.19776.0100.

2.1.3 Material de laboratorio e instrumentación

Se utilizaron los siguientes materiales de laboratorio: Balanza analítica Mettler Toledo, modelo MC204/01, balones aforados de 25 mL, balones aforados de 50 mL, probeta de 50 mL, micropipetas de 10-100 μ L y de 100-1000 μ L, marca Thermo Scientific, vasos de precipitado de 100 mL, magnetos, embudos, papel filtro Whatman No. 41. Espectrofotómetro de absorción atómica, *Agilent Technologies*, modelo 240 FS AA, con horno de grafito, modelo GTA 120 equipado con PSD 120 y tubos de grafito con plataforma pirolítica (**Figura 3**), pHmetro, marca HACH, HQ40d.

- **Obtención de la matriz bajo estudio**

Las muestras se obtuvieron de una de las fábricas de calzado del barrio San Francisco de Bucaramanga, y las muestras textiles se obtuvieron de prendas de vestir (camisetas). Ambos tipos de muestra se seleccionaron al azar.

Figura 3. Espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito, *Agilent Technologies*.

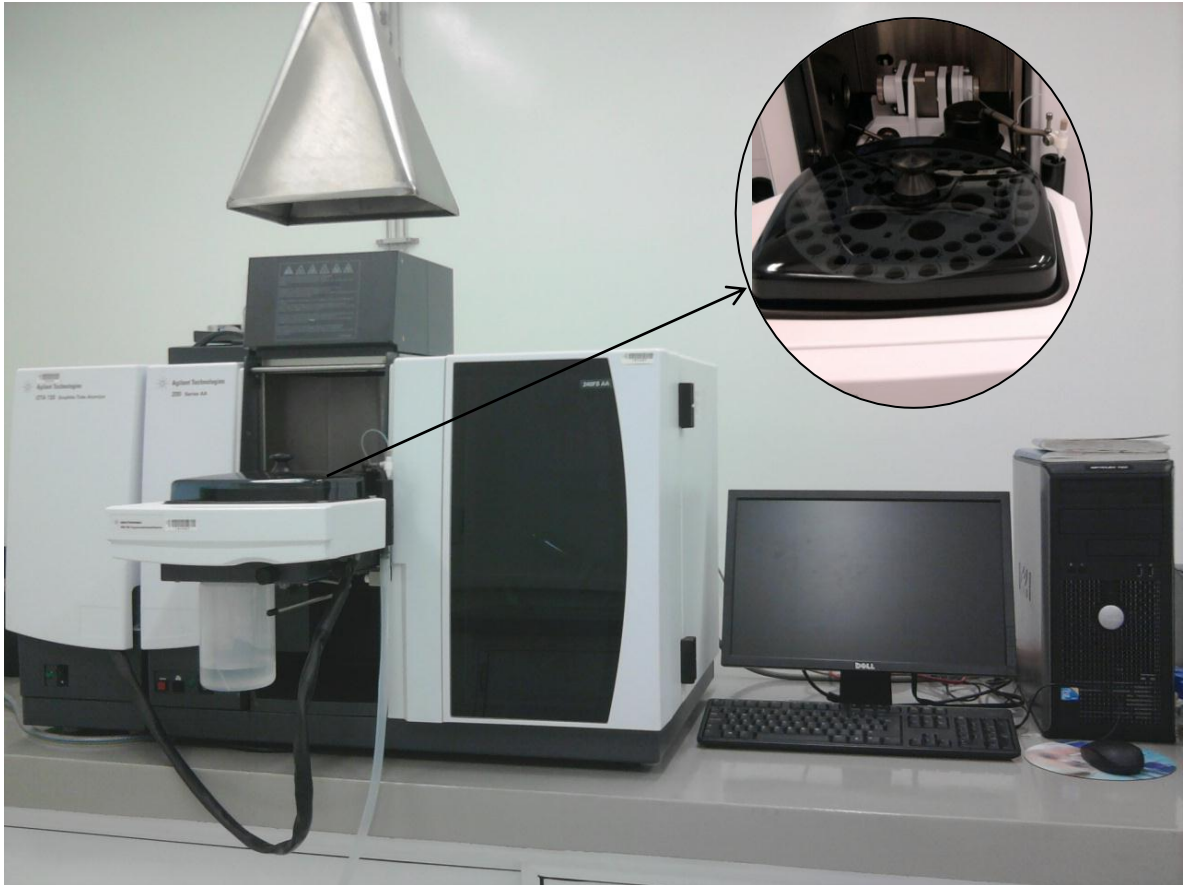


Foto de Carlos Adarme, 14 de abril de 2014, Laboratorio Químico de Consultas Industriales, UIS.

2.1.4 Revisión de procedimientos

Para cada metodología se realizó una revisión de los procedimientos validados e implementados.

2.1.4.1 Plomo extraíble en textiles

Se estudió el método UNI EN ISO 105-E04 *Standard-textiles- Colour fastness test – Colour fastness to acid perspiration* [ISO, 2008].

Preparación de la solución de sudor ácido artificial: se pesaron 0,5 g de L-Histidina monoclórhídrica monohidratada, 5 g de cloruro de sodio, 2.2 g de dihidrógeno fosfato de sodio monohidratado. Se agregó 500 mL de agua, se ajustó el pH a 5.5 con una solución de hidróxido de sodio 0,1 M y se llevó hasta un volumen final de 1L.

Preparación de la muestra: se secó la muestra textil en una estufa a 105 ± 2 °C durante 4 horas, se pasó a un desecador y se pesó. Se repitió este procedimiento hasta obtener un peso constante.

Extracción: Se pesó 1-2 g de muestra, se transfirió a un vaso de precipitado con 40 mL de solución de sudor ácido artificial y se agitó a 40 ± 2 °C durante $1 \text{ h} \pm 3$ minutos. Se filtró la solución en un balón de 50 mL utilizando papel filtro Whatman No. 41 y se aforó con agua destilada.

2.1.4.2 Plomo total en calzado (cuero)

Se implementó el método 3050B de la EPA (*Environmental Protection Agency*): *Acid digestions of sediments, slugs and soils* [EPA, 1996].

Se realizó una comparación entre este método y el método CPSC-CH-E1002-08: *Standard Operating Procedure for Determining Total Lead in Non-Metal Children's Products – Part II – Total Lead in Plastics, Polymers and Other Non-Siliceous Materials* [CPSC, 2009]. Cabe resaltar que el método CPSC fue modificado en la etapa de calentamiento, puesto que se realizó la digestión en una placa de calentamiento y no asistida con microondas, como lo describe el método.

A continuación se describen los procedimientos estudiados.

- **EPA 3050B**

Se pesó 1-2 g de muestra (peso húmedo) ó 0,150 – 1 g de muestra (peso seco) y se pasó a un recipiente adecuado para la digestión. Se adicionó 10 mL de ácido nítrico 1:1, se calentó a $95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 10-15 minutos sin ebullición. Se enfrió y se adicionó 5 mL de ácido nítrico concentrado, se mantuvo a reflujo por 30 minutos. La presencia de humos marrones indicó la oxidación de la muestra por el ácido nítrico. Se agregó ácido hasta la ausencia de humos marrones (porciones de 5 mL

cada vez), indicando así la reacción completa con HNO_3 . Posteriormente se evaporó hasta 5 mL.

Una vez culminada la etapa anterior, se agregó 2 mL de agua destilada y 3 mL de H_2O_2 al 30%. Se calentó hasta que la efervescencia disminuyera o hasta que la apariencia general de la muestra no cambiara. Una vez ha disminuida la efervescencia, se realizó la reducción de volumen hasta aproximadamente 5 mL.

- **CPSC-CH-E1002-08**

Se pesó 150 mg de muestra, se transfirió a un recipiente adecuado para realizar la digestión. A temperatura ambiente se adicionó 5 mL de HNO_3 concentrado, hasta completar la reacción inicial entre el ácido y la muestra.

Método microondas: incrementar la temperatura hasta $210^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ en aproximadamente 20 minutos, y mantener esta temperatura durante 10 minutos. Dejar enfriar la muestra y transferir cuantitativamente a un balón aforado de 50 mL y aforar con agua destilada.

Modificación del método: en lugar de realizar la digestión asistida con microondas, se llevó la muestra a una placa de calentamiento a una temperatura de 95°C (sin ebullición) por una hora, hasta ausencia de desprendimiento de humo marrón, lo que indicó reacción completa con el ácido nítrico.

2.1.5 Verificación de materiales, reactivos e instrumentación

Para garantizar las condiciones óptimas de experimentación, se realizó la verificación del material usado en el desarrollo experimental, la calibración de los equipos y el grado de pureza de los reactivos. Este último con el fin de garantizar que no existe contaminación de la muestra. El material de vidrio se verificó de acuerdo con lo establecido en el laboratorio, según la norma IS/ISO 4787: 2010 *Laboratory glassware – Volumetric instruments – Methods for testing of capacity and for use*.

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico, y el material de referencia certificado cuenta con una garantía de su pureza e incertidumbre, de tal forma que permiten dar certeza de las mediciones realizadas.

2.1.5.1 Verificación de la instrumentación

- **Balanza analítica**

Se cuenta con un certificado de calibración expedido por la empresa METROLABOR LTDA, institución autorizada para realizar la calibración de balanzas.

- **Espectrofotómetro de absorción atómica**

Este equipo fue calibrado y verificado por la empresa Agilent (México).

- **pHmetro**

La verificación se realiza con estándares a pH 4 y 7 y se aplican los criterios establecidos en el sistema de gestión de calidad del laboratorio.

2.1.5.2 Verificación de material volumétrico

Se realizó la verificación de material volumétrico mediante el procedimiento interno establecido en el laboratorio para la validación de métodos.

2.2 VALIDACIÓN

Para la validación de la metodología se realizó un estudio de las variables instrumentales, el diseño experimental, las figuras de mérito analíticas y la estimación de la incertidumbre siguiendo un orden lógico y sistemático.

2.2.1 Optimización de variables instrumentales

Se realizó la optimización de las variables instrumentales de acuerdo a las recomendaciones establecidas por el fabricante, con el fin de garantizar un desempeño óptimo del equipo en el momento de analizar las muestras.

