

**VALIDACIÓN INTERNA DE LAS METODOLOGÍAS PARA LA
DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL Y DISUELTO EN AGUAS Y
MERCURIO TOTAL EN SUELOS, POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE
ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERACIÓN DE HIDRUROS**

LUIS ENRIQUE ARDILA GUEVARA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2013

**VALIDACIÓN INTERNA DE LAS METODOLOGÍAS PARA LA
DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL Y DISUELTO EN AGUAS Y
MERCURIO TOTAL EN SUELOS, POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE
ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERACIÓN DE HIDRUROS**

LUIS ENRIQUE ARDILA GUEVARA

Tesis de grado para optar al Título de Magister en Química Ambiental

Directora

YOLANDA VARGAS FIALLO

Químico M. Sc

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN QUÍMICA AMBIENTAL

BUCARAMANGA

2013

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	16
1.1 PROPIEDADES DEL MERCURIO	16
1.2 GÉNESIS DEL MERCURIO	16
1.3 CICLO DEL MERCURIO	17
1.3.1 Formación de mercurio orgánico	17
1.3.2 Reacciones en la atmósfera	19
1.4 TOXICIDAD	19
1.5 ACCIDENTES POR MERCURIO	20
1.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE MERCURIO	21
1.6.1 Técnica de absorción atómica con generador de hidruros	23
1.7 VALIDACIÓN	25
1.7.1 Validación interna	26
1.8 INCERTIDUMBRE	28
1.8.1 Incertidumbre en las medidas analíticas “U”	28
1.9 ANALISIS ESTADISTICO	34
2. METODOLOGÍA	37
2.1 VALIDACIÓN DE METODOS	37
2.1.1 Pre- validación	37
2.1.2 Determinación de figuras de mérito	38
2.1.3 Determinación de la Incertidumbre	39
2.2 DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL EN AGUAS	39
2.2.1 Toma y preservación de muestras	39
2.2.2 Método de referencia	40
2.2.3 Digestión de la muestra	40

2.2.4 Curva de calibración	40
2.2.5 Intervalo de aplicación	40
2.2.6 Linealidad	40
2.2.7 Descripción de las muestras utilizadas en la validación	42
2.2.8 Descripción del proceso de validación	43
2.3 DETERMINACIÓN DE MERCURIO DISUELTO EN AGUAS	45
2.3.1 Digestión de la muestra	45
2.3.2 Validación	45
2.4 DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL EN SUELOS	45
2.4.1 Toma y preservación de muestras	45
2.4.2 Método de referencia	46
2.4.3 Digestión de la muestra	46
2.4.4 Curva de calibración	46
2.4.5 Intervalo de aplicación	46
2.4.6 Linealidad	46
2.4.7 Descripción de las muestras utilizadas en la validación	47
2.4.8 Descripción del proceso de Validación	47
2.4.9 Determinación de la Exactitud	47
3. RESULTADOS	48
3.1 DETERMINACION DE MERCURIO TOTAL EN AGUAS	48
3.1.1 Recuperación en aguas.	49
3.2 DETERMINACIÓN DE MERCURIO DISUELTO EN AGUAS	51
3.3 DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL EN SUELOS	52
3.3.1 Recuperación en suelos.	54
4. INCERTIDUMBRE	57
4.1. CALCULO DE INCERTIDUMBRE – ANALISIS DE MERCURIO TOTAL EN AGUAS	57
4.1.1 Cálculo de la incertidumbre combinada total:	59
4.1.2 Cálculo de la incertidumbre expandida del método	59

4.1.3 Cálculo de la incertidumbre expandida en la medición (en la concentración del analito)	60
4.1.4 Expresión del resultado final	60
4.2 CALCULO DE INCERTIDUMBRE – ANALISIS DE MERCURIO TOTAL EN SUELOS	60
4.2.1 Cálculo de la incertidumbre combinada total:	63
4.2.2 Cálculo de la incertidumbre expandida del método	64
4.2.3 Cálculo de la incertidumbre expandida en la medición (en la concentración del analito)	64
4.2.4 Expresión del resultado final	64
5. CONCLUSIONES	65
6. RECOMENDACIONES	66
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	72

