

**ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN INTERNA DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN LAS MATRICES AGUA Y SUELO
POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA-GENERACIÓN DE
HIDRUROS (HGAAS).**

SERGIO AGUSTÍN RODRÍGUEZ DELGADO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES
BUCARAMANGA
2013**

**ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN INTERNA DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN LAS MATRICES AGUA Y SUELO
POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA-GENERACIÓN DE
HIDRUROS (HGAAS).**

SERGIO AGUSTÍN RODRÍGUEZ DELGADO
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
LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES
BUCARAMANGA
2013**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a mi familia, Jaime, Maruja, Jaimito y Linita, a mis abuelos, y a todas las personas que me aman. A mis Colegas Químicos.

A La familia del Laboratorio Químico de Consultas Industriales, por su amistad incondicional.

A La profesora Luz Yolanda Vargas por dirigir este trabajo de grado y apoyarme en mi camino de ser profesional.

Luisa Yepes por su amor y paciencia, a toda su familia por su apoyo.

A Perpetual y Ainur, por permitirme compartir momentos inolvidables haciendo buena música y por hacerme partícipe de sus proyectos musicales.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
1.MARCO TEÓRICO	18
1.1 GENERALIDADES DEL ARSÉNICO	18
1.2 ARSÉNICO EN EL MEDIO AMBIENTE	18
1.2.1 Arsénico en aguas	18
1.2.2 Arsénico en Agua Superficial	19
1.2.3 Arsénico en Agua Subterránea	19
1.2.4 Arsénico en Suelos	20
1.3 TOXICIDAD DEL ARSÉNICO	20
1.3.1 Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico.....	20
1.3.2 Queratosis Palmo-Plantar.....	21
1.4 CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN AGUAS Y SUELOS.....	21
1.4.1 DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO POR EL MÉTODO: ABSORCIÓN ATÓMICA- GENERACIÓN DE HIDRUROS-AAS-HG	21
1.4.1.1 Fundamento Teórico.....	21
1.4.1.2 Generación de Hidruros.....	21
1.5 VALIDACIÓN MÉTODOS.....	23
1.5.1 Validación Interna	24
1.5.3. Figuras de Mérito	24
1.5.3.1 Límite de Detección (LDD)	24
1.5.3.2 Límite de Cuantificación (LDC).....	24
1.5.3.2 Linealidad.....	24
1.5.3.3 Precisión	25
1.5.3.4 Exactitud	25
1.5.3.5 Carta de Control Analítico.....	25
1.6 INCERTIDUMBRE EN LAS MEDIDAS ANALÍTICAS “U”	25

1.6.1 Fuentes de Incertidumbre en las Medidas Analíticas	26
1.6.1.1. Pesada de una muestra en la balanza.....	26
1.6.1.2. Medición de un volumen.....	27
1.6.1.3. Durante una dilución.....	28
1.6.1.4. Construcción de una curva de calibración	29
1.6.2. Evaluación de la Incertidumbre.....	29
1.6.2.1. Combinación	30
1.6.3. Expresión de la incertidumbre	30
1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
1.7.1. Errores aleatorios.....	30
1.7.2. Errores sistemáticos	30
1.7.3. Propagación de errores en los cálculos aritméticos	31
1.7.4 Análisis de varianza (ANOVA).....	31
2. METODOLOGÍA	33
2.1. PREVALIDACION.....	33
2.1.1. Verificación de patrones y reactivos.....	33
2.1.2. Chequeo de procedimientos.....	34
2.1.2.1. Arsénico Total en Suelos.....	34
2.1.2.2. Arsénico Total en Aguas.....	35
2.1.2.3 Arsénico Disuelto en Aguas	36
2.1.2.4 Preparación de la muestra. Reducción del Arsénico.....	36
2.1.3. EQUIPOS Y MATERIAL.....	37
2.1.3.1 Balanza analítica.....	37
2.1.3.2 Espectrofotómetro de absorción atómica.....	37
2.1.4. VERIFICACIÓN DEL MATERIAL VOLUMÉTRICO.....	37
2.2 VALIDACIÓN	37
2.2.1 Optimización de Variables Instrumentales.....	37
2.2.1.1 Optimización de Generación del Hidruro	38
2.2.1.2 Proporción Aire Acetileno	38
2.2.1.3 Tiempo de pre-Lectura de la muestra	38
2.2.2 Curva de calibración	38

2.2.3. Intervalo de validación.....	39
2.2.4 Linealidad.....	39
2.2.5 Diseño experimental.....	40
2.2.6 Figuras de Mérito.....	41
2.2.6.1. El límite de detección.....	41
2.2.1.6. El límite de cuantificación.....	41
2.2.1.7. Precisión.....	41
2.2.1.8. Exactitud.....	41
2.3. ELABORACIÓN DE LAS CARTAS DE CONTROL.....	42
2.3.1 Carta de Control para suelos.....	42
2.3.2 Carta de Control para Aguas.....	42
2.4. CALCULO DE LA INCERTIDUMBRE.....	42
2.4.1. Caracterización de las fuentes individuales de incertidumbre.....	42
2.4.1.1. Incertidumbre en la determinación de Arsénico total en Suelos.....	42
2.4.1.2. Incertidumbre en la determinación de Arsénico total en Aguas.....	44
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	45
3.1 PREVALIDACIÓN.....	45
3.1.1 Verificación de Patrones.....	45
3.1.2 Verificación de Material Volumétrico.....	45
3.2 VALIDACIÓN.....	47
3.2.1 Optimización de Variables Instrumentales.....	47
3.2.1.1 Optimización de Generación del Hidruro.....	47
3.2.1.2 Proporción Aire Acetileno.....	48
3.2.1.3 Tiempo de pre-Lectura de la muestra.....	50
3.2.2 Curva de calibración.....	50
3.2.3. Intervalo de validación.....	52
3.2.4 Linealidad.....	52
3.2.5 Diseño experimental.....	52
3.2.5.1 Diseño Experimental Arsénico Total en Suelos.....	52
3.2.5.1.1 Límite de detección y límite de Cuantificación.....	54
3.2.5.1.2 Precisión del Método.....	54

3.2.5.1.3 Exactitud del Método	55
3.2.5.1.4 Modificación del Método	56
3.2.5.2 Diseño Experimental Arsénico Total en Aguas.....	56
3.2.5.2.1 Límite de detección y límite de Cuantificación.....	58
3.2.5.2.2 Precisión del Método	58
3.2.5.2.3 Exactitud del Método	59
3.3. DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN SUELOS.....	59
3.3.1. Pesada de las muestras.	59
3.3.2 Incertidumbre por dilución de muestras en un balón aforado de 100 mL.	60
3.3.3. Incertidumbre por dilución de muestras en un balón aforado de 25 mL.	62
3.3.4. Incertidumbre estándar por alícuota de 10 ml, para preparación de la muestra.....	63
3.3.5 Incertidumbre Combinada del pesaje de las muestras y dilución de la digestión y preparación de las muestras.	64
3.3.6. Incertidumbre debida al primer factor de dilución (Preparación de la solución madre en la curva de calibración).....	64
3.3.7. Incertidumbre generada por el balón de 100 mL (aforo)	66
3.3.8 Incertidumbre estándar relativa del primer factor de dilución.....	66
3.3.9 Incertidumbre debida al segundo factor de dilución (preparación de los patrones a partir de la solución madre)	66
3.3.10 Incertidumbre estándar relativa del segundo factor de dilución	67
3.3.11 Incertidumbre Estándar debida al material de referencia certificado con el cual se preparó la curva de calibración.....	68
3.3.12. Incertidumbre estándar debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones.....	68
3.3.13. Incertidumbre combinada del método	71
3.3.14. Incertidumbre expandida.	72
3.4. Determinación de la incertidumbre en la cuantificación de Arsénico Total en Aguas.	72
3.4.2 Incertidumbre Por dilución en un balón de 100 mL.	74
3.4.3. Incertidumbre por dilución de muestras en un balón aforado de 25 mL.	74
3.4.4. Incertidumbre por dilución de muestras en un balón aforado de 25 mL.	74
3.4.5 Incertidumbre Combinada	74
3.4.6. Incertidumbre debida al primer factor de dilución.....	74

3.4.7 Incertidumbre debida al segundo factor de dilución (preparación de los patrones a partir de la solución madre)	75
3.4.8 Incertidumbre Estándar debida al material de referencia certificado con el cual se preparó la curva de calibración.....	75
3.4.9. Incertidumbre estándar debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones.....	75
3.4.10. Incertidumbre combinada del método.....	76
3.4.11. Incertidumbre expandida.	76
3.5 Cartas de Control.....	77
3.5.1 Carta de control para Suelos.....	77
3.5.2 Carta de control para Aguas.....	78
Figura 11 . Carta de Control para Suelos.....	78
CONCLUSIONES	79
RECOMENDACIONES.....	81
BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXOS.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Generador de Hidruros	23
Figura 2. Errores en los Cálculos Aritméticos.....	31
Figura 3. Fuentes de Incertidumbre, Método de Arsénico Total en Aguas	43
Figura 4. Fuentes de Incertidumbre, Método de Arsénico Total en Suelos.....	44
Figura 5. Verificación de Balón de 25 mL.	47
Figura 6. Concentración del Reductor vs. Absorbancia.....	48
Figura 7. Aire-Acetileno vs. Absorbancia	49
Figura 8. Tiempo de Prelectura de muestras.	50
Figura 9. Curva Calibración As	51
Figura 10 . Carta de Control para Suelos.....	77
Figura 11 . Carta de Control para Aguas.....	78

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fuentes de Incertidumbre, Método de Arsénico Total en Aguas.....	43
Tabla 2. Fuentes de Incertidumbre, Método de Arsénico Total en Suelos.....	44
Tabla 3. Análisis de Reactivos para las Metodologías.....	45
Tabla 4. Verificación de Material Volumétrico	46
Tabla 5. Optimización Generación de Hidruro As.....	47
Tabla 6. Proporción Aire Acetileno	49
Tabla 7. Absorbancia Patrones.....	50
Tabla 8. Lectura de Patrones	51
Tabla 9. Blancos enriquecidos Suelo.....	53
Tabla 10. Promedio de blanco enriquecido Suelo	54
Tabla 11. Límite de detección y Límite de Cuantificación.	54
Tabla 12. Tabla Determinación de la Precisión.....	55
Tabla 13. Tabla Exactitud Método en Suelos	55
Tabla 14. Modificación del Método para Suelos	56
Tabla 15 . Blancos Enriquecidos para Agua.....	57
Tabla 16. Promedio Blanco enriquecido para Aguas	57
Tabla 17. Límite de Detección y Límite de Cuantificación para Aguas	58
Tabla 18. Precisión Método Aguas.	58
Tabla 19. Exactitud Método Aguas.	59

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	85
---------------	----

RESUMEN

TITULO: ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN INTERNA DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN LAS MATRICES AGUA Y SUELO POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA-GENERACIÓN DE HIDRUROS (HGAAS).*

AUTOR: SERGIO AGUSTÍN RODRÍGUEZ DELGADO**

PALABRAS CLAVE: Arsénico, validación, generación de hidruros

El arsénico es un elemento que en condiciones naturales en aguas y suelos se encuentra a nivel de trazas, pero por fuentes antropogénicas, la concentración de este elemento puede superar los límites permitidos y se convierte en un agente altamente tóxico para los seres vivos.

Según los requisitos técnicos de la NTC ISO/IEC 17024, la validación permite dar un criterio de confianza a un método analítico en particular. La metodología empleada para cuantificar el arsénico en matrices en agua y suelo se sometió a este proceso de validación y así al obtener resultados de análisis reportar datos confiables y que cumplen con criterios de calidad nacional e internacional.

El plan de validación consistió en analizar muestras de agua y suelos utilizando las metodologías SM para aguas y EPA 3050 para suelos. Se usaron muestras de agua residual para los análisis y se evaluaron los porcentajes de recuperación en estas muestras. Para suelos se usó un material de referencia suministrado por el IDEAM. En el alcance de la validación para las metodologías, se evaluaron los parámetros analíticos: Límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, exactitud, precisión, y se calculó la incertidumbre de las concentraciones reportadas con las metodologías validadas. Este método es recomendado por asociaciones profesionales dedicadas desde su fundación al estudio y evaluación de riesgos por agentes químicos, así como aquellos métodos recomendados por la UE o basados en métodos ampliamente conocidos y evaluados por especialistas en este tipo de análisis.

* Trabajo de grado

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

ABSTRACT

TITLE: STANDARIZATION AND INTERNAL VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF ARSENIC IN WATER AND SOILS BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY- HYDRIDE GENERATION (HGAAS).*

AUTHOR: SERGIO AGUSTÍN RODRÍGUEZ DELGADO**

KEY WORDS: Arsénic, Validation, Hydride Generation

Arsénic is an element that in natural conditions in water and soils, it's found in trace levels, but by anthropogenic sources, the concentration of this element, may exceed the permitted levels and it's becomes in a highly toxic agent for all living creatures.

According to the technical requirements of the NTC ISO / IEC 17024, validation allows for a confidence standard to a particular analytical method. The methodology that was used to quantify arsenic in water and soils, was validated, to obtain reliable data, and to satisfy national and international standards.

The validation plan was to analyze water by the SM and soil samples using EPA methodologies. Water samples were used for analysis and residual percentages were evaluated recovery in these samples. For soils used a reference material supplied by IDEAM. In the scope of validation methodologies, analytical parameters were evaluated: Limit of detection, limit of quantification, sensitivity, accuracy, precision, and uncertainty was calculated concentrations reported with validated methodologies. This method is recommended by professional associations since its foundation dedicated to the study and evaluation of chemical risk as well as those recommended by the EU methods or methods based on well known and assessed by specialists in this type of analysis.

* Degree Project.

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

INTRODUCCIÓN

Según la NTC ISO/IEC 17025, las determinaciones analíticas realizadas en laboratorios de ensayo, deben estar sometidas a métodos normalizados ó si estos métodos son no normalizados o estos son desarrollados en el laboratorio, se debe llevar a cabo un proceso de verificación o validación. En la validación de los métodos analíticos, se someten a una evaluación estadística, en la cual se recopilan datos que me dan información de que dicha metodología cumple el propósito para el cual fue creado y que los resultados son verificables y confiables.