2.2.1.1 Optimización de la temperatura de calcinado y atomización

Para la optimización de las temperaturas de calcinado y atomización se preparó una solución estándar de plomo y se diseñó un experimento con ayuda del programa SRM Wizard (*Surface Response Methodology*), estableciendo un total de 12 ensayos en los cuales varían las temperaturas de calcinado y atomización.

Con los resultados obtenidos para cada ensayo se determinan las temperaturas para las cuales la absorbancia del estándar es máxima.

2.2.1.2 Concentración de modificador

Con base en la información suministrada por el fabricante se evaluaron las concentraciones de ácido fosfórico (modificador) para las cuales la absorbancia es máxima.

Se prepararon soluciones estándar con una concentración de 15 µg/L de plomo, adicionando diferentes cantidades de modificador de tal forma que su concentración final oscilara en torno a la recomendada (1000 µg/L de ácido fosfórico). Las concentraciones de modificador estudiadas son: 500 µg/L; 1000 µg/L; 1500 µg/L; 2000 µg/L.

2.2.1.3 Optimización de la etapa de extracción

Para establecer las condiciones óptimas de extracción en textiles, se evalúa la temperatura, tiempo y volumen de solución extractora. Se plantea la siguiente matriz de experimentos que permite determinar el efecto que tiene cada variable (véase **Tabla 4**), así como las posibles interacciones entre ellos durante la extracción.

Tabla 4. Matriz de experimentos.

No. experimento	Tiempo	Temperatura	Solución extractora
No. 1	1h	Ambiente	40 mL
No. 2	2h	Ambiente	40 mL
No. 3	1h	50°C	40 mL
No. 4	1h	Ambiente	80 mL
No. 5	1h	50°C	80 mL
No. 6	2h	Ambiente	80 mL
No. 7	2h	50°C	40 mL
No. 8	2h	50°C	40 mL

2.2.2 Intervalo de trabajo

Para determinar el intervalo de trabajo se prepararon estándares de plomo a diferentes concentraciones y se estableció visualmente el intervalo de respuesta

lineal; es decir, el intervalo para el cual la señal adquirida tiene una relación lineal con la concentración de plomo.

2.2.3 Curva de calibración

De acuerdo con el intervalo de trabajo se determinaron los puntos para realizar la curva de calibración, véase **Tabla 5**. A partir del MRC (1000 mg/L de plomo) se preparó una solución stock de 1 mg/L con la que se realizó la curva de calibración.

Solución stock: se toman 25 µL del MRC y se afora a 25 mL.

Tabla 5. Soluciones estándar de calibrado.

Concentración [µg Pb/L]	Volumen alícuota [µL]	Volumen aforo [mL]
0	0	25
1	25	25
5	125	25
10	250	25
20	500	25
30	750	25
40	1000	25

A cada solución estándar de calibrado se adicionó 0,5 mL de ácido fosfórico al 5%, véase numeral 3.2.1.2.

2.2.4 Linealidad

Para comprobar la linealidad en la curva de calibración, se realizan los análisis sobre los resultados obtenidos en la curva de calibrado: se comprueba visualmente la linealidad de la curva, se calcula el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y se realiza el análisis de varianza ANOVA.

Para determinar si el coeficiente de correlación lineal es realmente significativo se realiza la prueba t de *student*, usando la ecuación 2.1.

$$t_{\text{cal}} = \frac{|r| \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{Ec.2.1.}$$

Donde r es el coeficiente de correlación y n el número de pares usados para calcular r . Se compara entonces el valor de t_{cal} con el tabulado para un nivel de confianza del 95%, usando una prueba t de dos colas y $n-2$ grados de libertad, véase Anexo A.

2.2.5 Diseño experimental

Se preparan los grupos de muestras que representaran cada grupo de ensayo, de acuerdo a los lineamientos establecidos en la guía de validación de métodos analíticos del Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander. En total se deben correr un mínimo de 5 ensayos en 5 días diferentes que pueden ser continuos o alternos, con una diferencia máxima de 3 días entre un ensayo y otro. El grupo básico de “muestras” a analizar en cada ensayo es:

- Dos blancos del método: para determinar los límites de detección y cuantificación del método.
- Tres soluciones estándar, una con concentración de $0,09C$, una de concentración $0,9C$ y una solución de concentración $0,5C$, donde C es la concentración del estándar de calibración más alto. Con estas disoluciones se establecerá la precisión y la exactitud del método en términos de % de error y porcentaje de recuperación.
- Una muestra natural: para establecer la precisión del método.
- Una muestra natural fortificada ($0,5C$): para establecer el porcentaje de recuperación de la matriz y establecer posibles interferencias por matriz.
- Un estándar de concentración $0,6C$ para establecer la dispersión de datos al aplicar el método y determinar la carta de control.

2.2.6 Figuras de mérito

2.2.6.1 Límite de detección y cuantificación

Con los datos de los blancos de muestra se calcula el límite de detección del método usando la siguiente ecuación:

$$LDM = \bar{Y} + 3s \quad \text{Ec.2.2.}$$

Para determinar el límite de cuantificación se utiliza la ecuación:

$$LCM = \bar{Y} + 10s \quad \text{Ec.2.3.}$$

Donde s para ambos casos es la desviación estándar del blanco y \bar{Y} es el promedio de las determinaciones en el origen de la curva de calibración.

2.2.6.2 Precisión

La precisión del método se determina calculando el coeficiente de variación de las soluciones estándar preparadas para rango bajo, medio y alto.

2.2.6.3 Exactitud

La exactitud del método se determina calculando el porcentaje de recuperación, el error relativo y el estadístico t a los blancos de muestra fortificados.

2.3 ELABORACIÓN DE LAS CARTAS DE CONTROL

2.3.1 Carta de control para textiles y calzado

Se enriquece un blanco de muestra, de tal forma que se obtenga una señal cercana al 60% del límite superior de la curva de calibración y se monitorea durante un intervalo de 10 días.

2.4 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

Para la estimación de la incertidumbre se identifican las fuentes de incertidumbre significativas y se procede a “cuantificar” su efecto sobre el resultado final.

2.4.1 Caracterización de las fuentes de incertidumbre

Para cada metodología analítica se identifican las fuentes de incertidumbre y se estima la incertidumbre total expandida.

2.4.1.1 Fuentes de incertidumbre en la determinación de plomo total en calzado

En general la incertidumbre se relaciona con la pesada de muestra, la preparación de las soluciones estándar y las diluciones realizadas. En la **Tabla 6**, se presenta un resumen de las fuentes de incertidumbre.

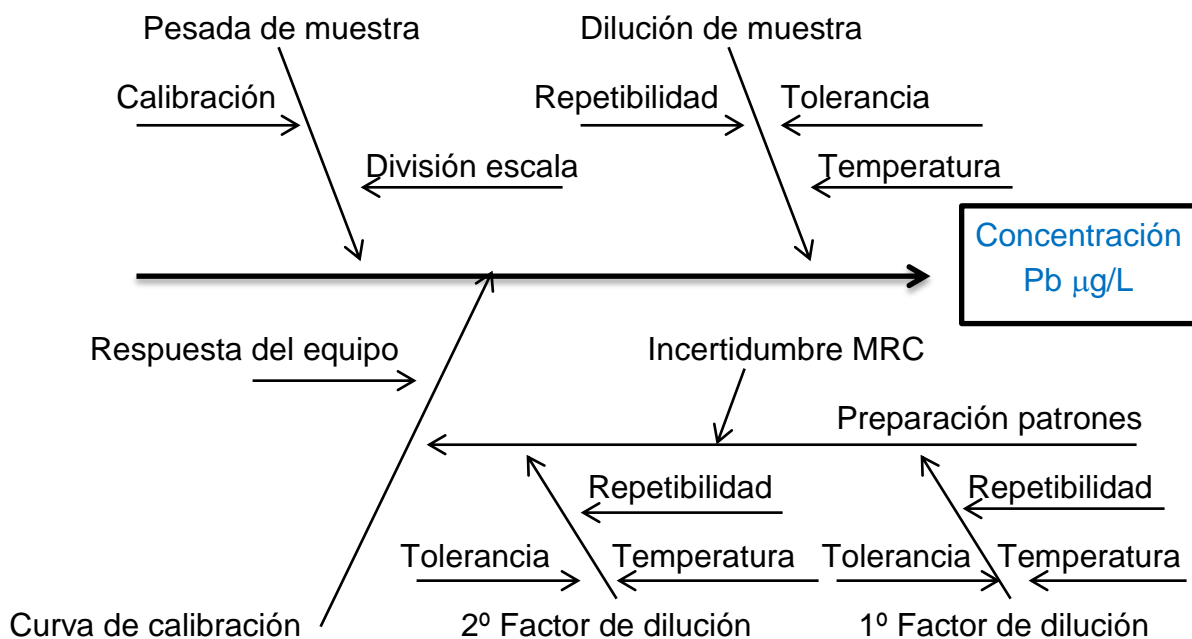
2.4.1.2 Fuentes de incertidumbre en la determinación de plomo extraíble en textiles

Al igual que el caso anterior se identificaron las fuentes de incertidumbre, considerando cada etapa de la metodología analítica. En la **Tabla 7**, se presenta un resumen de las fuentes de incertidumbre para esta metodología. En la **Figura 5**, se observa el diagrama causa-efecto para la incertidumbre del método, donde se presentan todas las fuentes de incertidumbre que afectan el desarrollo experimental.

Tabla 7. Fuentes de incertidumbre en el método para la determinación de plomo en textiles.

Fuente de incertidumbre	Tipo de incertidumbre
Pesada de la muestra	Tipo A
Aforo balón de 50 mL	Tipo A
Preparación curva de calibración	Tipo A, Tipo B

Figura 5. Diagrama causa-efecto para determinación de la incertidumbre en textiles.



3 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 PREVALIDACIÓN

3.1.1 Verificación de reactivos

Para determinar la posible contaminación por parte de los reactivos utilizados en la metodología analítica, se revisaron los certificados de análisis y se realizó una verificación. Los resultados obtenidos, consignados en la **Tabla 8**, permiten concluir que solo existe contaminación por parte del ácido nítrico.

Tabla 8. Análisis de los reactivos para las metodologías analíticas.

Reactivo	Concentración de Pb $\mu\text{g/L}$
Agua destilada	<LDM
Sudor ácido artificial	<LDM
Ácido nítrico	1,5
Ácido fosfórico	<LDM

3.1.2 Verificación del material volumétrico

La verificación de material de vidrio se realizó tomando los volúmenes necesarios de agua destilada para cada material en particular y comparando los resultados con las tolerancias establecidas por el fabricante.