LISTA DE FIGURA

	Pág.
Figura 1.Oxido-reducción catalítica bacterial	18
Figura 2. Parte del reporte del resultado de una curva de calibración.	42

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tipo de operaciones matemáticas en desviación estándar	35
Tabla 2. Reactivos, patrones y CRM utilizados en la validación del método para cuantificar mercurio en aguas y suelos.	38
Tabla 3. Lectura de blancos enriquecidos, promedio y desviación estándar	48
Tabla 4. Valores obtenidos para la determinación del Límite de Detección (LDM), Límite de Cuantificación (LCM) y Coeficiente de Variación (CV).	49
Tabla 5. Resultados de blanco, patrones, muestras y adicionadas.	50
Tabla 6. Expresión de los coeficientes de variación	50
Tabla 7. Parámetros determinados para el método mercurio en aguas.	51
Tabla 8: Resultados de blanco, patrones, muestras y adicionadas.	52
Tabla 9. Expresión de los coeficientes de variación.	52
Tabla 10. Lectura de blancos enriquecidos, promedio y desviación estándar.	53
Tabla 11. Valores obtenidos para la determinación del Límite de detección (LDM), Límite de cuantificación (LCM) y Coeficiente de variación (CV).	53
Tabla 12. Datos de blanco, patrones, muestras y adicionadas.	54
Tabla 13. Expresión de los coeficientes de variación.	54
Tabla 14. Parámetros determinados para el método mercurio en suelos.	56

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Valores de la distribución t de student para un 95 % de confianza	72
ANEXO B. Coeficiente de Variación – gráfica de Horwitz	73

RESUMEN

TITULO: VALIDACIÓN INTERNA DE LAS METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL Y DISUELTO EN AGUAS Y MERCURIO TOTAL EN SUELOS, POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERACIÓN DE HIDRUROS*.

AUTOR: LUIS ENRIQUE ARDILA GUEVARA**

PALABRAS CLAVES: Mercurio, Contaminación, Toxicidad, Validación, Incertidumbre.

DESCRIPCIÓN

La continua aparición de mercurio en la corteza terrestre debido a las emisiones volcánicas, origina una amplia presencia en todas las capas del planeta. A esto se agrega la gran acción antropogénica por la actividad industrial, la explotación minera y el uso de pesticidas mercuriales.

Siendo el mercurio el elemento más tóxico después de los elementos radiactivos, su acción sobre el organismo es muy severa. Afecta el sistema nervioso central, los principales órganos internos, el sistema inmunológico, alteración del ADN y malformaciones del feto.

La gran necesidad de valorar los niveles de mercurio en fuentes de agua y suelos expuestos a la contaminación por actividades industriales principalmente, hicieron necesaria la aplicación de una metodología aprobada oficialmente para el tratamiento de las muestras. Se utilizaron los procedimientos indicados en el Standard Methods 3112 B para aguas y la Environmental Protection Agency (EPA) 7471 A para suelos, y la utilización de una técnica analítica instrumental de alta sensibilidad para medir las concentraciones de mercurio en dichas matrices. La Espectrofotometría de Absorción Atómica con Generador de Hidruros fue la técnica utilizada.

Para dar confiabilidad al método, se hizo una validación interna del mismo en el Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander.

Para la validación interna se aplicaron las principales figuras de mérito y se calculó la incertidumbre de cada uno de los métodos validados.

En el presente trabajo se determinó mercurio total y disuelto en aguas y mercurio total en suelos. Se presentan los datos, los resultados definitivos, las conclusiones y las recomendaciones adecuadas.

* Trabajo de grado

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

ABSTRACT

TITLE: VALIDATION OF METHODOLOGIES FOR DETERMINATION OF TOTAL AND DISSOLVED MERCURY IN WATER AND TOTAL MERCURY IN SOILS BY SPECTROPHOTOMETRY OF ATOMIC ABSORPTION WITH HYDRIDE GENERATION^{*}.

AUTHOR: LUIS ENRIQUE ARDILA GUEVARA^{**}

KEYWORDS: Mercury, Contamination, Toxicity, Validation, Uncertainty.

DESCRIPTION

The continuous release of mercury in the Earth's crust due to volcanic emissions creates a strong presence in all layers of the planet. Add to this the great anthropogenic action by industrial activity, mining and use of mercurial pesticide.