La legislación Colombiana establece niveles máximos aceptables para la concentración de arsénico en aguas y en suelos, y por eso surge la necesidad de desarrollar metodologías confiables, eficaces y económicas de cuantificación de arsénico a nivel de trazas, compatibles con los límites impuestos por la legislación para el contenido de arsénico en aguas de consumo y suelos.

Existen pocos Laboratorios en Colombia que cuenten con una metodología acreditada para el análisis traza del arsénico, y el propósito de este proyecto es implementar, acreditar y estandarizar una nueva metodología, que cumpla con los estándares de calidad en Colombia, utilizando la técnica de Absorción Atómica-Generación de Hidruros, para poder así ofrecer este servicio a la comunidad y clientes de laboratorio que lo requieran, y que se les reporte resultados válidos y confiables.

La necesidad de desarrollar metodologías que permitan cuantificar el arsénico a nivel de trazas en estas matrices y que estas sean validadas, no solo para demostrar que en el Laboratorio se realiza correctamente el análisis, si no que los resultados que se reportan sean confiables, se da por la importancia que tienen estos resultados, en los ámbitos de la industria y la salud pública, ya que a partir de estos datos se toman decisiones, para tener un control sobre la contaminación de este elemento potencialmente tóxico.

El Laboratorio de Consultas Industriales tiene como objetivo dentro de su sistema de gestión de calidad, implementar el método validado, y así asegurar que se reportan datos fiables y satisfacer la necesidad de los clientes, los cuales requieran cuantificar el Arsénico en muestras de aguas y suelos que provienen de diferentes industrias de Santander y Colombia.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 GENERALIDADES DEL ARSÉNICO

El arsénico (As, número atómico 33, peso atómico 74,922) es un elemento ampliamente distribuido en la atmósfera, en la hidrosfera y en la biosfera (aprox. 5×10^{-4} % de la corteza terrestre). La mayoría de As presente en el medio ambiente proviene de fuentes naturales (meteorización, actividad biológica, emisiones volcánicas), pero los procesos industriales tienen gran impacto en la contribución de compuestos que contienen arsénico potencialmente tóxicos; procesos industriales tales como la minería, la fundición de metales, el uso de pesticidas, conservantes de la madera y la industria de las pinturas.[8]

1.2 ARSÉNICO EN EL MEDIO AMBIENTE

La distribución del As en la naturaleza, proviene de fuentes naturales, los procesos geológicos como las emisiones volcánicas y meteorizaciones a partir de las rocas parentales. Actividades como la minería y el uso de pesticidas son una fuente antropogénica de As en el medio ambiente, y la concentración elevada de este elemento en el agua y en el suelo son considerados potencialmente tóxicos.[16]

El As al ser un elemento con una alta movilidad y capacidad de unirse a otros elementos en formas orgánicas e inorgánicas, se encuentra en valores de concentración que son muy variables en el agua y el suelo. El As puede migrar de la fase sólida del suelo con fenómenos de transporte y de transferencia a las aguas subterráneas.

1.2.1 Arsénico en aguas

En general el As, se encuentra disuelto en las aguas naturales formando oxianiones. En este medio predominan las especies inorgánicas de arsénico, y sus estados de oxidación más predominantes son As^{+3} y As^{+5} , en menor proporción y poco comunes las especies As^0 y As^{-3} . Las condiciones redox y el pH, del medio donde se encuentra el As, controlan su estado de oxidación, ambas especies

predominantes son móviles en los medios acuosos, el As^{+3} estado de oxidación más móvil y el de mayor toxicidad y dependiendo del pH se encuentra en estos estados.

1.2.2 Arsénico en Agua Superficial

En los ríos, el valor promedio de concentración de As informado en la literatura es, en general, inferior a $0,8 \mu\text{g/L}$, aunque puede variar dependiendo de factores como recarga (superficial y subterránea), drenaje de zonas mineralizadas, clima, actividad minera y vertidos urbanos o industriales. En los lagos, el contenido de As es similar al observado en los ríos, ya que los factores determinantes son similares. En algunos casos, la circulación restringida de agua en los lagos tiene como consecuencia la intensificación de los procesos de evaporación (p.ej., lagos de climas áridos), o la estratificación de la columna de agua, que genera la aparición de un ambiente oxigenado en el epilimnio (capa superior) y otro de condiciones anóxicas en el hipolimnio (capa inferior). Por lo tanto, también se produce una estratificación relativa de las especies de As, con tendencia al predominio de As^{+5} en el epilimnio y As^{+3} en el hipolimnio, además de una variación de la concentración de As con la profundidad [2].

1.2.3 Arsénico en Agua Subterránea

La concentración de As en aguas subterráneas varía en un rango de $<0,5$ a $5.000 \mu\text{g} / L^{-1}$. Si bien las concentraciones elevadas no se restringen a determinadas condiciones, y se registran en acuíferos con condiciones oxidantes y de pH alto, acuíferos con condiciones reductoras, acuíferos con circulación geotermal, acuíferos relacionados con depósitos minerales, y acuíferos ligados a procesos antropogénicos (actividad industrial, minera, asentamientos urbanos, actividad agropecuaria, etc.), la mayor parte de los acuíferos con contenidos altos de As se originan, sin embargo, a partir de procesos geoquímicos naturales [1]

1.2.4 Arsénico en Suelos

El contenido de As en suelos es, por lo general, entre 5 y 10 mg/kg y es constituyente principal de más de 200 minerales (As nativo, arseniuros, sulfuros, óxidos, arseniatos y arsenitos). Las mayores concentraciones aparecen en sulfuros como pirita, calcopirita, galena y marcasita, donde sustituye al azufre en la estructura; el contenido de As puede en estos minerales superar el 10% en peso. [3].

El principal origen del As en el suelo es el material parental del cual deriva [7]; sin embargo, la utilización de compuestos de As inorgánico como pesticidas y herbicidas en la agricultura, especialmente durante el siglo XX, ha contribuido, junto con otras actividades antrópicas como la minería, a la dispersión de este contaminante en el medio ambiente [12]

1.3 TOXICIDAD DEL ARSÉNICO

El arsénico, familiar veneno de leyendas y cuentos, es un elemento químico que existe en la naturaleza. La mayor fuente de contaminación de arsénico es por vía hídrica, ya que al ser un medio que se transporta en mayor proporción que el suelo, tiene mayores posibilidades de contaminar cierta región y sus individuos [10]

1.3.1 Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico

La enfermedad conocida como HACER (Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico) provoca diversos tipos de alteraciones cardíacas y vasculares, alteraciones neurológicas, lesiones hepáticas y renales, y hasta repercusiones respiratorias, pero las manifestaciones más frecuentemente encontradas son las lesiones cutáneas (queratodermia palmoplantar, leucomelanodermia y hasta lesiones neoplásicas como enfermedad de Bowen y epiteloma basocelular y espinocelular). Se sabe que el 99% de los casos corresponden a queratodermias palmoplantares, 38% de los casos a carcinomas cutáneos y entre 22% y 73% a leucomelanodermias. [6]

1.3.2 Queratosis Palmo-Plantar

Con respecto a las queratosis arsenicales, son lesiones puntuales en palmas y/o plantas, así como en dorso de manos y pies, de disposición simétrica. Las lesiones crecen hasta un tamaño límite y permanecen estables, un cambio rápido en el crecimiento puede significar degeneración maligna; se estima que esta transformación ocurre en alrededor del 5% de los pacientes. En cuanto a la enfermedad de Bowen, se presenta en forma de placas eritematosas, levemente escamosas, con un borde bien delimitado, aunque irregular u ondulante. [17]

1.4 CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN AGUAS Y SUELOS

Para conocer de manera certera los niveles de Arsénico, que pueden estar contaminado los suelos, sedimentos, las fuentes hídricas, requieren de metodologías analíticas confiables, y reproducibles, por ellos surge la necesidad de desarrollar técnicas y validar los métodos aplicados, ya que esto es crucial para conocer dichos niveles de este elemento traza tóxico. También es imprescindible para poder desarrollar tecnologías de remoción de alta calidad para mitigar los problemas del arsénico.

1.4.1 DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO POR EL MÉTODO: ABSORCIÓN ATÓMICA-GENERACIÓN DE HIDRUROS-AAS-HG

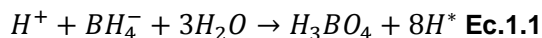
1.4.1.1 Fundamento Teórico

La espectroscopia de absorción atómica mide la cantidad de luz que es absorbida por los átomos del analito a la longitud de onda resonante. La luz incidente (de las longitudes de onda específicas a las cuales absorben los átomos del analito) es emitida por una lámpara de cátodo hueco o de descarga sin electrodo y es absorbida por la solución que es interceptada por la luz.

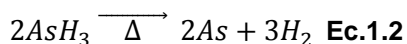
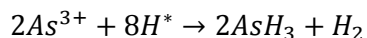
1.4.1.2 Generación de Hidruros

La técnica de absorción atómica con generación de hidruros permite cuantificar en el orden de $\mu\text{g/L}$ o ultra trazas elementos como As, Se, Hg, Sn, Sb, Ge, Bi y Te, que tienen la propiedad de formar el hidruro correspondiente. La muestra disuelta

en ácido diluido se mezcla con un agente reductor, tal como borohidruro de sodio (NaBH₄). Esta reacción produce H atómico que reacciona con el As, Se, Hg, Sn, Pb, Sb, Ge, Bi y Te en la solución para formar hidruros volátiles. El borohidruro de sodio es el reductor más utilizado. El mecanismo de formación de los hidruros es mostrado en las figuras 1 y 2 [6]



Los hidruros volátiles como la arsina (AsH₃) son arrastrados por un gas portador como nitrógeno a una celda de cuarzo, que es calentada por una llama de aire-acetileno a una temperatura optimizada para producir la atomización del analito. Cuando los gases pasan a través de este tubo calentado, ocurre una descomposición térmica, y se liberan los átomos del elemento:



La cuantificación de las diferentes especies de As puede realizarse separándolas antes de la formación del hidruro mediante procedimientos como la cromatografía, o bien a través del cambio en las condiciones de formación de los hidruros como tiempos de reacción y reactivos específicos[15]

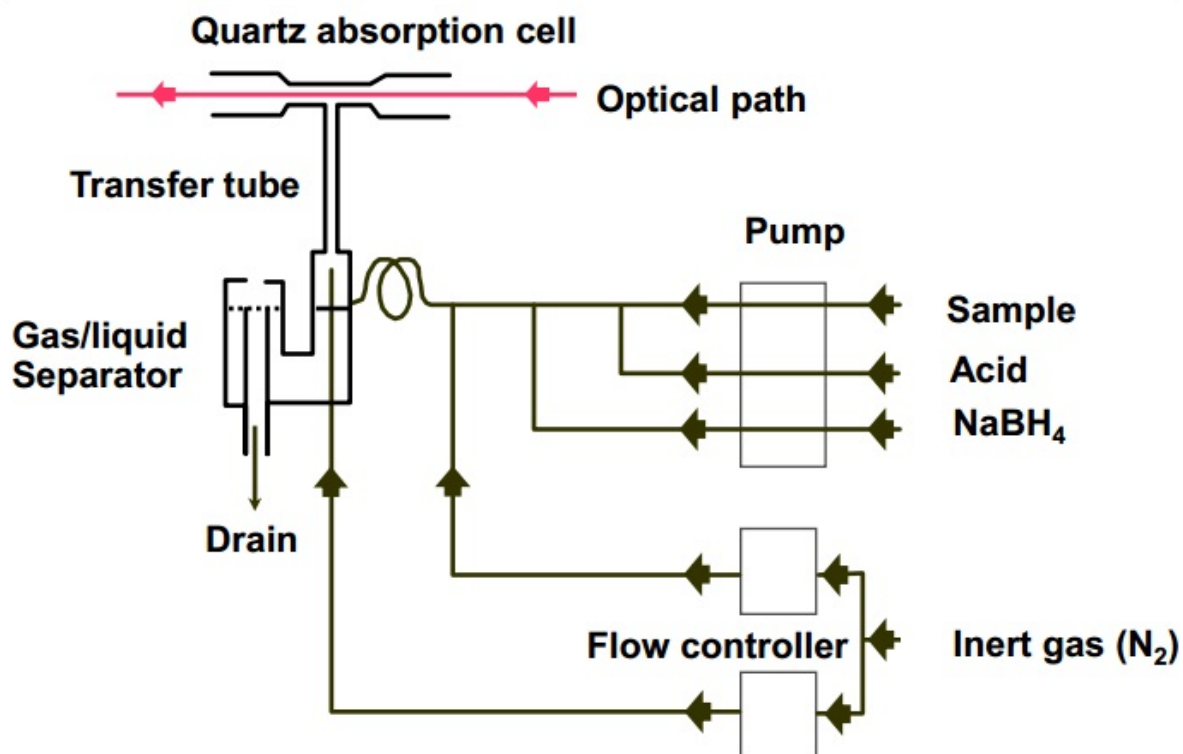


Figura 1. Generador de Hidruros

1.5 VALIDACIÓN MÉTODOS

Los métodos utilizados en un laboratorio de análisis químicos han de ser evaluados y sometidos a prueba para asegurarse de que producen unos resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, es decir, han de ser validados. La validación o la verificación de un método se realizan mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su exactitud, precisión, etc. El proceso que ha de seguirse para ello debe constar por escrito como procedimiento normalizado de trabajo. Una vez validados o verificados los métodos, su utilización habitual en el laboratorio debe ser autorizada formalmente por la persona responsable, por ejemplo, el director del mismo. [5]

1.5.1 Validación Interna

La cuestión fundamental a resolver antes de crear un nuevo método es establecer qué uso se hará de los resultados. De este uso derivarán los criterios de calificación del funcionamiento del método, lo que puede dar lugar a que se establezca, o limite, el número de técnicas entre las que elegir. Valga un ejemplo: cualquier método de análisis cuantitativo de drogas fiscalizadas en materiales incautados tendrá que cumplir algunos requisitos mínimos de exactitud y precisión, selectividad, etc., para que pueda aceptarse su utilización general.

1.5.3. Figuras de Mérito

Las figuras de mérito o también llamadas características de fiabilidad, son las características en las que se demuestra la capacidad de un método analítico de mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación. [4]

1.5.3.1 Límite de Detección (LDD)

Es la cantidad o concentración mínima de analito en una muestra, que puede ser detectada con un nivel de confianza, En una definición más reciente, la ISO [ISO, 1997] introduce el término general “concentración neta mínima detectable” como la concentración neta verdadera del analito en el material sujeto a análisis que conducirá, con una probabilidad $(1-\beta)$, a la conclusión de que la concentración de analito en el material analizado es mayor que la de un blanco.