En la **Tabla 9**, se evidencia que el material volumétrico usado en las metodologías cumple con las tolerancias establecidas por el fabricante, demostrando que es apto para el uso en la validación. Así mismo, en la **Figura 6** se puede observar que el comportamiento del error para el balón de 25 mL no presenta tendencias.

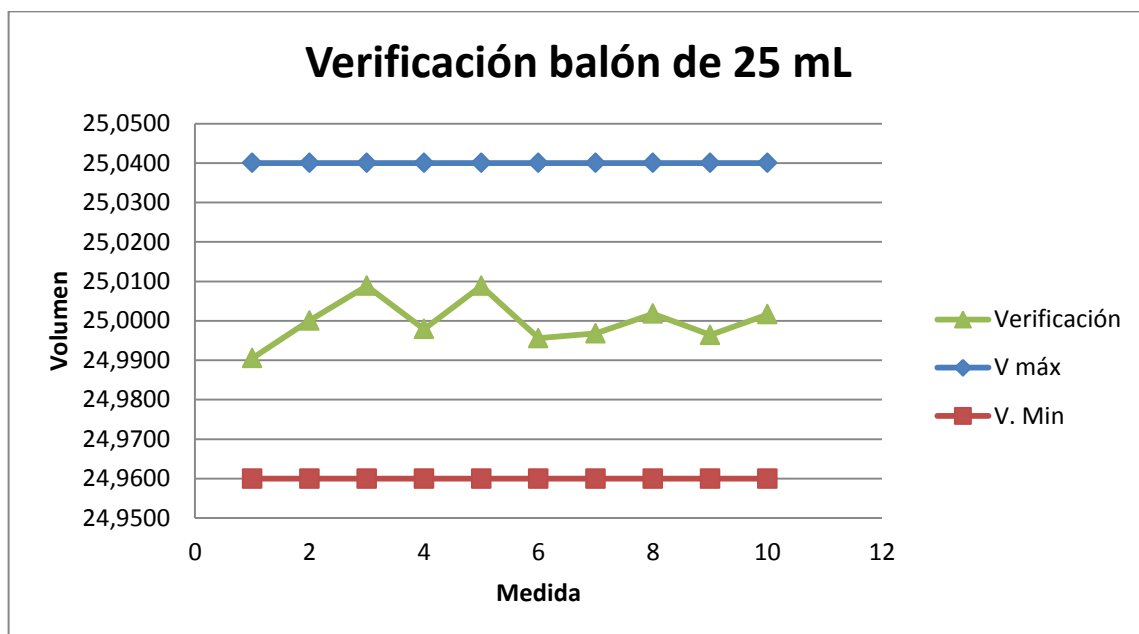
Tabla 9. Verificación del material.

Medida	Balón de 25 mL	Balón de 100 mL	Micropipeta de 10-100 μL		Micropipeta de 100-1000 μL	
			10 μl	100 μL	100 μL	1000 μL
1	24,9905	99,9927	10,0394	99,7916	101,29351	1000,2860
2	25,0001	100,0017	9,8386	99,9924	99,88805	999,8844
3	25,0088	99,9912	10,4410	100,0928	100,89195	1000,0852
4	24,9979	100,0237	10,0394	99,8920	101,49429	1000,2860
5	25,0088	99,9997	9,8386	100,2936	99,98844	999,9848
6	24,9956	99,9846	9,9390	99,5908	100,99234	999,8844

Medida	Balón de 25 mL	Balón de 100 mL	Micropipeta de 10-100 μL		Micropipeta de 100-1000 μL	
			10 μl	100 μL	100 μL	1000 μL
7	24,9968	99,9869	9,8386	100,0928	99,68727	1000,4867
8	25,0018	100,0004	10,1398	99,5908	99,88805	999,9848
9	24,9964	99,9913	9,9390	99,7916	100,89195	1000,0852
10	25,0016	99,9717	10,0394	100,1932	99,58688	1000,2860
S	0,0057	0,0136	0,183	0,242	0,719	0,202
tolerancia*	$\pm 0,04$	$\pm 0,1$	$\pm 0,8$	$\pm 0,8$	± 8	± 8

*Nota: las tolerancias para los balones están dadas en mL y para las micropipetas en μL .

Figura 6. Verificación del balón de 25 mL



3.2 VALIDACIÓN

3.2.1 Optimización de variables instrumentales.

3.2.1.1 Optimización de la temperatura de calcinado y atomización.

En la **Tabla 10**, se presentan los resultados obtenidos para la optimización de las temperaturas de calcinado y atomización. Del análisis de las absorbancias obtenidas para cada ensayo, se observa que para una temperatura de calcinado de 800°C y una temperatura de atomización de 2100°C la señal es máxima.

Tabla 10. Señales obtenidas en el estudio del programa de temperaturas.

Método	Temperatura de calcinado	Temperatura de atomización	Lectura (A)*.
1	750	2050	0,0489
2	850	2050	0,0490
3	750	2150	0,0464
4	850	2150	0,0466
5	800	2100	0,0465
6	800	2100	0,0475
7	720	2100	0,0506
8	871	2100	0,0505
9	800	2024	0,0510
10	800	2171	0,0487
11	800	2100	0,0515
12	800	2100	0,0505

*(A): Absorbancia registrada.

Adicionalmente se realizaron réplicas de ensayos para una concentración de 5 µg/L con variación en las temperaturas de atomización (2100, 2200 y 2300). Los resultados reportados en la **Tabla 11**, señalan que la temperatura óptima de atomización es de 2200°C. Con temperaturas superiores a 2200°C la señal obtenida disminuye probablemente por pérdidas por volatilidad de los átomos de plomo.

Tabla 11. Optimización de la temperatura de atomización.

Concentración	Lectura (A)		
	2100°C	2200°C	2300°C
5 µg/L	0,0205	0,0221	0,0211

En cuanto a la temperatura de calcinado, que busca la eliminación de materia orgánica y otras especies volátiles para reducir las interferencias, se evidencia que para temperaturas inferiores a 800°C la señal disminuye, probablemente por la presencia de interferentes que no alcanzan a ser vaporizados a esas temperaturas. Por otro lado, la disminución de la señal que se observa para temperaturas superiores a 800°C corresponde a pérdidas del analito por vaporización.

Con los 12 métodos planteados, además de optimizar las temperaturas de calcinado y atomización, se determina que la temperatura de secado (la primera

etapa del programa de temperaturas) es de 95°C. Temperatura que debe ser establecida de acuerdo con el punto de ebullición del solvente. En este caso es una solución acuosa, por lo que se programa una etapa de secado por debajo de 98°C (temperatura de ebullición del agua) y así evitar pérdidas del analito por dispersión.

3.2.1.2 Estabilización de la señal (concentración del modificador)

El modificador de matriz utilizado para estabilizar la señal es ácido fosfórico al 5% (aprox. 50.000 ppm). En la **Tabla 12**, se puede observar las cantidades o concentración de modificador usado para estabilizar la señal de plomo. La cantidad de modificador que reportó la señal más alta, para el estándar estudiado de 5µg Pb/L fue de 2 mL, cantidades menores reportan una absorbancia menor, debido a que la estabilización de la señal para la relación Pb vs modificador a estas concentraciones y una temperatura de 800°C no es eficiente, es decir, se tienen pérdidas por volatilidad.

Tabla 12. Resultados para el estudio de la optimización de la señal.

Cantidad de Modificador mL	Concentración final de modificador mg/L	Lectura µg/L
0	0	2,29
0,5	500	3.32
1	1000	3.67
1,5	1500	4.05
2	2000	4.90

3.2.1.3 Comparación de métodos para la extracción de plomo total en calzado

En la **Tabla 13**, se pueden observar los resultados obtenidos para los dos métodos estudiados. En cada caso se pesó alrededor de 150 mg de muestra, y se desarrollaron los procedimientos descritos en el numeral 2.1.5.2.

Tabla 13. Resultados para la comparación de métodos.

Método	Lectura µg/L*
EPA	425.70
CPSC	413.06

(*) Nota: ambos ensayos se realizaron por duplicado; en la tabla se presenta el valor promedio para cada ensayo.

De acuerdo con los resultados, el método EPA es la mejor alternativa para la determinación de plomo en calzado. Esto se debe a que el método EPA utiliza una combinación de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno para la extracción que resulta en una digestión de la muestra más efectiva y permite obtener cantidades de analito más altas.

3.2.2 Plomo extraíble en textiles

Como parte del estudio realizado para analizar el plomo extraíble con la solución de sudor ácido artificial (s.a.), se diseñó un experimento con el fin de determinar el efecto que tiene la cantidad de sudor ácido artificial en la lectura con horno de grafito.

Después de usar diferentes cantidades de sudor sobre un blanco de muestra enriquecido con 15 µg Pb/L, se procedió a analizar la concentración en cada solución. En la **Tabla 14**, se muestra el promedio de los resultados, donde se puede observar que la cantidad de sudor causa una interferencia considerable en la lectura.

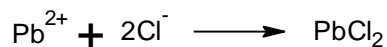
Tabla 14 Efecto del sudor ácido artificial en la lectura por horno de grafito.

Cantidad de (s.a.)	Lectura (A)
5 mL	13,787
10 mL	8,761
20 mL	4,11

El efecto causado por el sudor ácido artificial sobre la señal, se debe a la presencia de sales, las cuales causan interferencias químicas y no específicas además de producir una señal sustancial de *background* [NHAM, 2010].

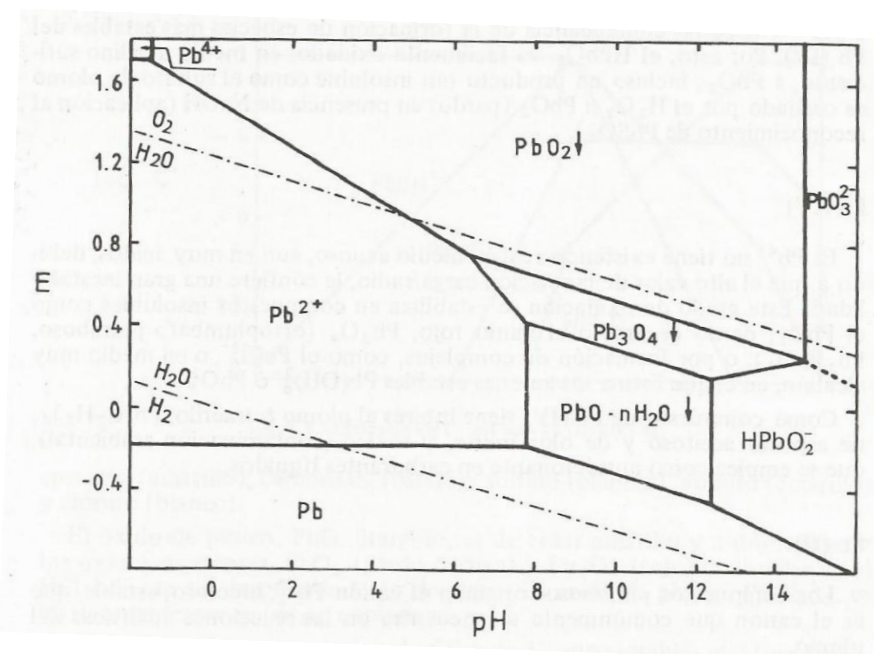
Como se mencionó en la sección 2.1.5.1, la solución de sudor ácido contiene cloruro de sodio, que produce por disociación cloruros, y los compuestos plumbosos usados en la industria textil como mordientes (e.g. acetato de plomo) o pigmentos (e.g. carbonato de plomo), originan el catión Pb^{2+} , el cual es estable en soluciones acuosas a un pH de 5,5 (véase **Figura 7**) [CONDE, et. al., 2001].

Posteriormente los iones Pb^{2+} y Cl^- generan la formación de $PbCl_2$ en la fase condensada [EBDON, 1998] durante la etapa de secado [AKMAN *et al.*, 1990], de acuerdo a la siguiente reacción:

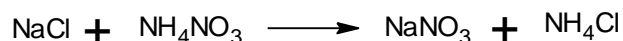


Y probablemente se presentan pérdidas del analito por volatilidad en la etapa de calcinado [AKMAN *et al.*, 1990].

Figura 7. Diagrama Log C – pH para Pb (II) 10^{-2} M [CONDE, *et al.*, 2001].



Para eliminar la interferencia por los iones cloruros se usó nitrato de amonio que forma compuestos volátiles con el sodio y el cloruro de acuerdo con la siguiente reacción química.



Los compuestos formados en la reacción anterior son volatilizados en la etapa de calcinado (800°C) del programa de temperaturas ya que el nitrato de sodio se descompone a 380°C y el cloruro de amonio se sublima a 335°C [EBDON, 1998].

Sin embargo, la eficiencia del nitrato de amonio para eliminar la interferencia causada por los cloruros no es aceptable, y se presentan pérdidas que no permiten realizar un proceso óptimo de validación. En la **Tabla 15** se observan los resultados obtenidos para diferentes concentraciones de nitrato de amonio (modificador de matriz), donde se esperaba una absorbancia de 0,14.

Tabla 15. Señal observada para diferentes concentraciones de nitrato de amonio.

Concentración del modificador de matriz	Señal (A)	BG (A)*
50%	0,1306	0,4101
24%	0,1280	0,3741
16%	0,1173	0,4056

(*)BG (A): Absorbancia del “background”

Al usar una solución de nitrato de amonio al 50%, se logra eliminar gran parte de la interferencia ya que la señal obtenida es la más aproximada a la señal esperada; sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, no es suficiente para someter la metodología al proceso de validación. Además, al usar una concentración tan elevada de nitrato de amonio, se produce una volatilización violenta en la etapa de calcinado que conlleva a pérdidas del analito y genera una señal menor a la esperada.

Por su parte, la absorción de fondo se debe posiblemente a moléculas de NaCl, que además producen un efecto de oclusión disminuyendo la señal correspondiente al analito [AKMAN *et al.*, 1990]. En la **Tabla No 14**, se puede observar que la absorción de tipo no específico es mayor a la absorción producida por el analito afectando así la precisión y exactitud de los análisis y finalmente el proceso de validación. La corrección de fondo con una lámpara de deuterio y la adición del nitrato de amonio (que volatiliza las moléculas) ayudan a eliminar esta interferencia, pero no lo suficiente para obtener resultados aceptables para un proceso de validación, teniendo en cuenta además, que la volatilización violenta puede ocasionar pérdidas mayores a las presentadas en los ensayos realizados.

Por su parte, los resultados obtenidos en la matriz de experimentos (véase **Anexo B**) planteada en la sección 2.2.1.3 permiten concluir que la temperatura, tiempo y volumen de solución extractora óptimos son de 50°C, 2 h y 40 mL respectivamente.

3.2.3 Figuras de mérito – Plomo total en calzado

Para la determinación de las figuras de mérito se utilizaron blancos de muestra enriquecidos con un material de referencia certificado. Luego se sometieron al proceso de digestión EPA, que resultó ser el más eficiente (ver numeral 3.2.1.4.) y

se evaluaron los resultados de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos por el laboratorio.

Cada blanco enriquecido permite evaluar un parámetro de desempeño en el proceso de validación como se ha descrito en el numeral 2.2.5. y establecer la evidencia objetiva acerca de la idoneidad del método para el fin previsto.

3.2.3.1 Curva de calibración

Para establecer el rango lineal de trabajo se revisó el “cookbook” del fabricante, en el cual sugiere que la respuesta del equipo es lineal hasta 30 $\mu\text{g/L}$. Por tanto, se prepararon soluciones estándar hasta este valor, véase **Tabla 16**.

Tabla 16. Absorbancia de patrones en la curva de calibración.

Concentración $\mu\text{g/L}$	Absorbancia
0	0,0059
1	0,0093
5	0,0240
10	0,0472
20	0,0843
30	0,1211

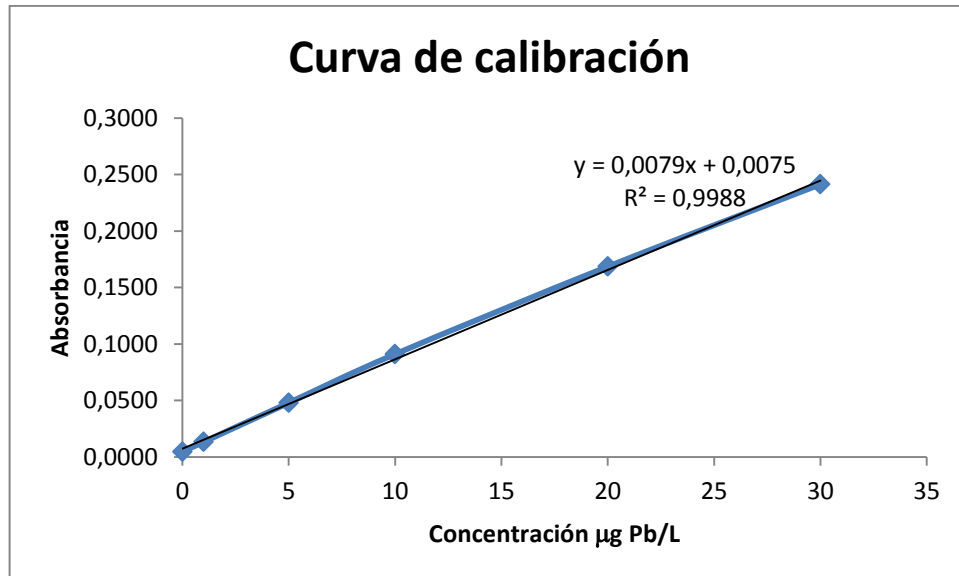
Para estos patrones el coeficiente de correlación es mayor a 0,995. Se establecieron 6 soluciones estándar hasta una concentración 30 $\mu\text{g/L}$ y se leyeron por un periodo de 6 días. En la **Tabla 17**, se registran las absorbancias para cada estándar de calibración durante este periodo.

Tabla 17. Curva de calibración.

Estándar $\mu\text{g/L}$	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio
0	0,0054	0,0048	0,0040	0,0047	0,0046	0,0043	0,0046
1	0,0150	0,0149	0,0121	0,0121	0,0125	0,0140	0,0134
5	0,0503	0,0502	0,0457	0,0427	0,0505	0,0485	0,0480
10	0,0984	0,0903	0,0832	0,0841	0,0968	0,0935	0,0911
20	0,1797	0,1742	0,1547	0,1505	0,1780	0,1740	0,1685
30	0,2522	0,2515	0,2190	0,2216	0,2561	0,2475	0,2413

Con los valores promedio se construyó la curva de calibración (véase **Figura 8**), la cual presenta un coeficiente de correlación de 0,9993 y una ecuación para la regresión lineal igual a: $y = 0,0079x + 0,0075$.

Figura 8. Curva de calibración Pb.



3.2.3.2 Linealidad

Para establecer la linealidad de la curva de calibración se realizó la prueba t de *student* a la recta de regresión lineal por mínimos cuadrados y el análisis de varianza para los valores obtenidos de las soluciones estándar.

Para ver si el coeficiente de correlación es realmente significativo se calculó el valor de t según la ecuación 2.1 y se comparó con el valor de t tabulado para un nivel de confianza del 95% y 4 grados de libertad. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

$$t_{\text{cal}} : 57,69$$

$$t_{\text{tab}} : 2,57$$

Como t_{cal} es mayor que t_{tab} se rechaza la hipótesis nula y existe correlación entre “y” y “x”.

Para realizar el análisis de varianza se calculó el estadístico R cuadrado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$R^2 = SC_{\text{regresión}}/SC_{\text{total}}$$

$$SC_{\text{regresión}} = \sum_i (y_{\text{cal}} - y_{\text{prom}})^2 ; SC_{\text{residual}} = \sum_i (y_i - y_{\text{cal}})^2$$

Donde SC es la suma de cuadrados.

Los cálculos para determinar el valor de R^2 se encuentran en el **Anexo C**. Se tiene que R^2 y r^2 son 0,9988 y 0,9988 respectivamente. Se observa que son iguales, demostrando así que los valores registrados para los estándares de calibración se ajustan a una línea recta.