1.5.3.2 Límite de Cuantificación (LDC)

Cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de concentración del analito [9]

1.5.3.2 Linealidad

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

1.5.3.3 Precisión

Expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Para describir la precisión de un conjunto de datos repetidos se utilizan tres términos muy conocidos: La desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación. [13]

1.5.3.4 Exactitud

Grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. Se estima mediante los valores de los patrones de referencia o estándares y se reporta como porcentaje de recuperación (%R) [13]

1.5.3.5 Carta de Control Analítico

La carta de control analítico es una herramienta estadística que permite monitorear el comportamiento de los resultados de una metodología a lo largo del tiempo. En la mayoría de las organizaciones se lleva una carta de control analítico para las metodologías de interés. La carta se construye midiendo a lo largo del tiempo una muestra o un patrón de referencia, con el acumulado de las mediciones se calcula la desviación estándar de las medidas y se fijan unos límites. Los límites de advertencia y los límites de control; los límites de advertencia por lo general corresponden a dos desviaciones estándar por debajo y por encima del promedio de las mediciones y los límites de control, tres desviaciones estándar por debajo y por encima del promedio de las mediciones.

1.6 INCERTIDUMBRE EN LAS MEDIDAS ANALÍTICAS “U”

En la búsqueda de resultados confiables los analistas descubren que una muestra analizada un número definido de veces proporciona diferentes valores aunque cada una de las determinaciones se realice de la misma muestra y bajo condiciones de trabajo idénticas. Los resultados oscilaran dentro de un rango. Esto es debido a los errores que se pudieron cometer durante el análisis. Cada paso a seguir durante el análisis tiene asociado un error inherente, al cometer

dichos errores, las medidas realizadas no serán verdaderas, oscilarán dentro de un rango llamado incertidumbre. Es necesario identificar cada una de las fuentes de incertidumbre, evaluarlas y finalmente estimar el aporte de cada fuente a la incertidumbre total del análisis.

1.6.1 Fuentes de Incertidumbre en las Medidas Analíticas

Un análisis en particular está compuesto en la mayor parte de los casos por varios pasos, cada uno de ellos tiene asociado un valor de incertidumbre en la medida, se deben identificar y cuantificar estas fuentes, con el fin de reportar la incertidumbre asociada a las metodologías empleadas.

1.6.1.1. Pesada de una muestra en la balanza.

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

Corrección por flotación.

Un error por flotación afectará los datos si la densidad del objeto que se pesa difiere significativamente de los pesos estándar. El origen de este error es la diferencia de la fuerza de flotación ejercida por el medio (aire) sobre el objeto y los pesos estándar. La corrección para la flotación se obtiene por medio de la ecuación 1.3.

$$W_1 = W_2 + W_2 \left(\frac{d_{\text{aire}}}{d_{\text{objeto}}} - \frac{d_{\text{aire}}}{d_{\text{pesa}}} \right) \quad \text{Ec.1.3}$$

Efectos de la temperatura

Los intentos para pesar un objeto cuya temperatura es diferente de la del ambiente darán como resultado un error significativo. La causa más común de este problema es el tiempo necesario para que el objeto que se ha calentado regrese a la temperatura ambiente. Los errores debidos a la diferencia de temperatura tienen dos fuentes. Primero, las corrientes de convección dentro de la

balanza ejercen un efecto de flotación sobre el platillo y el objeto. Segundo, el aire caliente atrapado en el recipiente cerrado pesa menos que el mismo volumen a menor temperatura

División de escala de la balanza

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

1.6.1.2. Medición de un volumen.

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

Tolerancia del material volumétrico

Son los límites de aceptación que se han elegido para un producto, esto depende de la capacidad de llenado.

Efecto de la temperatura sobre la medición del volumen.

El volumen ocupado por una determinada masa de un líquido varía con la temperatura, lo mismo que sucede con el recipiente que contiene al líquido durante la medición. La mayor parte de dispositivos para mediciones volumétricas

se fabrica con vidrio, que tiene un pequeño coeficiente de expansión. En consecuencia, para el trabajo analítico no se debe tener presente como una fuente de incertidumbre en la medida.

Las mediciones volumétricas se deben referir a una temperatura estándar, este punto de referencia por lo general es de 20°C, por tanto se debe usar una corrección en la medidas de volumen medidos a temperaturas diferentes, dicho factor de corrección se describe en la ecuación 1.4.

$$\pm (V * \Delta T * Z) \quad \text{Ec.1.4}$$

En donde V es el volumen medido, ΔT la diferencia entre la temperatura de calibración y la experimental y Z el factor de compresibilidad del agua [36].

1.6.1.3. Durante una dilución

El factor de dilución normalmente se emplea cuando se miden elementos químicos en muestras de concentración de masa ($\mu\text{g/L}$) mayor al intervalo de trabajo del método. El factor de dilución se obtiene a partir de un proceso de dilución y pueden llevarse a cabo n diluciones de la muestra. El modelo matemático de una dilución está dado por la ecuación 1.5.

$$Fd_n = \frac{V_2}{V_1} \quad \text{Ec.1.5}$$

En donde, Fd_n es el factor de dilución n , V_2 es el volumen de aforo y V_1 el volumen de la alícuota. En el proceso de una dilución se identifican dos fuentes de incertidumbre, el V_2 de aforo y el V_1 de la alícuota de la muestra. La estimación de incertidumbre estándar relativa del factor de dilución (${}_nUFd$), se realiza combinando las incertidumbres de ambas mediciones: volumen de la alícuota de muestra y volumen de aforo, de forma relativa y cuadrática, de acuerdo a la ecuación (1.6.)

$$\frac{UFd_n}{Fd_n} = \sqrt{\left(\frac{UV_1}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{UV_2}{V_2}\right)^2} \quad \text{Ec.1.6}$$

1.6.1.4. Construcción de una curva de calibración

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

$$\gamma = m\alpha + b \quad \text{Ec.1.7}$$

La construcción de esta curva de calibración y la interpolación de los patrones y muestra genera un valor de incertidumbre el cual debe ser combinado con la incertidumbre de la preparación de los patrones para evaluar la incertidumbre en la curva de calibración. [18]

1.6.2. Evaluación de la Incertidumbre.

En esta etapa deben cuantificarse todas las fuentes de incertidumbre identificadas en la etapa anterior. Hay dos formas de cuantificar las fuentes de incertidumbre:

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

Es importante señalar que todas las componentes de incertidumbre deben expresarse como incertidumbre estándar. En el caso de que la incertidumbre se determine experimentalmente, la incertidumbre estándar se obtiene calculando la desviación estándar de los replicados. Si se utiliza información previa, la incertidumbre estándar se suele obtener dividiendo por $\sqrt{3}$ el intervalo

proporcionado por el fabricante (con lo que se asume que el intervalo de confianza sigue una distribución rectangular) [11]

1.6.2.1. Combinación

Una vez que se han calculado todas las fuentes de incertidumbre, éstas deben combinarse siguiendo la ley de propagación de errores. De esta forma, se obtiene una incertidumbre estándar combinada, U_c . El último paso, consiste en calcular la incertidumbre expandida, U . Para ello, debe multiplicarse la incertidumbre estándar por un factor de cobertura, k , ($U=k \cdot u$). Normalmente, k es igual a 2. De esta forma, se obtiene un intervalo donde existe aproximadamente un 95% de probabilidad de que se encuentre el valor verdadero [14].

1.6.3. Expresión de la incertidumbre

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

Resultado = $X \pm U$ (unidades)

1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

1.7.1. Errores aleatorios

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

1.7.2. Errores sistemáticos

Los errores sistemáticos tienen un valor definido, una causa conocida y una magnitud semejante a la que tienen las mediciones repetidas efectuadas en la misma forma. Estos errores dan lugar a una tendencia en la técnica de medición, tiene un signo y afecta por igual a todos los datos de un conjunto. Existen tres

tipos de errores sistemáticos: Los que se deben al instrumento de medida, ya sea porque tiene pequeños defectos o por inestabilidad de sus componentes; los errores del método que surgen del comportamiento químico o físico no ideal de los sistemas analíticos y los errores personales que se deben al mal manejo del analista por falta de precaución o experiencia.

1.7.3. Propagación de errores en los cálculos aritméticos

Con frecuencia es necesario estimar la desviación estándar de un resultado calculado a partir de dos o más datos experimentales, donde cada uno tiene una desviación estándar conocida. Como se muestra en la tabla 1.1. La forma de hacer estos estimados depende del tipo de operaciones aritméticas empleadas.

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

Figura 2. Errores en los Cálculos Aritméticos

1.7.4 Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de varianza se puede utilizar para separar la variación debida al error aleatorio de cualquier otra variación. También se puede emplear en situaciones donde hay más de una fuente de variación aleatoria o factor. Las variaciones pueden ser controladas por el operador con el fin de diseñar experimentos intencionalmente que permitan identificar y evaluar las fuentes de variación en una

Metodología. Al variar un factor estamos hablando de un ANOVA de un factor, si se varían dos factores el ANOVA es de dos factores, y se mostrará si los resultados son significativamente diferentes al variar un factor.

2. METODOLOGÍA

2.1. PREVALIDACION.

En esta etapa preliminar, se obtuvo información acerca del alcance de la validación. Verificar que se cuenten con los materiales necesarios para llevar a cabo la validación de las metodologías analíticas para la determinación de arsénico total y disuelto en aguas y arsénico total en suelos.

2.1.1. Verificación de patrones y reactivos

El proceso de validación requiere del uso de patrones de referencia con certificado de pureza o de incertidumbre, esto permite dar certeza a las medidas realizadas. Se hizo una lista de los reactivos a utilizar en la validación de las metodologías, la lista de reactivos aplica para todas las metodologías empleadas.

Utilizar sustancias grado analítico en todos los métodos. Otros grados podrán utilizarse, siempre que sea comprobado previamente que el reactivo es de una pureza suficientemente alta para permitir su uso sin disminuir la exactitud de la determinación. Si la pureza de un reactivo es cuestionable, analizar el reactivo para determinar el nivel de impurezas. El blanco de reactivo debe ser inferior para poder ser usado.

- *Agua destilada.* El agua empleada debe estar libre de interferencias.
- *Ácido nítrico concentrado, HNO_3 .* El ácido debe ser analizado para determinar el nivel de impurezas. Si el blanco del método es <LDM, el ácido puede ser utilizado.
- *Ácido clorhídrico (concentrado), HCl.* El ácido debe ser analizado para determinar el nivel de impurezas. Si el blanco del método es <LDM, el ácido puede ser utilizado.
- *Peróxido de hidrógeno (30%), H_2O_2 .* Este oxidante debe ser analizado para determinar el nivel de impurezas. Si el blanco del método es <LDM, el peróxido puede ser utilizado.

- Soluciones estándar stock. La solución stock corresponde a una solución comercial de una concentración de 1000 mg As/L.
- Urea.
- Borohidruro de sodio
- NaOH
- L-cisteína
- Ácido ascórbico
- Yoduro de potasio

2.1.2. Chequeo de procedimientos

Para cada una de las metodologías se chequearon los procedimientos propuestos para validar e implementar.

2.1.2.1. Arsénico Total en Suelos

Se implementó el método de la EPA, Environmental Protection Agency [SW 846, On-line]. Method 3050B: Acid digestion of sediments, sludge and soils. United States, 1996. [Revision 2].

Pesar entre 1-2 g de muestra (peso húmedo) ó 0,25 a 1,0 g de muestra (peso seco) y transferir al recipiente donde se va a realizar la digestión. Para las muestras con alto contenido de líquido, puede utilizarse una mayor cantidad de muestra siempre y cuando se complete la digestión. Agregar 10 mL de HNO₃ 1:1, agitar y llevar a digestión en los frascos SCHOTT de 25 ml. Calentar la muestra suavemente durante 10 a 15 minutos evitando la ebullición o a ebullición suave. Dejar enfriar y adicionar 5ml de HNO₃ concentrado y calentar hasta reflujo por 30 min. Si se generan humos de color marrón, que indica la oxidación de la muestra por el HNO₃, repetir este paso (adición de 5 ml de HNO₃ concentrado) o calentar a 95 °C por 1 hora sin ebullición hasta que no haya desprendimiento de humo marrón, lo que indica la reacción completa con el HNO₃.

Una vez se ha completado la actividad 2 y la muestra se ha enfriado, añadir 2,0ml de agua destilada y 1,0ml de H_2O_2 30% (6.3.5). Tapar el recipiente y colocarlo para realizar la digestión sobre la fuente de calor para calentamiento y así empezar la reacción con el peróxido. Asegurar evitar que se produzca la pérdida de muestra debido a la excesiva efervescencia. Calentar la muestra hasta que desaparezca la efervescencia y enfriar el recipiente.

Continuar añadiendo alícuotas de 1 mL de H_2O_2 30% con calentamiento hasta mínima efervescencia o hasta que la apariencia general de la muestra general cambie a un color claro.

Para el Análisis en Llama agregar 5 ml de HCl concentrado y 10 ml de Agua destilada y calentar a 95 sin ebullición durante 5 minutos. Para el procedimiento de reducción de Arsénico para su lectura en el equipo , remitirse al numeral 2.1.2.4

2.1.2.2. Arsénico Total en Aguas

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

Transferir un volumen medido (se recomienda un volumen de 100-50 mL) de muestra preservada al recipiente de digestión. Añadir 1.5 ml de HNO_3 concentrado. Llevar a ebullición lenta hasta que se observe que la digestión se haya completado (solución de color claro). Dejar enfriar la solución anterior y adicionar 10 ml de HCl 1:1. Llevar a ebullición lenta, hasta que la digestión se haya completado.

Dejar enfriar y enjuagar las paredes del recipiente de reacción y la tapa con agua destilada. Filtrar con papel Whatman No. 41, para eliminar posibles residuos sólidos, en un balón aforado de 100 mL ó un balón aforado de volumen adecuado. Aforar con agua destilada y agitar vigorosamente la solución. Tomar las porciones

necesarias para la determinación de Arsénico y continuar con la actividad del numeral 2.1.2.4 del procedimiento para la reducción del Arsénico y la determinación por espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros.