3.2.3.3 Límite de detección y cuantificación

Para determinar el límite de detección (LDM) y cuantificación (LCM) se utilizan las ecuaciones 2.2 y 2.3 respectivamente. El valor de la ordenada en el origen se toma como una estimación de la propia señal del blanco; esta es una estimación más exacta de la señal del blanco, que el valor de la medida del blanco en términos prácticos. Además se aplica la desviación estándar a estos valores. Con estas consideraciones se calculó el valor del límite de detección y cuantificación y se expresó en mg/Kg considerando que el volumen de aforo es de 100 mL y la masa promedio es de 0,150 g. Los valores se encuentran en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Límites de detección y cuantificación.

señal del blanco	Desviación estándar	LDM mg/Kg	LCM mg/Kg
0,0075	0,000476	0,08	0,12

3.2.3.4 Precisión y exactitud

Para determinar la precisión del método se analizaron concentraciones de 0,09C, 0,5C y 0,9C (C = 30 $\mu\text{g/L}$) bajo, medio y alto rango respectivamente, mediante adicionados. Y se evaluó la precisión en términos del coeficiente de variación. Por su parte, la exactitud de método se evaluó para estas concentraciones en términos del error relativo y el cálculo t según las siguientes expresiones:

Para los adicionados en rango bajo (RB), medio (RM) y alto (RA):

$$t_{\text{exp}} = (X_{\text{real}} - X_{\text{prom}}) \sqrt{\frac{n}{s}}$$

Para las muestras enriquecidas:

$$t_{\text{exp}} = (100 - \%R) \frac{\sqrt{n}}{\%CV}$$

Donde el porcentaje de recuperación (%R) es igual a:

$$\%R = (C_{mnf} - C_{mn} / C_{teo}) * 100$$

C_{mn} : Concentración de la muestra natural.

C_{mnf} : Concentración de la muestra natural fortificada.

C_{teo} : Concentración esperada.

Tabla 19. Determinación de la precisión y exactitud del método.

Valor esperado (mg/kg)	Valor promedio obtenido (mg/kg)	Desviación estándar	%CV	% Error relativo	%R	Valor de t
1,8 (RB)	1,96	0,28	6,27	9,01	109,01	1,12
10 (RM)	9,84	0,95	5,87	1,52	98,47	0,57
18 (RA)	17,86	1,17	4,16	0,73	99,26	0,44

Nota: RB: Rango bajo; RM: Rango medio; RA: Rango alto.

Los valores promedio presentados en la **Tabla 19**, corresponden a las lecturas realizadas durante 6 días. Se observa en la tabla que los coeficientes de variación para los tres rangos son aceptables ya que cumplen con el rango establecido por el laboratorio. Adicionalmente se evaluó la precisión analizando dos muestras reales, una para textiles y otra para calzado (cuero), encontrando que la precisión (véase **Tabla 20**) también cumple con los criterios de calidad establecidos en el laboratorio para la precisión, que son < 10% para rango alto y < 20% para rango bajo en términos del coeficiente de variación.

Tabla 20. Determinación de la precisión en muestras reales.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	%CV
Calzado	7,77	7,415	7,355	8,995	7,785	8,28	7,93
Textil	3,245	2,97	3,005	2,925	2,695	3,07	2,98

Por su parte, para la exactitud del método se tiene que el valor de t_{cal} para estándares debe ser menor al valor de t_{tab} (véase **Anexo D**) y los porcentajes de recuperación deben estar entre el rango de 80% y 120%.

Los resultados obtenidos se reportan en la **Tabla 19**, y muestran que los porcentajes de recuperación junto con los valores de t , son buenos ya que cumplen con los criterios de calidad mencionados anteriormente.

Adicionalmente, se evaluó la posible interferencia por la matriz en términos del porcentaje de recuperación y el estadístico t para muestras enriquecidas. Para esto se fortificó una muestra real de textiles y calzado con una concentración de 0,5C y posteriormente se realizó el procedimiento de extracción (numeral 2.1.5.2).

Los resultados obtenidos se reportan en la **Tabla 21**, y muestran que los porcentajes de recuperación y el estadístico t son aceptables.

Tabla 21. Porcentajes de recuperación y el estadístico t en calzado y textiles.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	%R	t
Calzado	22,97	22,325	23,145	19,77	22,67	24,625	97,67	2,14
Textil	19,06	17,26	17,91	20,545	16,62	17,365	100,94	0,82

De acuerdo con los resultados obtenidos para el porcentaje de recuperación, el efecto de las interferencias es mínimo para las muestras reales analizadas.

3.3 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA CUANTIFICACIÓN DE PLOMO TOTAL EN CALZADO Y TEXTILES

Identificadas las fuentes de incertidumbre, se determinó el aporte de cada una en el resultado final.

3.3.1 Incertidumbre por la pesada de muestra

Como se mencionó en el numeral 1.6.6.1.1 la incertidumbre de la medida de la masa, depende de los errores asociados al proceso de calibración, a la deriva de la misma y al propio proceso de pesada de la muestra.

- **Incertidumbre estándar en la división de la escala de la balanza.**

La incertidumbre debida a la división de la escala (u_{de}), se determina a partir de la mínima cantidad que puede registrarse por la balanza, es decir, 0,0001g y es igual a:

$$u_{de}=0,0001/\sqrt{3} =5,8 \times 10^{-5}$$

- **Incertidumbre estándar en la calibración de la balanza**

En el certificado emitido por la empresa METROLABOR LTDA luego de calibrar la balanza se encuentra la siguiente función de incertidumbre expandida: $U=0,00026 + 2,9 \times 10^{-6} \times m_w$ (g). La incertidumbre estándar de la medición para un nivel de confianza del 95% ($k=2$) y una masa promedio de 1 g (cantidad utilizada en la validación) es igual a:

$$u_m = (0,00026+2,9 \times 10^{-6} \times 0,150)/2=1,302 \times 10^{-4}$$

- **Incertidumbre combinada en la pesada de muestras**

La incertidumbre combinada de la pesada es igual a:

$$u_{c1}=\sqrt{0,000058^2+0,000132^2}=1,42 \times 10^{-4}$$

Incertidumbre estándar relativa para la pesada de la muestra

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre la incertidumbre combinada u_{c1} y el peso de la muestra (0,150 g).

$$u_1=1,42 \times 10^{-4}/0,150 = 9,46 \times 10^{-4}$$

3.3.2 Incertidumbre por aforo en un balón de 100 mL

Al diluir la muestra en un balón de 100 mL, se tiene en cuenta el efecto de la temperatura, la repetibilidad y la tolerancia del balón.

- **Incertidumbre estándar por efecto de la temperatura**

Este efecto se debe a la diferencia entre la temperatura de calibración del material volumétrico y la temperatura de trabajo en el laboratorio. Según el fabricante el

balón se calibró a una temperatura de 20 °C, mientras que la temperatura en el laboratorio se encuentra dentro del intervalo dado por 20 ± 5 °C. Para estimar la incertidumbre debida a esta causa debe considerarse también el coeficiente de expansión volumétrico del agua (2.1×10^{-4} °C) ya que se trabaja con soluciones acuosas. La variación del volumen considerando estos aspectos es igual a:

$$\pm (100 * 5 * 2.1 \times 10^{-4}) = \pm 0,105$$

Y se calcula la incertidumbre estándar por efecto de la temperatura (u_{T2}) asumiendo una distribución rectangular:

$$u_{T2} = 0,105/\sqrt{3}=0,0606$$

- **Incertidumbre estándar por tolerancia del balón de 100 mL**

Según el fabricante, la tolerancia para el balón de 100 mL tipo A es de 0,1 mL. Se asume una distribución triangular, por tanto la incertidumbre estándar por la tolerancia del balón de 100 mL (u_{to2}) es igual a:

$$u_{to2}=0,1/\sqrt{3} =0,0577$$

- **Incertidumbre estándar por repetibilidad del balón de 100 mL**

Se estimó a partir de analizar la desviación estándar (s) debida a la medida del volumen en el balón 100 mL, realizándose 10 experimentos, por lo que la incertidumbre estándar por la repetibilidad del balón de 100 mL (u_{r2}) es:

$$u_{r2}=0,0136/\sqrt{10} =0,00430$$

- **Incertidumbre combinada por aforo en el balón de 100 mL**

La incertidumbre combina (u_{c2}) viene dada por la siguiente expresión:

$$u_{c2} = \sqrt{u_{T2}^2 + u_{to2}^2 + u_{r2}^2}$$

Por lo tanto u_c es igual a:

$$u_{c2} = \sqrt{0,0606^2 + 0,0577^2 + 0,00430^2} = 0,0837$$

3.3.2.1 Incertidumbre estándar relativa por aforo, balón de 100 mL

La incertidumbre estándar relativa viene dada por el cociente entre la incertidumbre estándar y el volumen de aforo (100 mL).

$$u_2 = 0,0837/100 = 8,37 \times 10^{-4}$$

3.3.3 Incertidumbre estándar derivada de la curva de calibración

Para estimar la incertidumbre asociada a la curva de calibración (u_{cu}) se debe estimar la incertidumbre del primer factor de dilución (u_{d1}), la incertidumbre del segundo factor de dilución (u_{d2}), la incertidumbre del material de referencia (u_{MRC}) y la generada por el ajuste de la curva de calibración (u_{ajuste}).

Se estima entonces la incertidumbre generada por los patrones de calibración (u_p) como sigue:

$$u_p = \sqrt{u_{MRC}^2 + \left(\frac{u_{d1}}{fd_1}\right)^2 + \left(\frac{u_{d2}}{fd_2}\right)^2}$$

Y la incertidumbre de la curva de calibración por:

$$u_{cu} = \sqrt{u_{ajuste}^2 + u_p^2}$$

3.3.3.1 Incertidumbre estándar debida a la preparación de la solución stock (primer factor de dilución)

Como se mencionó en la metodología, para preparar la solución stock (primera dilución) se toman 25 μ L de la solución estándar de 1000 mg/L, y se afora a un volumen de 25 mL. Para la estimación de la incertidumbre se tiene en cuenta el volumen de aforo, la alícuota y la incertidumbre asociada a la solución estándar certificado.

- **Incertidumbre generada por la alícuota tomada con la micropipeta de 10-100 μ L**

Para estimar esta incertidumbre se tienen en cuenta, la repetibilidad de la micropipeta, la temperatura y la tolerancia.

- **Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la micropipeta de 10-100 μL**

Para obtener la desviación estándar de la repetibilidad se realizaron 10 mediciones de un volumen. Por lo tanto la incertidumbre estándar por la repetibilidad de la micropipeta (u_{r3}) es igual a:

$$u_{r3}=0,000183/\sqrt{10} = 5,78 \times 10^{-5} \text{ mL}$$

- **Incertidumbre estándar por efecto de la temperatura**

Se considera el coeficiente de expansión volumétrico del agua, la variación de la temperatura y se asume una distribución triangular. Por tanto, la incertidumbre estándar por efecto de la temperatura para la micropipeta de 10-100 μL (u_{T3}) es igual a:

$$u_{T3}=(0,025 * 2,1 \times 10^{-4} * 5)/\sqrt{3} = 1,51 \times 10^{-5}$$

- **Incertidumbre estándar por la tolerancia de la micropipeta de 10-100 μL**

Según el fabricante la tolerancia para la micropipeta de 10-100 μL es de 0,8 μL . Asumiendo una distribución rectangular, la incertidumbre estándar por la tolerancia de la micropipeta de 10-100 μL (u_{t03}) es igual a:

$$u_{t03}=0,0008/\sqrt{3}= 4,62 \times 10^{-4} \text{ mL}$$

- **Incertidumbre estándar combinada para la micropipeta de 10-100 μL**

$$u_{c3}=\sqrt{(5,78 \times 10^{-5})^2+(1,51 \times 10^{-5})^2+(4,62 \times 10^{-4})^2} = 4,66 \times 10^{-4}$$

- **Incertidumbre estándar relativa de la micropipeta de 10-100 μL**

La incertidumbre estándar relativa de la micropipeta de 10-100 μL (u_3) está dada por el cociente entre u_{c3} y el volumen empleado (0,025 mL).

$$u_3=4,65 \times 10^{-4}/0,025 = 0,0186$$

- **Incertidumbre generada por el aforo a 25 mL**

Al diluir el estándar a 25 mL, se tiene en cuenta la incertidumbre aportada en este paso, dada por el efecto de la temperatura, la repetibilidad y la tolerancia del balón de 25 mL.

- **Incertidumbre estándar por efecto de la temperatura**

La incertidumbre estándar por la temperatura para el balón de 25 mL (u_{T4}) es igual a:

$$u_{T4} = (25 \cdot 2.1 \times 10^{-4} \cdot 5) / \sqrt{3} = 0,0151$$

- **Incertidumbre estándar por tolerancia del balón de 25 mL**

Según el fabricante, la tolerancia para el balón de 25 mL es $\pm 0,04$ mL. Y asumiendo una distribución rectangular, se tiene que la incertidumbre estándar por la tolerancia del balón de 25 mL (u_{t04}) es igual a:

$$u_{t04} = 0,04 / \sqrt{3} = 0,0231$$

- **Incertidumbre estándar por repetibilidad del balón de 25 mL**

Para evaluar la repetibilidad se realizó un total de 10 mediciones. Dividiendo la desviación estándar para las 10 mediciones sobre \sqrt{n} , donde n es el número de mediciones se determina que la incertidumbre estándar por repetibilidad del balón de 25 mL (u_{r4}) es igual a:

$$u_{r4} = 0,0057 / \sqrt{10} = 1,802 \times 10^{-3}$$

- **Incertidumbre combinada por aforo en el balón de 25 mL**

$$u_{c4} = \sqrt{(0,0151)^2 + 0,0231^2 + (1,802 \times 10^{-3})^2} = 0,0276$$

- **Incertidumbre estándar relativa por aforo en el balón de 25 mL**

La incertidumbre estándar relativa del aforo en el balón de 25 mL (u_4) está dada por el cociente entre u_{c4} y el volumen empleado (25 mL).

$$u_4 = 0,0276 / 25 = 1,104 \times 10^{-3}$$

- **Incertidumbre estándar relativa a la solución stock (primer factor de dilución)**

La incertidumbre estándar relativa a la solución stock (u_{d1}) se obtiene combinado la incertidumbre relativa a la micropipeta de 10-100 μL (u_3), la incertidumbre relativa al aforo en un balón de 25 mL (u_4), es igual a:

$$u_{d1} = \sqrt{(0,0186)^2 + (0,001104)^2} = 0,0186$$

3.3.3.2 Incertidumbre debida a la preparación de los estándares de calibración (segundo factor de dilución)

A partir de la solución stock, se toman alícuotas para preparar los estándares de la curva de calibración (1, 5, 10, 20, 30 $\mu\text{g/L}$). Las alícuotas se toman con la micropipeta de 10-100 mL (estándar de 1 $\mu\text{g/L}$) o de 100-1000 mL (5, 10, 20, 30 $\mu\text{g/L}$). Todos se aforan a un volumen final de 25 mL.

Incertidumbre del estándar de 5 $\mu\text{g/L}$

- **Incertidumbre estándar por la alícuota tomada con la micropipeta de 100-1000 μL**

Para estimar la incertidumbre se tienen en cuenta la repetibilidad evaluada durante la verificación del material, así como la temperatura y la tolerancia de la micropipeta.

- **Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la micropipeta de 100-1000 μL**

Para obtener la desviación estándar de la repetibilidad se realizaron 10 mediciones de volumen. La incertidumbre estándar por la repetibilidad de la micropipeta (u_r) es igual a:

$$u_r = 2,02^{-4} / \sqrt{10} = 6,39 \times 10^{-5}$$

- **Incertidumbre estándar por efecto de la temperatura**

Se considera el coeficiente de expansión volumétrico del agua, la variación de la temperatura y se asume una distribución triangular. Por tanto la incertidumbre

estándar por efecto de la temperatura para la micropipeta de 100-1000 μL (u_T) es igual a:

$$u_T = (0,125 * 2.1 \times 10^{-4} * 5) / \sqrt{3} = 7,57 \times 10^{-5}$$

- **Incertidumbre estándar por la tolerancia de la micropipeta de 100-1000 μL**

Según el fabricante la tolerancia para la micropipeta de 10-100 mL es de 8 μL . Asumiendo una distribución rectangular, la incertidumbre estándar por la tolerancia de la micropipeta de 100-1000 μL (u_{t0}) es igual a:

$$u_{t0} = 8 \times 10^{-3} / \sqrt{3} = 4,61 \times 10^{-3}$$

- **Incertidumbre estándar combinada para la micropipeta de 100-1000 μL**

$$u_{c5} = \sqrt{(6,39 \times 10^{-5})^2 + (7,57 \times 10^{-5})^2 + (4,61 \times 10^{-3})^2} = 4,61 \times 10^{-3}$$

- **Incertidumbre estándar relativa de la micropipeta de 100-1000 μL**

La incertidumbre estándar relativa de la micropipeta de 100-1000 μL está dada por el cociente entre u_{c2} y el volumen empleado (25 μL).

$$u_5 = 4,61 \times 10^{-3} / 0,125 = 0,036$$

- **Incertidumbre estándar relativa por el aforo a 25 mL**

La incertidumbre para el aforo a un balón de 25 mL ya fue estimada en el numeral 3.3.3.1. Donde se obtuvo el valor de: $u_6 = 0,001104$.

- **Incertidumbre relativa al segundo factor de dilución (estándar de 5 $\mu\text{g/L}$)**

La Incertidumbre estándar relativa al segundo factor de dilución (u_{d2}) se obtiene combinado la incertidumbre estándar relativa a la micropipeta de 100-1000 $\mu\text{g/L}$ y la incertidumbre estándar relativa al aforo en el balón de 25 mL, y es igual a:

$$u_{d2} = \sqrt{0,036^2 + 0,0011044^2} = 0,036$$

- **Incertidumbre estándar debida al material de referencia certificado**

Incertidumbre expandida es entregada en el certificado del MRC y tiene un valor de 3 mg/L. para un factor de cobertura del 95% (k=2) la incertidumbre estándar u_{mrc} es igual a: $u_{mrc} = 3/2 = 1,5$

- **Incertidumbre estándar relativa para el material de referencia certificado**

La incertidumbre estándar relativa para el MRC (u_{mr}) se determina dividiendo u_{mrc} entre el valor de concentración del MRC y es igual a:

$$u_{mr} = 1,5/1000 = 0,0015$$

Luego de calcular las incertidumbres asociadas a la preparación de cada punto de calibración, debe estimarse la incertidumbre para cada uno de ellos.

- **Incertidumbre generada por el estándar de 5 µg Pb/L**

La incertidumbre debida al patrón de 5 µg/L se determina a partir de la incertidumbre aportada por el MRC y la incertidumbre estándar relativa al primer y segundo factor de dilución.

$$u(5\mu\text{g/L}) = \sqrt{0,0015^2 + (0,036/200)^2 + (1,1044 \times 10^{-3}/1000)^2} = 1,51 \times 10^{-3}$$

- **Incertidumbre generada por el estándar de 1 µg Pb/L**

Para preparar este estándar, debe tomarse un volumen igual a 25 µL de la solución stock y aforar a 25 mL, es decir la incertidumbre será la misma a la generada para preparar la solución stock, pero considerando los dos factores de dilución, por lo tanto la incertidumbre generada por el estándar de 1 µg Pb /L es igual a:

$$u(1\mu\text{g/L}) = \sqrt{0,0015^2 + 2(1,1044 \times 10^{-3}/1000)^2} = 1,50 \times 10^{-3}$$

3.3.3.3 Incertidumbre estándar relativa a los patrones de calibración

En los resultados obtenidos en la sección 3.3.3.2 para los patrones de 5 µg Pb/L y 1 µg Pb/L respectivamente, se observa que presentan igual incertidumbre, por lo

que se puede concluir que los demás estándares de calibración presentan la misma incertidumbre, debido a que el componente mayor lo representa la incertidumbre debida al material de referencia. Según lo anterior la incertidumbre relativa a los estándares de calibración es igual a:

$$u_p = 5 \times 1,50 \times 10^{-3} = 7,50 \times 10^{-3}$$

3.3.3.4 Incertidumbre estándar debida a la respuesta del equipo

Basado en la expresión lineal para una curva de calibración;

$$y = mx + b$$

Donde “y” representa la absorbancia para la concentración “x”, “b” la ordenada en el origen y “m” la pendiente, se determina la incertidumbre para una concentración del elemento químico a medir “γ” mediante la respuesta del instrumento “α” como:

$$u_\alpha = \frac{S}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\alpha - \alpha_{prom})^2}{S_{xx}}}$$

Donde

U_a : Incertidumbre del mensurando obtenida con el instrumento.