2.1.2.3 Arsénico Disuelto en Aguas

Los análisis se hicieron en las mismas muestras de agua recolectadas para la determinación de Arsénico total, pero sometidas a un proceso de filtración, por tanto, las verificaciones, protocolo, intervalo de aplicación, método de referencia y demás factores son los que se enunciaron anteriormente.

Para el análisis de mercurio disuelto es necesaria una filtración previa de la muestra colectada y sin acidificar. Se toma un filtro de membrana con porosidad de 0.45 μm y se coloca en el equipo de filtración al vacío. El filtro se lava con agua desmineralizada antes de su uso. Se filtra un volumen aproximado de 100 mL de la muestra sin acidificar. Después, de la etapa de filtrado se sigue la etapa de reducción de Arsénico en la muestra del numeral 2.1.2.4.

2.1.2.4 Preparación de la muestra. Reducción del Arsénico

Transferir una alícuota digerida (filtrada para el caso de As disuelto) de 10 ml a un balón aforado de 25 mL y agregar 10 mL de ácido clorhídrico concentrado (~37%). Posteriormente, añadir 2,0 mL de solución de urea al 50 % (p/v), de tal forma que la concentración final de urea sea del 4% (p/v); 1,0 ml de solución de L-cisteína al 20 % (p/v) y 2,5 ml de solución de ácido ascórbico al 5% (p/v) (concentración final de 0,2% p/v). Dejar en reposo durante un periodo aproximado de 2 horas.

Adicionar a la solución anterior 1,0 ml de solución de yoduro de potasio al 25% (p/v) y 5 ml solución de ácido clorhídrico concentrado (~37%) de tal forma que la concentración final de ácido sea del 40 % (v/v). Agitar vigorosamente y aforar con agua destilada a 25 ml.

Dejar en reposo entre 1.5-2 horas para permitir la reducción de las especies de Arsénico a As (III), antes de la lectura en el equipo de FLAA/ GH.

2.1.3. EQUIPOS Y MATERIAL

Se realizó la lista de equipos usados en la validación a los cuales se les realizó el mantenimiento preventivo correspondiente, que garantizara óptimas condiciones de funcionamiento.

2.1.3.1 Balanza analítica

La empresa MetroCal Ltda. organización autorizada para realizar calibración de balanzas, verificó y calibró la balanza analítica con la expedición del correspondiente certificado de calibración..

2.1.3.2 Espectrofotómetro de absorción atómica

Marca Agilent Technologies, modelo AA240FS, que cuenta con un Generador de Hidruros, marca Agilent Technologies, modelo VGA77. Estos equipos fueron revisados y calibrados por la empresa Agilent (México).

2.1.4. VERIFICACIÓN DEL MATERIAL VOLUMÉTRICO

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

2.2 VALIDACIÓN

En esta validación, la optimización de variables instrumentales, la curva de calibración, la linealidad, el intervalo de trabajo, el Diseño experimental, el estudio de las figuras de mérito y el cálculo de la Incertidumbre es igual para los métodos As total y disuelto en aguas, y As Total en Suelos.

2.2.1 Optimización de Variables Instrumentales

Se evaluaron las condiciones instrumentales, para optimizar estos parámetros y garantizar, la correcta lectura de los patrones y muestras en el equipo. El

fabricante del equipo sugiere ciertos parámetros y condiciones para optimización y se realizó el estudio de estas variables con base a esa información.

2.2.1.1 Optimización de Generación del Hidruro

Antes de hacer este estudio se ajustó la lámpara y la altura del mechero con la celda de cuarzo para que diera el valor de mayor absorbancia, se ajustó el cero y se procedió a evaluar las concentraciones de Borohidruro en una solución de 0.5% de NaOH y con una solución de 6M de HCl.

Se evaluaron las diferentes concentraciones del reductor teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante. 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 3 todos en porcentaje peso-volumen (%p/v) de NaBH₄ en la solución de NaOH. Utilizando un patrón de 10 µg As/L, el cual debe dar una absorbancia de 0.3, haciendo la lectura con la longitud de onda $\lambda=197.3$ nm.

2.2.1.2 Proporción Aire Acetileno

Se evaluó la proporción de la concentración de Aire-Acetileno en la llama, los datos de comparación fueron los valores de absorbancia, utilizando un patrón de 10 µg As/L, haciendo la lectura con la longitud de onda $\lambda=197.3$ nm.

2.2.1.3 Tiempo de pre-Lectura de la muestra

Se ajustaron los valores de pre- Lectura de la muestra (delay time), el tiempo en el que el generador toma la muestra y hace la lectura en el equipo se ajustaron valores en el desarrollo del método 5,10,15,20,25,30,35,40,45 segundos respectivamente.

2.2.2 Curva de calibración

Solución estándar de trabajo de 250 µg/L, Se toman 25 µL de la solución stock de arsénico y se diluyen a 100 mL. Con esta solución estándar de trabajo se prepara la respectiva curva de calibración. Todos los patrones de la curva de calibración se les adiciona un mL de una solución que contiene el 25% de yoduro de potasio y 5% de ácido ascórbico, adicionalmente se adicionan 5mL de HCl concentrado.

Preparar los patrones de la curva de calibración de acuerdo con las siguientes indicaciones:

- 1 $\mu\text{g As/L}$: Se tomaron 100 μL del patrón de 250 $\mu\text{g As/L}$ y se diluyeron a 25 mL.
- 3 $\mu\text{g As/L}$: Se tomaron 300 μL del patrón de 250 $\mu\text{g As/L}$ y se diluyeron a 25 mL.
- 5 $\mu\text{g As/L}$: Se tomaron 500 μL del patrón de 250 $\mu\text{g As/L}$ y se diluyeron a 25 mL.
- 7 $\mu\text{g As/L}$: Se tomaron 700 μL del patrón de 250 $\mu\text{g As/L}$ y se diluyeron a 25 mL.
- 10 $\mu\text{g As/L}$: Se tomaron 1000 μL del patrón de 250 $\mu\text{g As/L}$ y se diluyeron a 25 mL.

2.2.3. Intervalo de validación.

Según la curva de calibración descrita anteriormente el intervalo de validación es de 0 a 10 $\mu\text{g As/L}$. Y también se evidenció gráficamente este límite ya que patrones que superan esta concentración se encuentran fuera del rango lineal. El manual del equipo de absorción atómica asegura linealidad dentro de este intervalo.

2.2.4 Linealidad

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

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

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

2.2.5 Diseño experimental

Se siguieron los lineamientos de validación del Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander, para la validación de métodos analíticos. Se analizaron en orden aleatorio las muestras citadas a continuación por un periodo de 6 días que pudieron ser consecutivos o no.

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

Descripción de soluciones y patrones

Se prepararon blancos enriquecidos para As total en aguas y suelos, para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación de los métodos. Para el estándar de suelo se utilizó un Material de Referencia Certificado (MRC) del IDEAM (2010), cuya concentración de Arsénico es 132 mg/Kg. Para esto, se tomaron pesos de muestras para que la concentración se registrara en un punto a mitad de la curva y para la carta de control, se analizó una concentración de aproximadamente a 0,6 C de la curva, donde, C es la concentración tope de la

curva de calibración. Y Para la evaluación de la precisión se prepararon soluciones de 0.09C y 0.9C.

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

2.2.6 Figuras de Mérito

2.2.6.1. El límite de detección

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

$$LD = \bar{X} + 3SD \text{ Ec.2.2}$$

—
 \bar{X} es el valor medio de las determinaciones y SD es la desviación estándar de las medidas.

2.2.1.6. El límite de cuantificación

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

$$LC = \bar{X} + 10SD \text{ Ec.2.3}$$

—
 \bar{X} es el valor medio de las determinaciones y SD es la desviación estándar

2.2.1.7. Precisión

Se estimó mediante el cálculo del coeficiente de variación obtenido de las soluciones preparadas de 0.09C y 0.9C

2.2.1.8. Exactitud

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

2.3. ELABORACIÓN DE LAS CARTAS DE CONTROL.

2.3.1 Carta de Control para suelos

Se pesó una cantidad promedio en 10 días del MRC del IDEAM, para que diera una lectura cercana a 0.6C de la curva de calibración. Con esas medidas se elaboró la carta de control para suelos.

2.3.2 Carta de Control para Aguas

Se monitoreo diariamente la concentración de un patrón de As $\mu\text{g/L}$ para aguas durante intervalo de 10 días, con ésta se elaboró la carta de control analítico identificando los límites de alarma y de acción.

2.4. CALCULO DE LA INCERTIDUMBRE.

El cálculo de la incertidumbre se realizó para las técnicas validadas

2.4.1. Caracterización de las fuentes individuales de incertidumbre.

En cada una de las etapas de las metodologías se identificaron las fuentes de incertidumbre las cuales deben ser cuantificadas, combinadas y expandidas para lograr estimar la incertidumbre de la metodología.

2.4.1.1. Incertidumbre en la determinación de Arsénico total en Suelos

Se identificaron las fuentes individuales de incertidumbre en la pesada, la dilución de muestra, la preparación de los patrones y la lectura de la curva de calibración.

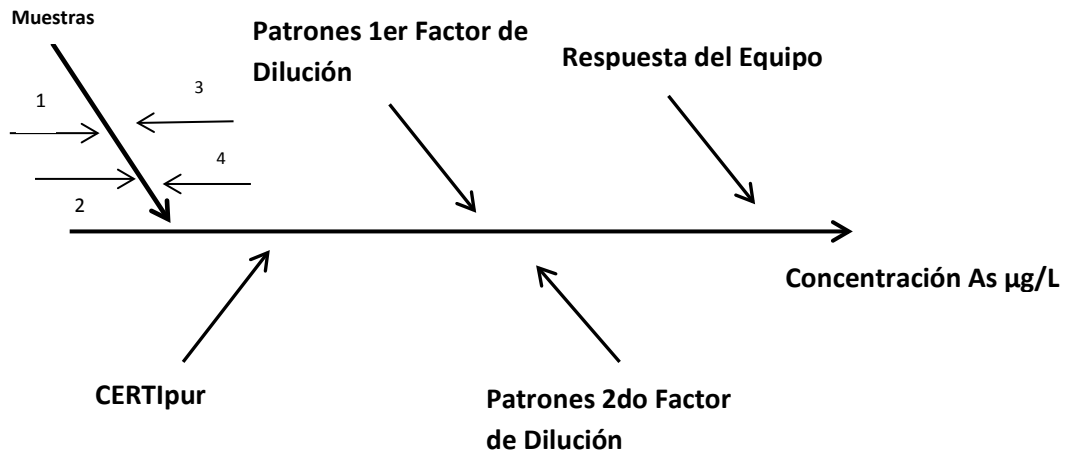


Figura 3. Fuentes de Incertidumbre, Método de Arsénico Total en Aguas

MUESTRAS
1 Pesada de las Muestras
2 Aforo en un Balón de 100 mL
3 Alícuota de muestra digerida 10 mL
4 Aforo de la alícuota en un balón de 25 mL
Certipur As
Incertidumbre asociada a la solución Patrón de As
Preparación de la Solución patrón
Incertidumbre debida a la preparación de la solución de trabajo de 250µg/L As
Preparación de los patrones de la Curva
Incertidumbre debida a la preparación de las soluciones para la curva de Calibración
Respuesta del Equipo
Incertidumbre debida a la lectura en el equipo

Tabla 1. Fuentes de Incertidumbre, Método de Arsénico Total en Aguas

2.4.1.2. Incertidumbre en la determinación de Arsénico total en Aguas

Se identificaron las fuentes individuales de incertidumbre en la pesada, la dilución de muestra, la preparación de los patrones y la lectura de la curva de calibración.

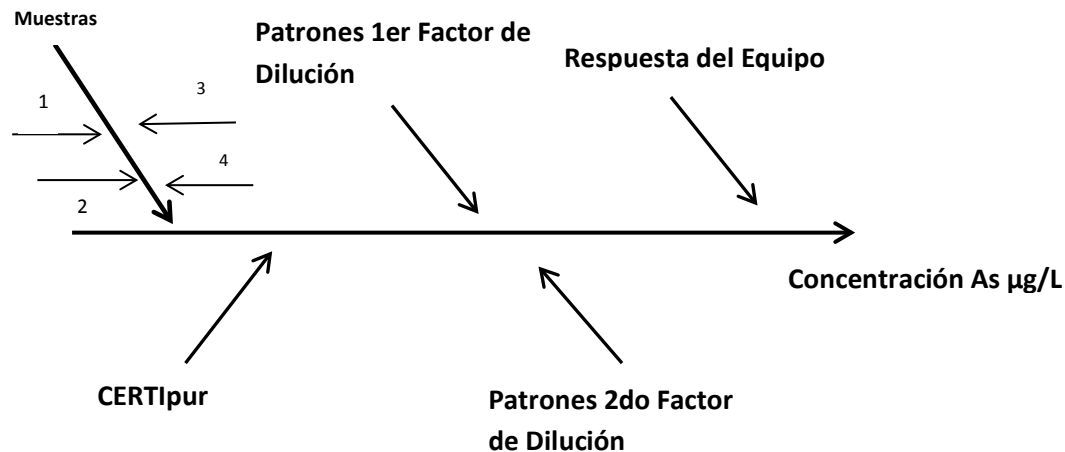


Figura 4. Fuentes de Incertidumbre, Método de Arsénico Total en Suelos

MUESTRAS
1 Toma de Muestra Pipeta de 100 mL
2 Aforo en un Balón de 100 mL
3 Alícuota de muestra digerida 10 mL
4 Aforo de la alícuota en un balón de 25 mL
Certipur As
Incertidumbre asociada a la solución Patrón de As
Preparación de la Solución patrón
Incertidumbre debida a la preparación de la solución de trabajo de 250µg/L As
Preparación de los patrones de la Curva
Incertidumbre debida a la preparación de la soluciones para la curva de Calibración
Respuesta del Equipo
Incertidumbre debida a la lectura en el equipo

Tabla 2. Fuentes de Incertidumbre, Método de Arsénico Total en Suelos

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 PREVALIDACIÓN

3.1.1 Verificación de Patrones

- *Agua destilada.*
- *Ácido nítrico concentrado, HNO₃.*
- *Ácido clorhídrico (concentrado),*
- *Peróxido de hidrógeno (30%)*

Además de revisar los certificados de análisis por parte de los proveedores, se hizo una verificación de los reactivos a utilizar, para descartar cualquier contaminación de As en estos, los resultados fueron menores al límite de detección de los métodos. Los valores de concentración tienen un coeficiente de variación de 20 al 83 %, lo que indica que estadísticamente se comportan como blancos.