S: Desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal.

m: Pendiente de la curva de calibración.

p: Número de réplicas de la muestra en estudio.

n: Número de puntos en la curva de calibración, multiplicada por el número de réplicas

α: Concentración en estudio.

α_{prom}: Promedio de los estándares de calibración.

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

S y S_{xx} se calcula como sigue:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (\gamma - (m\alpha - b))^2}{n-2}}$$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (\alpha_i - \alpha_{prom})^2$$

El ajuste por mínimos cuadrados supone que los errores están en dirección de la abscisa y no de la ordena. En consecuencia este procedimiento refleja la incertidumbre de los valores de absorbancia y no de los estándares de calibración.

Reemplazando se tiene:

$$u_{\alpha} = \frac{5,298^{-5}}{0,0079} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{36} + \frac{(18-17,59)^2}{700}} = 0,003$$

- **Desviación estándar relativa por la respuesta del equipo**

Se obtiene dividiendo la incertidumbre estándar debida a la respuesta del equipo entre la concentración estudiada.

$$U_{\text{ajuste}} = 0,003/18 = 1,66 \times 10^{-4}$$

3.3.3.5 Incertidumbre relativa a la curva de calibración

La estimación de la incertidumbre relativa a la curva de calibración se obtiene a partir de u_p (numeral 3.3.3.2) y u_{ajuste} (numeral 3.3.3.3) como sigue:

$$u_{cu} = \sqrt{(1,66 \times 10^{-4})^2 + (7,50 \times 10^{-3})^2} = 7,50 \times 10^{-3}$$

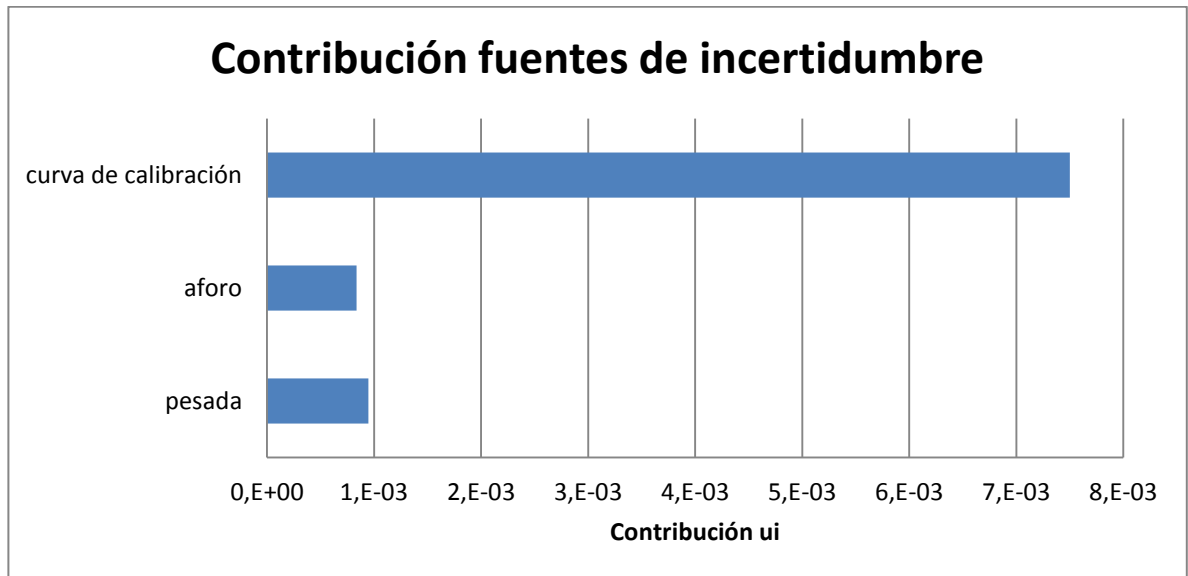
3.4 INCERTIDUMBRE COMBINADA DEL MÉTODO

Se obtiene combinando la incertidumbre debida a la pesada de la muestra, la dilución de la muestra (aforo en el balón de 100 mL) y la asociada a la curva de calibración, teniendo en cuenta los coeficientes de sensibilidad para cada fuente [CEM, 2008; EURACHEM 2000]:

$$U_{\text{método}} = \sqrt{(78,17)^2 (9,46 \times 10^{-4})^2 + (117,26)^2 (8,37 \times 10^{-4})^2 + (0,66)^2 (7,50 \times 10^{-3})^2} = 0,1229$$

En la **Figura 9**, se muestra el aporte de las principales fuentes de incertidumbre en la cuantificación de plomo en textiles y calzado. La mayor fuente de incertidumbre es aportada por la curva de calibración, la cual se estima a partir de la incertidumbre del material de referencia certificado y las mediciones de volumen. Es la mayor contribución debido a que implica la preparación de cada estándar de calibración y la incertidumbre derivada de la respuesta del equipo.

Figura 9. Contribución de cada fuente de incertidumbre.



3.5 INCERTIDUMBRE EXPANDIDA DEL MÉTODO

Se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada por el factor de cobertura $k = 2$, para una grado de confianza del 95%

$$U_{\text{met}} = u \times k = 0,1229 \times 2 = \pm 0,2458$$

3.6 INCERTIDUMBRE EXPANDIDA EN LA CONCENTRACIÓN DEL ANALITO

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

$$U = C \text{ (mg/kg)} \times 0,2458$$

Donde C es la concentración del analito.

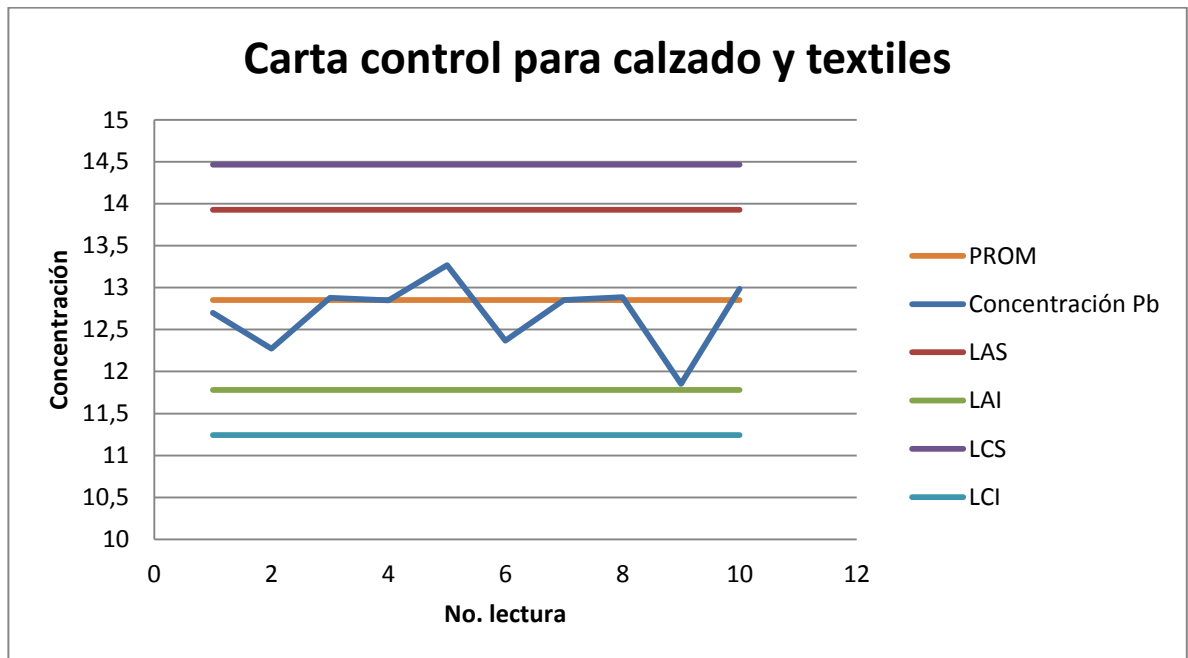
3.7 EXPRESIÓN DEL RESULTADO

$$C \pm U \text{ mg/kg}$$

3.8 CARTA DE CONTROL

Para la carta de control se realizaron 10 lecturas, con las cuales se construyó la carta de control para calzado y textiles. Se utilizaron blancos de muestra enriquecidos con un material de referencia certificado a una concentración de 18 $\mu\text{g/L}$. En la **Figura 10**, se puede apreciar que las medidas no presentan ninguna tendencia demostrando que la metodología analítica no está sujeta a errores sistemáticos, además como no se superan los límites de advertencia se demuestra que los errores aleatorios se encuentran bajo control. La disminución en la exactitud para la lectura 9, es resultado del desgaste del tubo de grafito, y sirve como indicativo para hacer el reemplazo por uno nuevo, conduciendo a un aumento en la sensibilidad. Por su parte, la dispersión de las otras lecturas se debe a los errores aleatorios inherentes a toda medición analítica. Los valores para los límites de advertencia y de control se establecieron de acuerdo a lo descrito en la sección 2.3.

Figura 10. Gráfico de la carta de control para calzado y textiles.



LAS: límite de advertencia superior; LAI: límite de advertencia inferior; LCS: límite de control superior; LCI: límite de control inferior; PROM: promedio. Las concentraciones están dadas en mg/kg.

4 CONCLUSIONES

La aplicación del método para la determinación de plomo total en calzado y textiles permitió adquirir la evidencia objetiva y necesaria para la validación.

Los coeficientes de variación obtenidos para las soluciones de rango bajo, medio y alto, 6,27%, 5,87%, 9,16% respectivamente, y para las muestras reales de calzado (7,93%) y de textiles (2,98%), cumplen con los criterios de aceptación establecidos por el laboratorio (según la ecuación de Horwitz, coeficiente de variación < 10%) demostrando la precisión del método.

El método es exacto debido a que los porcentajes de recuperación: 109,01%, 98,47% y 99,26%, los errores relativos: 9,01%, 1,52% y 0,73% y los valores del estadístico t: 1,11, 0,57, 0,44, para rango bajo, medio y alto respectivamente, cumplen con los criterios de aceptación establecidos en el laboratorio (porcentaje de recuperación entre 80%-120%; error relativo < 10% y $t < 2,45$).

Por su parte las interferencias por matriz se consideran mínimas ya que el porcentaje de recuperación para las muestras fortificadas de calzado (97,67%) y de textiles (100,94%) junto con los valores de t para calzado (2,14) y textiles (0,82) son aceptables.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se demuestra que el método es apto para la determinación de plomo total en calzado y textiles, ya que es exacto y preciso dentro del intervalo lineal estudiado.

Las sales presentes en el sudor ácido artificial, disminuye la señal obtenida, afectando directamente la exactitud del valor registrado. Teniendo en cuenta lo anterior, no se logró llevar a cabo la validación de la metodología para la determinación de plomo extraíble en textiles, ya que las interferencias químicas, no específicas y de fondo no permiten alcanzar la precisión y exactitud necesarios.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, el método analítico EPA 3050B se declara adecuado para la determinación de plomo total en calzado y textiles bajo las condiciones de trabajo dadas en el Laboratorio Químico de Consultas Industriales.

5 RECOMENDACIONES

Para trabajar a altas temperaturas de calcinado con cuero y textiles la adición de 2 mL de ácido fosfórico al 5% produce buena estabilización de la señal.

Para eliminar las interferencias producidas por la presencia de sales, se sugiere el estudio de otros agentes, tales como ácido fluorhídrico u oxalato de amonio reportados en la literatura como modificadores de matriz para la determinación de plomo en agua de mar.

De forma opcional se sugiere el estudio de la extracción del plomo presente en una matriz con sales, mediante el uso de solventes orgánicos o precipitación para su posterior tratamiento y análisis.

Para el desarrollo de validaciones se recomienda seguir los siguientes aspectos:

Realizar el mantenimiento preventivo de los equipos ya que las fuentes de incertidumbre están directamente relacionadas con el desempeño de los mismos.

Llevar las cartas de control, de tal forma que pueda supervisarse el desempeño del método e identificarse cuando surge algún error de tipo sistemático.

Preparar con el mayor cuidado la curva de calibración, ya que representa la mayor contribución de incertidumbre en el método.

ANEXOS

Anexo A. Valores de la distribución t de *student*, contraste de 2 colas.

Grados de libertad (n-2)	90%	95%	98%
1	6.31	12.71	31.82
2	2.92	4.30	6.96
3	2.35	3.18	4.54
4	2.13	2.78	3.75
5	2.02	2.57	3.36
6	1.94	2.45	3.14
7	1.89	2.36	3.00
8	1.86	2.31	2.90
9	1.83	2.26	2.82
10	1.81	2.23	2.76
12	1.78	2.18	2.68
14	1.76	2.14	2.62
16	1.75	2.12	2.58
18	1.73	2.10	2.55

Anexo B. Resultados de la matriz de experimentos.

No experimento	Tiempo [h]	Temperatura [°C]	Solución extractora [mL]	Lectura
No 1	1	Ambiente	40	ND*
No 2	2	Ambiente	40	ND
No 3	1	50	40	0,11
No 4	1	Ambiente	80	ND
No 5	1	50	80	0,35
No 6	2	Ambiente	80	ND
No 7	2	50	40	0,9
No 8	2	50	40	0,38

(*) ND: no detectado

Anexo C. Cálculo del estadístico R².

Estándar µg/L	Abs_{prom}	(y_i-y_{prom})²	(y_i-y_{cal})²	(X_i-X_{prom})²
0	0,0046	0,008074	8,21778x10 ⁻⁰⁶	121
1	0,0134	0,006570	3,86778x10 ⁻⁰⁶	100
5	0,0480	0,002163	9,66944x10 ⁻⁰⁷	36
10	0,0911	0,000012	2,07025x10 ⁻⁰⁵	1
20	0,1685	0,005480	9,10028x10 ⁻⁰⁶	81
30	0,2413	0,021558	1,01336x10 ⁻⁰⁵	361

SC_{regresión} = 0,043857

SC_{residual} = 5,29889x10⁻⁰⁵

SC_{total} = 0,043910

R² = 0,043857/0,043910 = 0,9988

SC: Suma de cuadrados

Anexo D. Valores de t para los porcentajes de recuperación.

gl*	95%	Gl	95%	gl	95%
1	12.71	6	2.45	11	2.20
2	4.30	7	2.36	12	2.18
3	3.18	8	2.31	13	2.16
4	2.78	9	2.26	14	2.14
5	2.57	10	2.23	15	2.13

(*) gl: grados de libertad

BIBLIOGRAFÍA

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, LEAD. [En línea]. Disponible en: http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs13.html#bookmark5. Fecha de consulta: 02 de febrero de 2014.

APHA, AWWA, WPCF. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, Ed 17., Díaz de Santos S.A., España, 1992, p.p. 16.

AKMAN, S.; BEKTAS, A. Effects of Alkali and Alkaline Earth Metal Chlorides on the Atomization of Lead and Chromium in Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, Analytical Sciences, 1990, p.p. 1-6.

CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA (CEM). Guía para la expresión de la Incertidumbre de medida, 1ª Ed., España, 2008, p.p. 22-23.

CONSUMER PRODUCT SAFETY COMMISSION. Standard Operating Procedure For Determining Total Lead (Pb) In Non-Metal Children's Products, CPSC-CH-E1002-08, EE.UU., 2009, p. 4.

CONSUMER PRODUCT SAFETY COMMISSION. Consumer Product safety Improvement Act of 2008. 16 CFR part. 1303.

CONDE, F.; JIMENO, S.; MARTÍ, F. MÉNDEZ, J. Química Analítica Cualitativa. Thomson Learning, 18ª Ed., España, 2001, p.p. 426 - 430.

COY, G. A. Protocolo Estandarización de Métodos Analíticos. IDEAM, Colombia, 1999, p.p. 6-19.

EBDON, L.; EVANS, E.; FISHER, A.; HILL, S. An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry. John Wiley & Sons, U.K., 1998, p.p. 60-63.

EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. Reino Unido, 1998, p.p. 20-23.

EURACHEM. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Reino Unido, 2000, p.p. 25

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Acid Digestion of Sediments, Sludges and Soils 3050B, EE.UU., 1996, p.p. 1-5.

GUÍA TÉCNICA SOBRE TRAZABILIDAD E INCERTIDUMBRE EN LAS MEDICIONES ANALÍTICAS QUE EMPLEAN LAS TÉCNICAS DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA Y DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE. Centro Nacional de Metrología (CENAM). EMA, México, 2008. p.p. 55-60.

GUIDE TO METHOD VALIDATION FOR QUANTITATIVE ANALYSIS IN CHEMICAL TESTING LABORATORIES. Irish National Accreditation Board (INAB). Dublin, 2012, p.p. 26-27.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Test for colour fastness. ISO 105-E04:2008(E), 5 ed., Suiza, 2008, p. 2.

LANDIS, W.G.; YU, M. Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems. Lewis Publishers, 3ª Ed., EE. UU., 2005, p.p. 219-227.

LAZOS, R. J.; SCHMID, W. A. Guía para estimar la incertidumbre de la medición. CENAM, México, 2000, p.p. 4-22.

LAZOS, R.J.; GUTIÉRREZ, I. H. La validación de métodos: un enfoque práctico. CENAM, Simposio de metrología, México, 2004, p.p. 1-5.

LITTLE, P.; MARTIN, M. H. A Survey of Zinc, Lead and Cadmium in Soil and Natural Vegetation Around a Smelting Complex. *Environ. Pollut.*, 1972, p.p. 241–243.

LOVERING, T. G. Lead in the Environment. Government Printing Office. *Geological Survey Professional Paper 957*, EE. UU., 1976, p. 1.

MACARULLA, J. M.; GOÑI, F.M. Bioquímica Humana. Reverté, España, 1994, p.p. 290.

MAROTO, A.; BOQUÉ, R.; RIU J.; RIUS, F. Cálculo de la incertidumbre en medidas físicas: medida de una masa. *Técnicas de laboratorio*, España, 2002, p.p. 730-734.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. Estadística y quimiometría para química analítica. Prentice Hall, 4 ed., España, 2002, p.p. 79-81, 141-143.

MOCAK, J.; BOND, A. M.; MITCHELL, S.; SCOLLARY, G. A. Statistical overview of Standard (IUPAC and ACS) and New Procedures for Determining the Limits of Detection and Quantification: Application to Voltammetric and Stripping Techniques. *Pure & Appl. Chem.*, Gran Bretaña, 1997, 69(2), p.p. 297-328.

NHAM, T. Direct determination of As, Cu and Pb in seawater by Zeeman Graphite Furnance Atomic Absortion Spectrometry. *Agilent Technologies, Inc*, 2010, p.p. 1-6.

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA, NTC-ISO/IEC 17025, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Bogotá. 2005. p. 17.

RAMÍREZ, A.; SALINAS, E.; LÓPEZ, A.; ROSALES, H. Metodología para el cálculo de la incertidumbre en la determinación de cobre por espectroscopia de absorción atómica. *Av. Cien. Ing.*, México. 2012. 3(4), p.p. 143-145.

RICO, C.; OREJAS, A. Minería y metalurgia antiguas, visiones y revisiones. Casa de Velázquez, España, 2012, p. 171.

SKOOG, D.; WEST, D. Introducción a la química analítica. Reverté, España, 2002, p.p. 209-210.

SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F.; CROUCH, S. Fundamentos de química analítica. Mc Graw Hill, 8 Ed., España, 2005, p.p. 26-28, 240.

TOXICOLOGICAL PROFILE FOR LEAD. Agency For Toxic Substances And Disease Registry (ATSDR), EE. UU., 2007, p.p. 2-3.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP). Study of the possible effects on Human Health and the Environment in Asia and the Pacific of the trade of products containing Lead, Cadmium and Mercury. Australia, 2011, p.p. 21-23.

VOCABULARIO INTERNACIONAL DE METROLOGÍA (VIM). Conceptos fundamentales y generales y términos asociados. SNM., 3 Ed., Perú, 2008, p. 44.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). [En línea]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/es/>. Fecha de consulta: 01 de marzo de 2014.

UNIPLOM. EL PLOMO, HECHOS Y REALIDADES. [En línea]. Disponible en: <http://www.uniplom.es/fuentes.htm>. Fecha de consulta: 03 de marzo de 2014.