Reactivo	Concentración As µg/L	%CV
Agua Destilada	ND	83,3
Ácido Nítrico	0,01	20,34
Ácido Clorhídrico	0	34,15
Peróxido de Hidrógeno	0	45,32

Tabla 3. Análisis de Reactivos para las Metodologías

3.1.2 Verificación de Material Volumétrico

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

Medidas	Pipeta 100 mL	Balón 100 mL	Pipeta 10 mL	Balón 25 mL	Micropipeta de 1000µL	Micropipeta de 100µL
1	99,8728	99,9076	10,0137	25,0326	1004	0,1008
2	99,9618	99,9372	9,9939	25,0003	1007	0,1007
3	99,9486	99,8500	9,9876	24,9555	1005	0,1005
4	99,9569	99,9058	9,9989	24,9614	1003	0,1003
5	99,9484	99,9176	10,0094	25,0002	1008	0,1008
6	99,9643	99,9147	9,9981	24,9504	1002	0,1002
7	99,9980	99,9360	10,0001	24,9780	1010	0,1010
8	100,0050	99,9460	9,9967	24,9937	998	0,0998
9	99,9463	99,9305	10,0078	24,9819	1004	0,1004
10	99,8628	99,9070	10,0064	24,9459	1012	0,1012
Corrección	-0,0535	-0,0848	0,0013	-0,0200	0,0053	0,0006
s	0,0462	0,0270	0,0080	0,0274	0,0041	0,0004
Tolerancia mL(*)	±0,08	±0,1	±0,02	±0,04	±0,08	±0,08

(*) Nota: los valores de tolerancia de las micropipetas usadas son del rango de µL.

Tabla 4. Verificación de Material Volumétrico

En los datos mostrados en la tabla 4, se puede evidenciar que el material volumétrico usado se encuentra dentro de las especificaciones de tolerancia emitidos por el fabricante, entonces se concluye que realizada la verificación el material es apto para el uso en la validación.

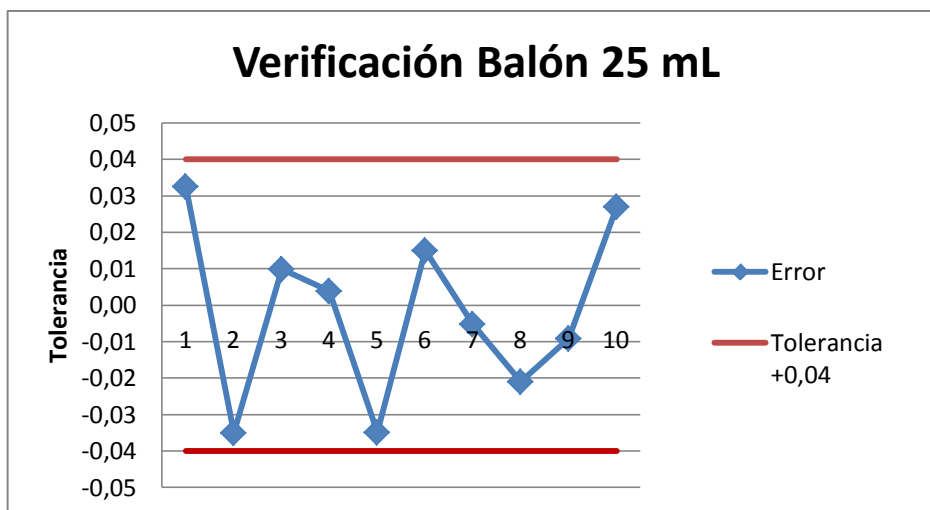


Figura 5. Verificación de Balón de 25 mL.

En la grafia podemos observar el comportamiento del error en la verificación del balón de 25 mL, que se encuentra dentro de los rangos de tolerancia.

3.2 VALIDACIÓN

3.2.1 Optimización de Variables Instrumentales

3.2.1.1 Optimización de Generación del Hidruro

NaBH ₄ (%p/v)	NaOH (%p/v)	Absorbancia
0,3	0,5	0,3545
0,5	0,5	0,314
1	0,5	0,2875
2	0,5	0,2135
3	0,5	0,2446

Tabla 5. Optimización Generación de Hidruro As

En la tabla 5, podemos observar los valores de concentración de Borohidruro usados en la optimización, el valor que mejor reportó absorbancia para el patrón de 10µg/L fue la concentración utilizada de 0,3 (%p/v), concentraciones de reductor mayores a este valor reportan menor absorbancia, esto es debido a que

se genera demasiada efervescencia que causa perturbaciones en la separación líquido-gas del reactor del generador de hidruros.

Gráficamente podemos observar el comportamiento de la absorbancia frente a la concentración del agente reductor. El uso de concentraciones altas de reductor también ha sido asociado con curvas de calibración no lineales, con coeficientes de correlación (R^2) bajos. [15]

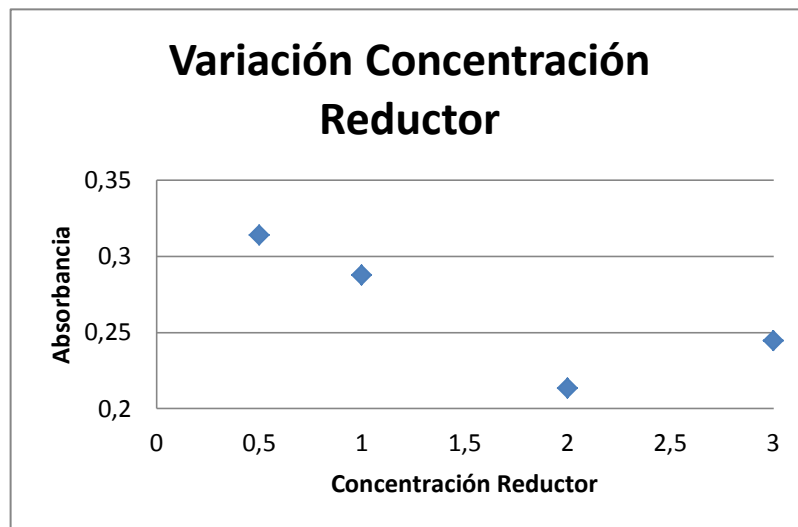


Figura 6. Concentración del Reductor vs. Absorbancia

La concentración de ácido usada fue la recomendada por el fabricante del equipo ya que, se necesitan condiciones ácidas para generar el hidruro, la concentración usada fue de HCl 6M.

3.2.1.2 Proporción Aire Acetileno

Cada elemento que forma un hidruro tiene una temperatura ideal de atomización, las proporciones de aire y acetileno fueron evaluadas. Los resultados se presentan en la tabla 6.

Aire L/min	Acetileno L/min	Absorbancia
13,5	2,1	0,2932
13,5	3,1	0,2853
12,5	2,1	0,3583
12,5	3,1	0,2942
11,5	3,1	0,2875
11	2,1	0,2932

Tabla 6. Proporción Aire Acetileno

En la figura 7 podemos observar el comportamiento de la relación entre el combustible y el oxidante, la relación estequiométrica óptima en la reacción de combustión es 2 moles de Acetileno por 5 moles de Oxígeno, los cálculos realizados para la relación de máxima absorbancia Aire/Acetileno= 5.5 (L/min) como resultado que esa cantidad de acetileno (2,1 L/min) debe reaccionar con aproximadamente (12,7 L/min) de Aire. Esto quiere decir que la combustión de la llama es completa y permite que el hidruro se atomice totalmente en la celda y no se afecte la concentración real en la muestra.

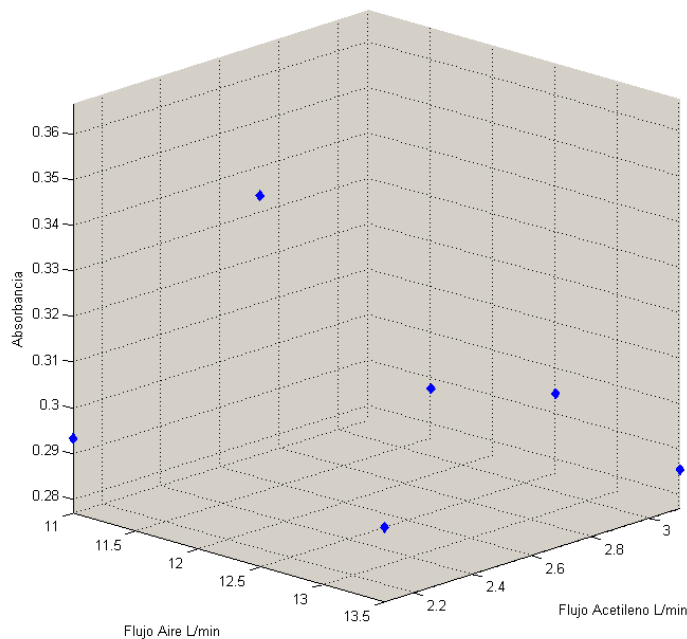


Figura 7. Aire-Acetileno vs. Absorbancia

3.2.1.3 Tiempo de pre-Lectura de la muestra

Como podemos observar en la figura 8, la absorbancia máxima se alcanza después de los 30 segundos después de haber tomado la muestra. En este lapso de tiempo se asegura que la muestra ya ha llegado al reactor del generador de hidruros, y se pueda hacer la respectiva lectura. Este mismo tiempo se dejó para la limpieza del reactor del generador para así evitar el efecto memoria e introducir error en medidas posteriores.

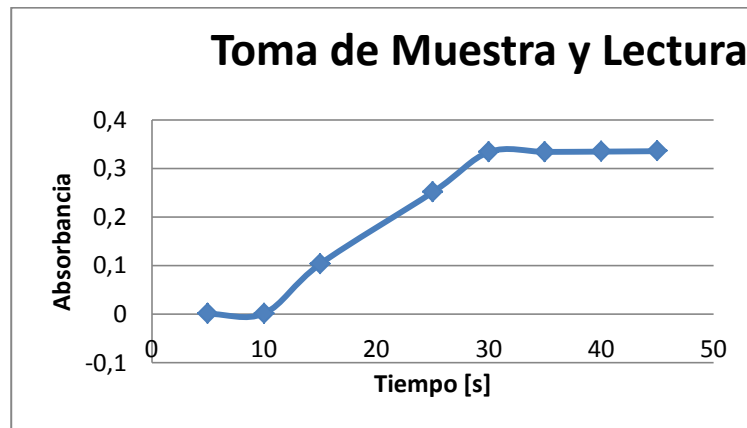


Figura 8. Tiempo de Prelectura de muestras.

3.2.2 Curva de calibración

Las recomendaciones dadas por el fabricante, sugieren y muestran que la curva de calibración es lineal solo hasta el valor de $10\mu\text{g/L}$, se prepararon patrones de $12\mu\text{g/L}$ y $15\mu\text{g/L}$, para verificar la linealidad.

Conc. $\mu\text{g/L}$	Absorbancia
0	0
1	0,0398
3	0,1139
5	0,1858
7	0,2450
10	0,3416
12	0,3890
15	0,4478

Tabla 7. Absorbancia Patrones

Con estos valores se construyó una gráfica y se observó el coeficiente de correlación, no se ajusta a un comportamiento lineal $R^2 = 0,9893$. La curva de calibración es lineal solo hasta el valor de $10\mu\text{g/L}$ y se leyeron estos patrones en 6 días diferentes, la tabla 8 muestra las lecturas de los patrones de la curva.

Patrón $\mu\text{g/L}$	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Promedio
0	0	0	0	0	0	0	0
1	0,038	0,0374	0,0398	0,0386	0,0368	0,0385	0,0382
3	0,0957	0,1131	0,1139	0,1287	0,1075	0,1105	0,1116
5	0,1578	0,1868	0,1821	0,1963	0,1699	0,174	0,1778
7	0,2311	0,2584	0,245	0,2668	0,2244	0,2483	0,2457
10	0,3226	0,3508	0,3615	0,3545	0,3088	0,3466	0,3408
r	0,9995	0,9991	0,9995	0,9970	0,9983	0,9997	0,9995
m	0,0322	0,0354	0,0356	0,0358	0,0308	0,0346	0,0340
b	0,0014	0,0043	0,0028	0,0092	0,0079	0,0031	0,0048

Tabla 8. Lectura de Patrones

Con los valores promedio se construyó la curva de calibración.

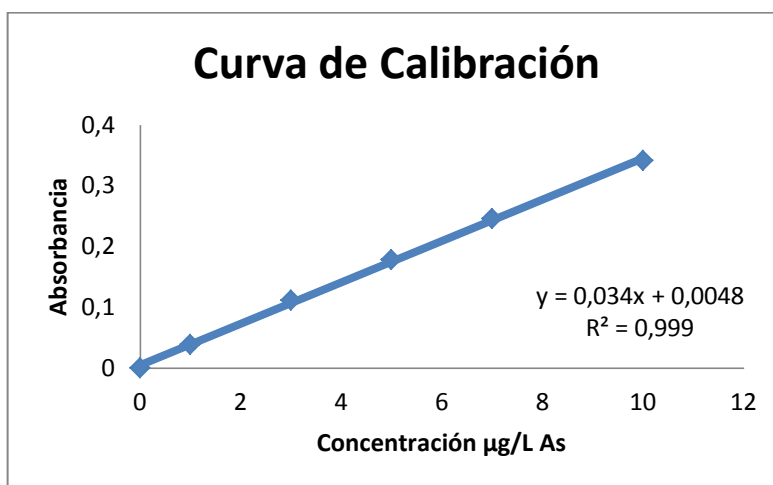


Figura 9. Curva de Calibración As

3.2.3. Intervalo de validación.

Según la curva de calibración obtenida, el intervalo de validación es de 0 a 10 µg As/L. El manual del equipo de absorción atómica asegura linealidad dentro de este intervalo y se observa la correlación lineal directa entre la absorbancia y la concentración en este intervalo.

3.2.4 Linealidad

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

El valor calculado *t* con la ecuación 2.1, se compara con el valor tabulado, se propone una hipótesis nula, en este caso que no existe correlación entre *Y* y *X*. Si el valor calculado es mayor que el tabulado la hipótesis nula se rechaza y se concluye que hay una relación significativa.

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

***t* cal= 37,21** reemplazando *r* en Ec.1 con *n*=7

***t* tab= 2,57** con Intervalo de confianza del 95% y 4 grados de libertad.

Como *t*_{cal}>*t*_{tab} se rechaza la hipótesis y si hay correlación entre *Y* y *X*.

3.2.5 Diseño experimental

3.2.5.1 Diseño Experimental Arsénico Total en Suelos

Para la validación de arsénico total en suelos se usaron blancos enriquecidos para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación. Se usó un suelo que contenía poca materia orgánica suministrado por el Laboratorio Químico de Suelos. Este suelo se le hizo análisis de arsénico en sistema abierto y sistema cerrado, obteniéndose mejores resultados con el sistema cerrado el cual se comprueba su mejor eficiencia en comentarios posteriores. (ver numeral 3.2.5.1.4)

Se prepararon los blancos de suelo y blancos enriquecidos y se sometieron al proceso de digestión descrito en el numeral 2.1.2.1 y se evaluó el criterio de porcentaje de coeficiente de variación, para determinar que concentración daba respuesta diferente al blanco y que valores se ajustaban a los porcentajes de recuperación en concentraciones de rango bajo. Las concentraciones de 0,3, 0,4 y 0,5 $\mu\text{g/L}$ corresponden a los blancos enriquecidos de la muestra de suelo.

Muestra	Lectura en el equipo	%CV
	$\mu\text{g/L}$	
Blanco Suelo	0	80,23
0,3	0,04	64,1
0,4	0,14	28,6
0,5	0,45	5,3

Tabla 9. Blancos enriquecidos Suelo

En la tabla 9 se observa, que para las concentraciones de 0,3, 0,4 $\mu\text{g/L}$, el coeficiente de variación es muy alto y las muestras con esas concentraciones se comportan como blancos. La lectura del blanco enriquecido 0,5 $\mu\text{g/L}$, tiene un coeficiente de variación menor y su valor para determinar el límite de detección es más significativo.

Concentración Blancos enriquecidos 0,5 µg/L	
	0,460
	0,470
	0,505
	0,465
	0,400
Promedio	0,46
s	0,054

Tabla 10. Promedio de blanco enriquecido Suelo

3.2.5.1.1 Límite de detección y límite de Cuantificación

Con las ecuaciones 2.2 y 2.3, se calcula el límite de detección y de cuantificación respectivamente. Los datos se encuentran reportados en la tabla. Este valor de concentración debe expresarse en µg/g de suelo o su equivalente mg/kg, por eso se multiplica por 0,1L que es el volumen del aforo y se divide en el peso promedio del suelo con el que se hicieron los análisis 1g. Con este valor promedio se calculó el límite de detección y el límite de cuantificación.

X_{prom} (mg/kg)	Desviación estándar (s) (mg/kg)	CV (%)	Límite de detección del método (LDM) (mg/kg)	Límite de cuantificación del método (LCM) (mg/kg)
0,046	0,0054	12,31	0,059	0,095

Tabla 11. Límite de detección y Límite de Cuantificación.

3.2.5.1.2 Precisión del Método.

Se evaluaron concentraciones de alto y rango bajo en suelos, 0,09C y 0,9C, donde C es la concentración tope de la curva, se hicieron adicionados. Se evaluó la

precisión en términos del porcentaje del coeficiente de variación en las muestras analizadas en 6 días.

Esperado (µg/L)	Esperado (µg/g)	Valor promedio obtenido (µg/g)	Desviación estándar (s) (µg/g)	CV (%)	% Error Relativo	% Porcentaje Recup.
0,9	0,09	0,081	0,005	7,23	13,2	86,7
9,0	0,9	0,851	0,06	6,6	7,6	91,9

Tabla 12. Tabla Determinación de la Precisión.

Se observa en la tabla que los valores de bajo rango, el valor esperado tiene un coeficiente de variación mayor, esto se debe a que concentraciones pequeñas en esta matriz pueden ser cuantificadas pero con una mayor variabilidad en la medida y este valor de bajo rango están cerca al límite de cuantificación y dentro del límite de detección. Este valor de variación se encuentra dentro de los rangos establecidos como aceptables. Los valores de alto rango tienen poca variabilidad en la medición. Los porcentajes de recuperación se encuentran dentro de los valores aceptables de alto y bajo

3.2.5.1.3 Exactitud del Método

Se evaluó la exactitud del método para el análisis de arsénico total en suelos, para ello se realizó el análisis al MRC del IDEAM (2010), se reportan los resultados en la tabla.

Valor MRC (mg/Kg)	Valor promedio MRC obtenido (mg/Kg)	Desv. estándar (s) (mg/Kg)	CV (%)	% Porcentaje de Recuperación	LCS (mg/Kg)	LAS (mg/Kg)	LAI (mg/Kg)	LCI (mg/Kg)
132	122,7	5,43	4,11	86-97	137,7	132,3	110,6	105,2

Tabla 13 .Tabla Exactitud Método en Suelos

Según el certificado del material de referencia suministrado por el IDEAM, para el suelo de las pruebas del año 2010, el suelo utilizado tiene una concentración de As de 132 mg/Kg, con una desviación y unos valores límites superior e inferior de respectivamente. Podemos observar que los datos obtenidos se ajustan a estos valores y el valor de sus porcentajes de recuperación está entre los límites aceptables. La variación de estos valores pudo ser debido a la gran cantidad de metales que presentaba esta muestra, algunos elementos pueden reaccionar con el yoduro de potasio, en la etapa de la preparación de la muestra, ocasionando interferencias, pero no son significativas ya que los valores se encuentran dentro de los límites especificados.

3.2.5.1.4 Modificación del Método

Al realizar el montaje del método se encontró que para el análisis de suelos se realizó unas modificaciones al método utilizando un sistema cerrado para llevar a cabo la digestión y no el método abierto como sugería el método. Este cambio fue realizado debido a que se encontraron mejores porcentajes de recuperación en la digestión con sistema cerrado respecto al abierto, lo que permitió concluir que las pérdidas en el sistema cerrado eran mucho menores debido a que algunos compuestos que contienen arsénico son volátiles.

Tipo de digestión	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Promedio	Desviación estándar	%CV	% Error relativo	% Recup.
Cerrada	122,87	114,8	131,87	122,8	121,12	122,69	6,1	4,98	7,05	92
Abierta	55,03	47,51	67,32	50,48	56,187	55,31	7,57	13,69	58,1	41

Tabla 14. Modificación del Método para Suelos

3.2.5.2 Diseño Experimental Arsénico Total en Aguas

Para la validación de arsénico total en aguas se usaron blancos enriquecidos para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación. Se utilizaron muestras de agua natural, y se hicieron adicionados de concentraciones bajas de arsénico, y se el procedimiento realizado fue similar al estudio en suelos, se

observaron los coeficientes de variación de los blancos enriquecidos y el valor elegido fue 0,15 µg/L, ya que este valor, en la lectura, presentaba un %CV que se ajusta a los valores aceptables para rango bajo.

Muestra	Lectura en el equipo µg/L	%CV
Blanco Agua	0	>100
0,03	0	70,3
0,05	0,039	28,6
0,1	0,9	22,3
0,15	0,14	8,9

Tabla 15 . Blancos Enriquecidos para Agua

Con este valor de concentración para el blanco enriquecido se realizaron análisis por 6 días y los resultados se muestran en la tabla.

Concentración Blancos enriquecidos 0,15 µg/L	
	0,14
	0,15
	0,11
	0,13
	0,14
	0,12
Promedio	0,14
s	0,02

Tabla 16. Promedio Blanco enriquecido para Aguas

3.2.5.2.1 Límite de detección y límite de Cuantificación

Con la ecuación calculamos el límite de cuantificación y el límite de detección para el método de Arsénico total en aguas, en la tabla 16, se pueden observar los valores de estas figuras de mérito y el coeficiente de variación de las medidas.

X_{prom} ($\mu\text{g/L}$)	Desviación estándar (s) ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	Límite de detección del método (LDM) ($\mu\text{g/L}$)	Límite de cuantificación del método (LCM) ($\mu\text{g/L}$)
0,14	0,02	11,64	0,18	0,29

Tabla 17. Límite de Detección y Límite de Cuantificación para Aguas

El valor de los límites es menor que los suelos debido a las matrices y a los tratamientos de las muestras, en suelos, el tratamiento de la muestra puede ser una fuente de pérdidas, en agua la digestión es un poco menos más agresiva y la variación en concentraciones más bajas que en suelo es menor.

3.2.5.2.2 Precisión del Método

Para evaluar esta figura de mérito en aguas se analizaron los porcentajes de recuperación y los coeficientes de variación en rangos altos y bajos el rango lineal trabajado, las concentraciones de $0,9\mu\text{g/L}$ y $9\mu\text{g/L}$.

Esperado ($\mu\text{g/L}$)	Valor promedio obtenido ($\mu\text{g/L}$)	Desviación estándar (s) ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	% Error Relativo	% Porcentaje Recup.
0,9	0,82	0,050	6,09	8.16	90
9,0	8,932	0,278	3,11	2.97	99,2

Tabla 18. Precisión Método Aguas.

En la tabla se muestran los valores para el método aplicado a aguas, el porcentaje de recuperación de ambos rangos se encuentran en los niveles establecidos por el Standard Methods, y los coeficientes de variación se ajustan a los valores aceptables, hay mayor variación en los valores de rango bajo, ya que en estos valores de concentraciones bajas pueden producirse mayores pérdidas y en la lectura pueden haber errores debidos a ruidos de fondo.

3.2.5.2.3 Exactitud del Método

Para evaluar la exactitud, se evaluó en términos del porcentaje de recuperación y error relativo, se utilizó un patrón de concentración 6µg/L, el cual fue analizado con el método de aguas, los resultados se muestran en la tabla 18.

Valor de referencia (µg/L)	Valor promedio obtenido (µg/L)	Desv. Estándar (s) (µg/L)	CV (%)	%Error Relativo	LAS (µg/L)	LCS (µg/L)	LAI (µg/L)	LCI (µg/L)
6,0	6,0	0,21	3,47	1,66	6,4	6,6	5,6	5,4

Tabla 19. Exactitud Método Aguas.

Para este análisis podemos observar que los valores presentan poca variabilidad, y que el método es exacto ya que los valores se encuentran dentro de los límites de advertencia inferior y superior.

3.3. DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN SUELOS.

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

3.3.1. Pesada de las muestras.

El pesaje de las muestras aporta dos fuentes de incertidumbre, la incertidumbre dada por la división de la escala de la balanza y la incertidumbre en la calibración de la balanza.

3.3.1.1. Incertidumbre estándar en la división de la escala de la balanza.

La mínima medida registrada por la balanza, es la división de escala de la misma, la incertidumbre estándar será: División= 0.0001g $U_{a1} = 0.0001/\sqrt{3} = 0.000058$

3.3.1.2. Incertidumbre estándar en la calibración de la balanza.

El certificado de calibración de la balanza emitido por MetroCal presenta el siguiente valor de incertidumbre: $U = 2,646 \times 10^{-4} + 1,55112 \times 10^{-6} * w$ Donde w es el peso de muestra. Para la metodología se pesó alrededor de 0.0650 gramos de muestra, por tanto la incertidumbre será:

$$U = 2,646 \times 10^{-4} + 1,55112 \times 10^{-6} * (0,0117) = 0,0001513$$

$$U_{a2} = 0.0001513 / \sqrt{3} = 8,73E - 5$$

3.3.1.3. Incertidumbre combinada en la pesada de las muestras.

$$U_{ac} = \sqrt{(U1)^2 + (U2)^2} = \sqrt{(0.000058)^2 + (8,73E - 5)^2} = 0.00010$$

3.3.1.4 Incertidumbre estándar relativa para la pesada de las muestras.

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

$$U_{ERa} = U_{ac} / 0.0117 = 0.00010 / 0.0117 = 0.00894$$

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

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

3.3.2.1 Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.

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

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

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

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

$$Ub2 = 0.024 / \sqrt{10} = 0.0075$$

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

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

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

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

$$Ubc = \sqrt{(Ub1)^2 + (Ub2)^2 + (Ub3)^2} = \sqrt{(0.0462)^2 + (0.0075)^2 + (0.0577)^2} = 0.0743$$

3.3.2.5. Incertidumbre Estándar Relativa por dilución de las muestras en un balón de 100 mL.

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

$$U_{ERb} = Ubc / 100 = 0.0724 / 100 = 0.000744$$

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

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

3.3.3.1. Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.

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

$$U_{25_1} = (4 * 2E - 4 * 25) / \sqrt{3} = 0.0115$$

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

En la verificación del material volumétrico usado en la metodología, se calcula la desviación estándar y esta se divide en el número de mediciones hechas en la verificación. $Ub_2 = s / \sqrt{n}$ Donde n es el número de réplicas.

$$U_{25_2} = 0.0274 / \sqrt{10} = 0.0087$$

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

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

$$U_{25_3} = Tolerancia / \sqrt{3} = 0.04 / \sqrt{3} = 0.0231$$

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

$$U_{25c} = \sqrt{(U_{25_1})^2 + (U_{25_2})^2 + (U_{25_3})^2} = \sqrt{(0.0115)^2 + (0.0087)^2 + (0.0231)^2} = 0.02723$$

3.3.3.5. Incertidumbre Estándar Relativa por dilución de las muestras en un balón de 25 mL.

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

$$U_{25_{ER}} = U_{25c} / 25 = 0.02723 / 25 = 0.001090$$

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

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

3.3.4.1. Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.

Esta fuente de incertidumbre está dada por la ecuación $U_{1p10} = (4 * 2E - 4 * V) / \sqrt{3}$ y el volumen del material usado en este caso, la pipeta de 10 mL, se supone una distribución rectangular de los datos.

$$U_{1p10} = (4 * 2E - 7 * 10) / \sqrt{3} = 0.0081$$

3.3.4.2. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la Pipeta de 10 mL.

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

$$U_{2p10} = 0.008 / \sqrt{10} = 0.0025$$

3.3.4.3. Incertidumbre estándar por la tolerancia de la pipeta de 10mL.

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

$$U_{3p10} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0.02 / \sqrt{3} = 0.0115$$

3.3.4.4. Incertidumbre combinada por alícuota tomada por la pipeta de 10mL.

$$U_{c_{p10}} = \sqrt{(U_{1p10})^2 + (U_{2p10})^2 + (U_{3p10})^2} = \sqrt{(0.0081)^2 + (0.0025)^2 + (0.0115)^2} = 0.01431$$

3.4.4.5. Incertidumbre Estándar Relativa por alícuota tomada por la pipeta de 10mL

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre U_{c2} y el volumen de aforo (10mL).

$$U_{ERp10} = U_{c_{p10}} / 10 = 0.01431 / 100 = 0.001431$$

3.3.5 Incertidumbre Combinada del pesaje de las muestras y dilución de la digestión y preparación de las muestras.

Se tiene en cuenta la contribución de la incertidumbre estándar relativa del pesaje de las muestras, del balón de 100 mL, del balón de 25 mL y de la pipeta de 10mL.

$$U_{A_S} = \sqrt{(U_{ERa})^2 + (U_{ERb})^2 + (U_{25_{ER}})^2 + (U_{ERp10})^2} = \sqrt{(0.00894)^2 + (0.000744)^2 + (0.001090)^2 + (0.001431)^2} = 0.009158$$

3.3.6. Incertidumbre debida al primer factor de dilución (Preparación de la solución madre en la curva de calibración).

En la metodología se mencionó que para preparar los patrones de la curva de calibración primero se preparó una solución madre de 250 µg/L a partir de la Solución CERTIpur certificado de 1000 ± 10 mg/L, midiendo 250 µL del estándar y aforando a 100 mL, para el cálculo de la incertidumbre se tiene en cuenta el aporte debido a la micropipeta de 10-100 µL y al balón de 100 mL

3.3.6.1. Incertidumbre generada por la micropipeta de 10-100µL.

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

3.3.6.1.1 Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta.

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

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

3.3.6.1.2 Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.

Esta contribución se obtiene multiplicando: variación de la temperatura (4°C), el coeficiente de expansión del agua (2E-4) y el volumen del material volumétrico (10 mL) y una distribución rectangular.

$$U_{mp2} = (4 * 2E - 4 * 100) / \sqrt{3} = 0.0520$$

3.3.6.1.3 Incertidumbre estándar por la tolerancia de la micropipeta de 10-100µL.

El fabricante de la pipeta usada para la toma de la alícuota reporta un valor de tolerancia de $\pm 0.08 \mu\text{L}$ y se asume una distribución rectangular, por tanto la incertidumbre está dada por:

$$U_{mp3} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0.08 / \sqrt{3} = 0.0462$$

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

$$U_{mpc} = \sqrt{(U_{mp1})^2 + (U_{mp2})^2 + (U_{mp3})^2} = \sqrt{(0.00013)^2 + (0.00462)^2 + (0.052)^2} = 0.0695$$

3.3.6.1.5. Incertidumbre Estándar Relativa de micropipeta de 10-100µL

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre U_{c3} y el volumen de la micropipeta (10-100µL).

$$U_{mpER} = U_{mpc3} / 100 = 0.0695 / 100 = 0.000695$$

3.3.7. Incertidumbre generada por el balón de 100 mL (aforo)

Esta incertidumbre ya fue calculada en el apartado 3.4.2.5. En donde se obtuvo el valor de la incertidumbre estándar relativa. $U_{ERb} = 0.000744$

3.3.8 Incertidumbre estándar relativa del primer factor de dilución.

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

$$U_{1FD} = \sqrt{(U_{mpER})^2 + (U_{ERb})^2} = \sqrt{(0.000695)^2 + (0.000744)^2} = 0.001018$$

3.3.9 Incertidumbre debida al segundo factor de dilución (preparación de los patrones a partir de la solución madre)

Ya con la solución madre preparada se prosigue a evaluar la incertidumbre generada durante el segundo factor de dilución, en donde a partir de la solución madre se tomaron las diversas alícuotas con una micropipeta de 100-1000 μL y se aforaron en un balón de 25 mL para obtener los patrones de la concentración deseada.

3.3.9 1. Incertidumbre generada por la micropipeta de 100-1000 μL .

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

3.3.9.1.1. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la micropipeta de 100-1000 μL .

En la verificación del material volumétrico se calculó la desviación estándar de 10 mediciones de volumen de la micropipeta de 100-1000 μL , con la cual se calcula la incertidumbre estándar. Asumiendo una distribución normal de los datos.

$$U_{1mq} = s / \sqrt{n} \text{ Siendo } n \text{ el número de mediciones. } U_{1mq} = 0.2856 / \sqrt{10} = 0.0903$$

3.3.9.1.2. Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura.

Esta contribución se obtiene multiplicando: variación de la temperatura (4°C), el coeficiente de expansión del agua (2E-4) y el volumen del material volumétrico (1000 µL) y una distribución rectangular.

$$U_{2mq} = (4 * 2E - 4 * 1000) / \sqrt{3} = 0.5196$$

3.3.9.1.3. Incertidumbre estándar por la tolerancia de la micropipeta de 100-1000 µL.

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

$$U_{3mq} = Tolerancia / \sqrt{3} = 0.08 / \sqrt{3} = 0.0462$$

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

$$U_{mqC} = \sqrt{(U_{1mq})^2 + (U_{2mq})^2 + (U_{3mq})^2} = \sqrt{(0.0903)^2 + (0.5196)^2 + (0.0462)^2} = 0.5294$$

3.3.9.1.5 Incertidumbre Estándar Relativa de la micropipeta de 100-1000 µL.

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre U_{mqc} y el volumen de aforo (1000 µL).

$$U_{mqER} = U_{mqc} / 1000 = 0.5294 / 1000 = 0.0005294$$

3.3.9.2. Incertidumbre generada por el balón de 25 mL (aforo)

Esta incertidumbre ya fue calculada en el apartado 3.4.3.5. En donde se obtuvo el valor de la incertidumbre estándar relativa. $U_{25ER} = 0.001090$

3.3.10 Incertidumbre estándar relativa del segundo factor de dilución.

Se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa de la bureta de 25 mL (U_{mqR}) y la incertidumbre estándar relativa del balón de 25 mL (U_{25ER})

$$U_{2FD} = \sqrt{(U_{mqER})^2 + (U_{25ER})^2} = \sqrt{(0.0005294)^2 + (0.001090)^2} = 0.001211$$

3.3.11 Incertidumbre Estándar debida al material de referencia certificado con el cual se preparó la curva de calibración.

Esta fuente de Incertidumbre es debida a la concentración del material certificado, solución CERTIpur certificado de 1000 ± 10 mg/L de As.

Valor Nominal 1000 mg/L de As

3.3.11.1 Incertidumbre Combinada del Material de Referencia

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

$$U_{CMR} = 10$$

3.3.11.2 Incertidumbre Estándar Material de Referencia

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

$$U_{1MR} = U_{CMR} / \sqrt{3} = 10 / \sqrt{3} = 5.773$$

3.4.11.3 Incertidumbre Estándar Relativa Material de Referencia

$$U_{ERM} = U_{1MR} / 1000 = 5.773 / 1000 = 0.005773$$

3.3.12. Incertidumbre estándar debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones.

Para una ecuación de tipo $\gamma = m\alpha + b$

Despejamos la componente que corresponde a la concentración como se muestra en la ecuación.

α = Concentración de masa

γ = Respuesta del instrumento $\alpha = \frac{(\gamma - b)}{m}$

b = La ordenada al origen

m = La pendiente calculada

En la tabla 3.13 se muestra un diseño típico experimental .para la estimación de la incertidumbre, se realizó una curva de calibración con i concentraciones y j repeticiones con lo que se hace un arreglo α_i, γ_j .

Curvas de calibración					
Concentración		γ_1	γ_2	γ_j
	α_1	α_1, γ_1			
	α_2				
	⋮				
	α_i				α_i, γ_j

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

Tenemos. $m = 0.0331$ y $b = 0.0092$

Con los datos obtenidos, para la elaboración de la ecuación de la línea recta en la curva de calibración, se estimó la incertidumbre, de una concentración de masa del elemento químico a medir " α ", con base al cálculo de regresión lineal de la curva de calibración con una respuesta " γ ". Como se muestra en la ecuación.

$$U\gamma = \frac{S}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\alpha - \bar{\alpha}_{MRC})^2}{S_{xx}}}$$

U_γ	Incertidumbre del mensurado obtenida con el instrumento calibrado
S	Desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal
M	Pendiente calculada
P	El número de réplicas de la muestra en estudio
n	Número de puntos en la curva de calibración, multiplicada por el número de réplicas "i*j".
α	La concentración en estudio
$\bar{\alpha}_{MRC}$	Valor medio de las concentraciones en los patrones de la calibración
S_{xx}	Suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones

Remplazando:

$$U_{Crs} = \frac{0.0077}{0.0331} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{36} + \frac{(6 - 6.37)^2}{2.34}} = 0.1050$$

La desviación estándar residual está dada por:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (\gamma_j - (m\alpha + b))^2}{n - 2}} = 0.0077 \quad \text{Y} \quad S_{xx} = \sum_{j=1}^n (\alpha_j - \bar{\alpha})^2 = 2.34$$

Dónde:

γ_j Las j lecturas observadas

$m\alpha + b$ Las j lecturas ajustadas

α_i Las i concentraciones usadas en la curva de calibración

$\bar{\alpha}$ Concentración media en la curva de calibración

El procedimiento de ajuste por mínimos cuadrados asume que la incertidumbre de los valores de la abscisa son pequeños en comparación con los valores de la ordenada. Este procedimiento refleja la incertidumbre de los valores de absorbancia y no la incertidumbre de los estándares de calibración.

3.3.12.1. Incertidumbre estándar relativa debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones.

Se obtiene dividiendo la incertidumbre estándar debida a la curva de calibración entre el valor de concentración de la medida, (6 µg/L)

$$U_{RPER} = U_{CrS} / 6 = 0.1050 / 6 = 0.01750$$

3.3.13. Incertidumbre combinada del método.

Esta se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa debida a:

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

$$U_{C_{\text{método}}} = \sqrt{(U_{AS})^2 + (U_{EMR})^2 + (U_{1FD})^2 + (U_{2FD})^2 + (U_{CrS\text{ER}})^2} = \\ \sqrt{(0.009158)^2 + (0.0005773)^2 + (0.01018)^2 + (0.01211)^2 + (0.01750)^2} = 0.0206$$

La curva de calibración hace la mayor contribución en incertidumbre a la metodología como se muestra en la figura 3.14, la pesada de las muestras hace una contribución insignificante al cálculo de la incertidumbre de la metodología.

3.3.14. Incertidumbre expandida.

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

$$U_{exp\,met} = \pm U_{cd\,del\,método} \times K = \pm 0.0206 \times 2 = \pm 0.0413$$

3.3.15. Cálculo de la incertidumbre expandida en la concentración del analito

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

$$U = C \mu g / g \times U_{exp\,met} \quad \text{En donde C es el valor de la concentración}$$

3.3.16. Expresión del resultado

Expresión del resultado: $C \pm U \mu g/g$.

3.4. Determinación de la incertidumbre en la cuantificación de Arsénico Total en Aguas.

Se identificaron las fuentes de incertidumbre en la metodología de cuantificación de Arsénico en Aguas y se cuantificó la incertidumbre para el resultado final.

3.4.1. Medida del volumen de la muestra, aforo y preparación de la muestra.

La medida de volumen de la muestra como se mencionó en la metodología empleada para la validación, aporta una incertidumbre por el material volumétrico utilizado. En este caso la pipeta de 100 mL, su posterior aforo en un balón de 100 mL. De este aforo se toma 10mL y se llevan a un volumen final de 25 mL

3.4.1.1. Incertidumbre estándar de la Pipeta de 100mL, efecto de la temperatura

Esta fuente de incertidumbre está dada por la ecuación $U_{p100} = (4 * 2E - 4 * V) / \sqrt{3}$ y el volumen del material usado en este caso, la pipeta de 10 mL, se supone una distribución rectangular de los datos.

$$U_{1p100} = (4 * 2E - 7 * 100) / \sqrt{3} = 0.043$$

3.4.1.2. Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la Pipeta de 100 mL.

En la verificación del material volumétrico usado en la metodología, se calcula la desviación estándar y esta se divide en el número de mediciones hechas en la verificación. $U_{2p100} = s / \sqrt{n}$, Donde n es el número de réplicas.

$$U_{2p100} = 0.046 / \sqrt{10} = 0.0146$$

3.4.1.3. Incertidumbre estándar por la tolerancia de la pipeta de 100 mL.

El fabricante del balón usado para la dilución de las muestras reporta un valor de tolerancia de ± 0.08 mL y se asume una distribución rectangular, por tanto la incertidumbre está dada por:

$$U_{3p100} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0.08 / \sqrt{3} = 0.0462$$

3.4.1.4. Incertidumbre combinada por alícuota tomada por la pipeta de 100 mL.

$$U_{Cp100} = \sqrt{(U_{1p100})^2 + (U_{2p100})^2 + (U_{3p100})^2} = \sqrt{(0.0433)^2 + (0.0146)^2 + (0.0462)^2} = 0.06497$$

3.4.1.5. Incertidumbre Estándar Relativa por alícuota tomada por la pipeta de 10mL

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre U_{Cp100} y el volumen de aforo (100 mL).

$$U_{ERp100} = U_{Cp100} / 100 = 0.06497 / 100 = 0.0006497$$

3.4.2 Incertidumbre Por dilución en un balón de 100 mL.

Esta fuente de incertidumbre fue calculada en el numeral 3.4.2.5

$$U_{ERb} = U_{bc} / 100 = 0.0724 / 100 = 0.000744$$

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

Esta fuente de incertidumbre fue calculada en el numeral 3.4.3.5

$$U_{25_{ER}} = U_{25c} / 25 = 0.02723 / 25 = 0.001090$$

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

Esta fuente de incertidumbre fue calculada en el numeral 3.4.4.5

$$U_{ERp10} = U_{c_{p10}} / 10 = 0.01431 / 100 = 0.001431$$

3.4.5 Incertidumbre Combinada

Se tiene en cuenta la contribución de la incertidumbre estándar relativa de tomar la alícuota con la pipeta de 100 mL, del balón de 100 mL, del balón de 25 mL y de la pipeta de 10mL.

$$U_{A} = \sqrt{(U_{ERp100})^2 + (U_{ERb})^2 + (U_{25_{ER}})^2 + (U_{ERp10})^2} = \\ \sqrt{(0.0006497)^2 + (0.000744)^2 + (0.001090)^2 + (0.001431)^2} = 0.002014$$

3.4.6. Incertidumbre debida al primer factor de dilución (Preparación de la solución madre en la curva de calibración).

Esta fuente de incertidumbre se identificó y se calculó en el numeral 3.4.8

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

$$U_{1FD} = \sqrt{(U_{mpER})^2 + (U_{ERb})^2} = \sqrt{(0.000695)^2 + (0.000744)^2} = 0.001018$$

3.4.7 Incertidumbre debida al segundo factor de dilución (preparación de los patrones a partir de la solución madre)

Esta fuente de incertidumbre se identificó y se calculó en el numeral 3.4.10 Se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa de la bureta de 25 mL (U_{mqR}) y la incertidumbre estándar relativa del balón de 25 mL (U_{25ER})

$$U_{2FD} = \sqrt{(U_{mqER})^2 + (U_{25ER})^2} = \sqrt{(0.0005294)^2 + (0.001090)^2} = 0.001211$$

3.4.8 Incertidumbre Estándar debida al material de referencia certificado con el cual se preparó la curva de calibración.

Esta fuente de Incertidumbre es debida a la concentración del material certificado, solución CERTIpur certificado de 1000 ± 10 mg/L de As. Esta fuente de incertidumbre se calculó en el numeral 3.4.11.3

$$U_{ERM} = U_{1MR} / 1000 = 5.773 / 1000 = 0.005773$$

3.4.9. Incertidumbre estándar debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones.

El modelo del cálculo se mostró en el numeral 3.4.12

$$U_{CrA} = \frac{0,0077}{0,0331} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{36} + \frac{(6-6,1)^2}{0,40}} = 0,1146$$

$$\text{Donde } S_{xx} = \sum_{j=1}^n (\alpha_j - \bar{\alpha})^2 = 0,40 \quad \text{y} \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (\gamma_j - (m\alpha + b))^2}{n-2}} = 0.0077$$

3.4.9.1. Incertidumbre estándar relativa debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones.

Se obtiene dividiendo la incertidumbre estándar debida a la curva de calibración entre el valor de concentración de la medida, (6 µg/L)

$$U_{RPER} = U_{CrA} / 6 = 0.1146 / 6 = 0.01750$$

3.4.10. Incertidumbre combinada del método.

Esta se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa debida a:

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

$$U_{c\text{ método}} = \sqrt{(U_{AA})^2 + (U_{ERMR})^2 + (U_{1FD})^2 + (U_{2FD})^2 + (U_{CrAER})^2} = \\ \sqrt{(0.002014)^2 + (0.0005773)^2 + (0.01018)^2 + (0.01211)^2 + (0.01911)^2} = 0.0201$$

3.4.11. Incertidumbre expandida.

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

$$U_{\text{exp met}} = \pm U_{c\text{ del método}} \times K = \pm 0.0201 \times 2 = \pm 0.0402$$

3.4.12. Cálculo de la incertidumbre expandida en la concentración del analito

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

$$U = C \mu\text{g} / l \times U_{\text{exp met}} \quad \text{En donde C es el valor de la concentración}$$

3.4.13. Expresión del resultado

Expresión del resultado: $C \pm U \mu\text{g/L}$.

3.5 Cartas de Control

Se realizaron las lecturas en un periodo de 10 días, y con esas lecturas de concentración se construyó la carta de control para Suelos y agua respectivamente.

3.5.1 Carta de control para Suelos

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

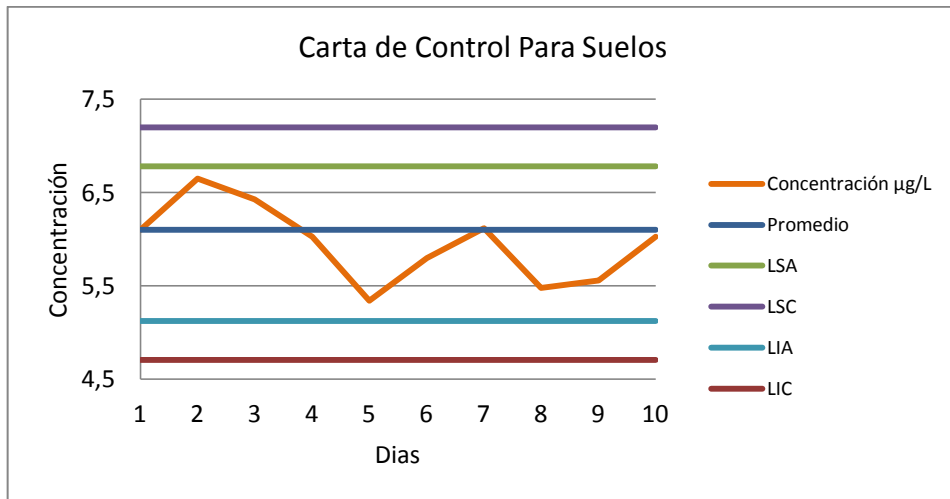


Figura 10 . Carta de Control para Suelos

3.5.2 Carta de control para Aguas

Se monitorea diariamente la concentración de un patrón de 6 $\mu\text{g/L}$. As para aguas durante intervalo de 10 días, no se presenta ninguna tendencia especial en las medidas esto muestra que la metodología no presenta errores sistemáticos y que los errores aleatorios se encuentran bajo control ya que ningún valor sobrepasa los límites de advertencia.

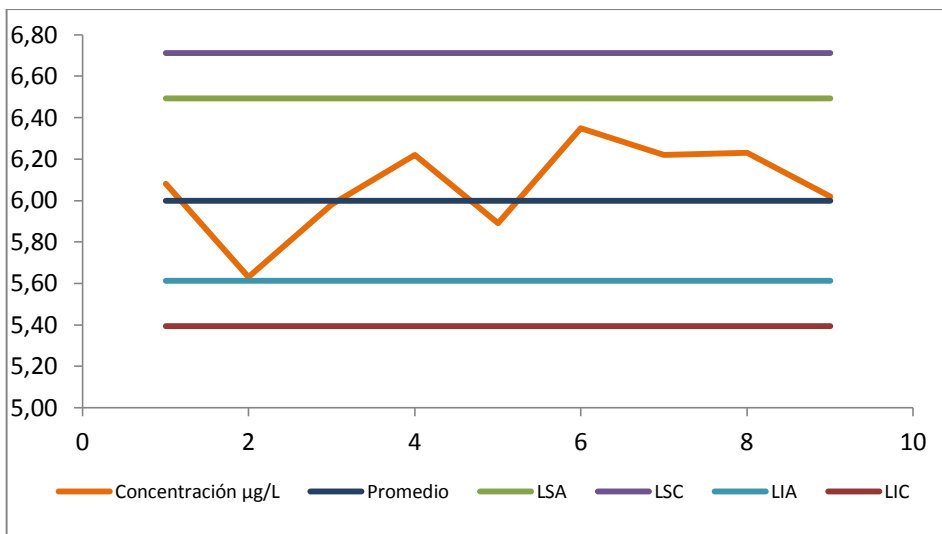


Figura 11 . Carta de Control para Aguas

CONCLUSIONES

En la aplicación del método de arsénico total en aguas se obtuvo un coeficiente de variación de 6.09 para el rango bajo y 3.11% para el rango alto. Los coeficientes de variación obtenidos no superan los criterios de aceptación del método (10% para rango alto y 20% para rango bajo), por lo cual se considera que el método validado es preciso. Los porcentajes de recuperación obtenidos en el rango bajo fueron 90% y en el rango alto 99.2%, valores que se encuentran dentro de los límites establecidos como aceptables (80-120%). Finalmente se obtuvo un error relativo del 8.16 en el rango bajo y 2.97 en el rango alto, valores que se encuentran dentro de los límites establecidos como aceptables para el método, por lo anterior se puede decir que el método es exacto. Teniendo en cuenta los resultados anteriores se encuentra que el método es apto para su uso ya que es exacto, preciso y las interferencias por matriz presentadas no son significativas.

En la aplicación del método de arsénico total en Suelos se obtuvo un coeficiente de variación de 7,23 para el rango bajo y 6.6 % para el rango alto. Los coeficientes de variación obtenidos no superan los criterios de aceptación del método (10% para rango alto y 20% para rango bajo), por lo cual se considera que el método validado es preciso. Los porcentajes de recuperación obtenidos en el rango bajo fueron 86,7 % y en el rango alto 91.9%, valores que se encuentran dentro de los límites establecidos como aceptables (80-120%). Finalmente se obtuvo un error relativo del 13.2 en el rango bajo y 7.6 en el rango alto, valores que se encuentran dentro de los límites establecidos como aceptables para el método, por lo anterior se puede decir que el método es exacto. Teniendo en cuenta los resultados anteriores se encuentra que el método es apto para su uso ya que es exacto, preciso y las interferencias por matriz presentadas no son significativas

Se mostró que los porcentajes de recuperación para las metodologías validadas son cercanos al 100 %, esto permite confiar en su exactitud, pero su rango depende del tipo de matriz que se trabaje, luego como criterio de aceptación quedó establecido que para muestras acuosas estaría entre 90% - 105% y para suelos entre 80% - 115%.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, el método analítico para determinación de As total en aguas SM 3114/3030F y para As total en suelos EPA 3050B/7020 se declara adecuado para su propósito. Por lo tanto, estas metodologías pueden ser usadas en el Laboratorio Químico de Consultas Industriales.

RECOMENDACIONES

La presencia de elementos de transición (cobre, hierro, níquel). Estas interferencias se pueden controlar con la adición de agentes enmascarantes, tales como L-cisteína.

Interferencia causada por la presencia de nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-). Esta interferencia se elimina efectivamente con la adición de úrea, la concentración final en la solución debe ser de 2%.

El peróxido residual del proceso de digestión también causa interferencia, debe usarse la mínima cantidad de peróxido proporcional al peso de muestra tomado, también esta interferencia se minimiza con calentamiento cercano a sequedad en la última etapa del proceso de digestión y posterior adición de HCl.

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

La reducción de las especies químicas como As(V) y As(IV) a As (III) debe ser efectiva en el proceso de pre-lectura con yoduro de potasio en medio ácido. Y dejar que ocurra la reacción, en un tiempo mínimo de 1.5 horas El As(V) solo da el 20% de respuesta de As(III).

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Adriano, D.: Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals: Cap. 7: Arsenic. 2a. ed., Springer-Verlag, Berlín, Alemania, 2001, págs.220-256.
- [2] Azcué, J., Nriagu,J.: Impact of abandoned mine tailings on the arsenic concentrations in Moira Lake,Ontario. J. Geochem.Exploration 52 (1995), págs.81-89
- [3] Baur, W., Onishi, b.: Arsenic. En: K.H. Wedepohl (ed): Handbook of geochemistry. Springer- verlag, berlín, Alemania, 1969, págs. 33-A-1-33-0-5.
- [4] COY, Gustavo Alfonso. Protocolo estandarización de métodos analíticos. Instituto de Hidrología y estudios ambientales. Programa de Físicoquímica ambiental. Bogotá. 1999.
- [5] HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, L y GONZÁLEZ PÉREZ, C. Introducción al Análisis Instrumental. Edit. Ariel. Enero 2002
- [6] Howard A.G.: Borohydride Techniques in Trace element Speciation. J. Anal. At. Spectrom 12 (1997), págs. 267-272.
- [7] Ildarraz Jose M. Diagnóstico clínico de HACRE por manifestaciones cutáneas en localidades de Graneros, REVISTA DE LA FACULTAD DE MEDICINA - VOL. 6 - Suplemento N° 1 (2005) pág 36
- [8] JAIMES, M. Estandarización y Validación de Algunos Parámetros Físico-Químicos en Suelos para uso Agrícola. 2005, Universidad Industrial de Santander, pp. 19-32.

- [9] J. Bundschuh, A. Pérez Carrera, M.I. Litter (eds): Distribución del arsénico en la región Ibérica e Iberoamericana, CYTED, Buenos Aires, Argentina, 2008. A
- [10] Korte, N., Fernando, Q.: A review of arsenic(III) in groundwater. *Critical Rev. Environ. Control* 21 (1991), págs. 1-39.
- [11]. MILLER, J.N. Miller, J.C. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ª ed. 2002. Pearson Prentice Hall, pp. 77-106.
- [12] Navarro, M., Sánchez, M., López, H., López, M.: Arsenic contamination levels in waters, soils, and sludges in southeast Spain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50 (1993), págs. 356-362
- [13] ORTIZ, J. Peñaranda, S. Palma, R. Pardo, D. Puentes, W. Quinto Curso-Taller, Validación de Métodos Analíticos. Programa Vigilancia de la Calidad del Agua Potable, Metales y no Metales de Interés de Salud Pública, 2007, Bogotá, pp. 9-39.
- [14] RIVAS, H. Fernandez, P. Estimación de incertidumbre para Medición de Zn por Espectrofotometría de Absorción Atómica- Flama. Simposio de Metrología 2006. México. pp. 25-27.
- [15] Sigrist M.E., Beldoménico H.R.: Determination of inorganic arsenic species by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry with variable sodium tetrahydroborate concentrations. *Spectrochim. Acta Part B: At. Spectr.* 59, págs. 1041-1045.
- [16] Smedley, P., Kinniburgh, D.: A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in

Natural waters. Appl. Geochem. 17 (2002), págs. 517–568.

[17] Sujata, Chaudhuri, Mahata Julie, Jayanta K. Das, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 601, Issues 1–2, 10 October 2006, Pages 102-112

[18]. WOLFGANG A. Schmid y Lazos Martínez, Rubén. Guía para Estimar la Incertidumbre de la Medición, Centro Nacional de Metrología - Cenam, México, Mayo de 2000.

ANEXO A

Valores de la distribución t de student para un 95 % de confianza

Gl	95%	gl	95%	gl	95%	gl	95%
1	12,71	11	2,20	21	2,08	50	2,01
2	4,30	12	2,18	22	2,07	∞	1,96
3	3,18	13	2,16	23	2,07		
4	2,78	14	2,14	24	2,06		
5	2,57	15	2,13	25	2,06		
6	2,45	16	2,12	26	2,06		
7	2,36	17	2,11	27	2,05		
8	2,31	18	2,10	28	2,05		
9	2,26	19	2,09	29	2,05		
10	2,23	20	2,09	30	2,04		

gl : grados de libertad