As the mercury the most toxic element after radioactive elements, its action on the body is very severe. It affects the central nervous system, the major internal organs, immune system, DNA damage and birth defects.

The great need to assess mercury levels in water sources and soils exposed to contamination from industrial activities mainly necessitated the application of a methodology officially approved for treatment of the samples. We used the procedures outlined in Standard Methods 3112 B for water and the Environmental Protection Agency (EPA) 7471 A for soils, and the use of an analytical technique with highly sensitive instruments for measuring mercury concentrations in these matrices. The atomic absorption spectrophotometry with hydride generator was the technique used.

To give reliability to the methodology, we did an internal validation of the same in the Chemical Laboratory of Industrial Consulting of the Industrial University of Santander.

For the internal validation we applied the principal figures of merit and the uncertainty was calculated for each validated method.

In the present work we determined total and dissolved mercury in water, and total mercury in soils. Hereby, are presented the data, the final results, conclusions and recommendations.

^{*} Work degree

^{**} Faculty. School of Chemistry. Director: Yolanda Vargas Fiallo. Chemical M. Sc

INTRODUCCIÓN

El mercurio sigue siendo un elemento muy importante desde el punto de vista de la contaminación ambiental. Su continua aparición en la corteza terrestre por emisiones volcánicas, origina una amplia presencia por difusión en todas las capas del planeta.

La gran actividad industrial y comercial, desde la explotación minera sin un adecuado control, hasta la variada producción industrial como la quema de combustibles fósiles, producción de cemento y baterías entre otras, hace que la influencia antropogénica agrave la contaminación especialmente de forma local y en centros poblacionales.

El mercurio es un elemento que se presenta principalmente en tres formas químicas: en forma metálica o elemental volátil, en forma inorgánica especialmente divalente formando óxido y sales, y en forma orgánica especialmente como metilmercurio.

Siendo el mercurio un elemento altamente tóxico, su forma orgánica liposoluble es la más peligrosa para los seres vivos ya que se difunde por la cadena trófica hasta los seres humanos. Su acción principal la ejerce sobre el sistema nervioso, el ADN y los principales órganos del cuerpo.

Las normas internacionales establecen valores máximos permisibles muy bajos, del orden de 0,001 mg/L para agua superficial, esto hace indispensable para su determinación, la aplicación de métodos analíticos muy sensibles. Uno de dichos métodos que es el utilizado en el presente trabajo, es la Espectrofotometría de Absorción Atómica con Generador de Hidruros.

Para suelos García-Navarro (2005) reportó máximos aceptables en suelos agrícolas de los países de la unión europea, para mercurio 1.5 mg/kg.

La concentración media de mercurio para los suelos del mundo raramente excede los 4 µg/kg asociándose principalmente a suelos orgánicos (Kabata – Pendias) (2000).

Para dar confiabilidad a los resultados analíticos, es necesario validar los métodos de ensayo de acuerdo a los requisitos establecidos en la norma internacional NTC-ISO/IEC 17025 que en el apartado “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración”, en su segunda edición especifica que los laboratorios deben aplicar métodos y procedimientos apropiados para todos los ensayos o las calibraciones dentro de su alcance.

Dadas las implicaciones del mercurio mencionados anteriormente, en este trabajo se propuso como objetivo general “Validar los métodos requeridos para la determinación de *Mercurio Total y Disuelto en Aguas y Mercurio Total en Suelos*, mediante *Espectrofotometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros*, e implementarlos en el Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander, con el fin de ampliar el alcance de la acreditación con la que cuenta actualmente, y ofrecer métodos de ensayo confiables a la sociedad en general.

1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

1.1 PROPIEDADES DEL MERCURIO

El *mercurio* es un metal de transición ubicado en el Grupo II de la Tabla Periódica de los Elementos, subgrupo dos, y comparte su posición con el cadmio y el zinc.

Su número atómico es 80 y su peso atómico 200.66 u.a.m. Es el único metal líquido a temperatura ambiente y su dilatación es uniforme a cualquier temperatura. Tiene un punto de fusión de -39°C y un punto de ebullición de $356,95^{\circ}\text{C}$. Su densidad es $13,59\text{ g/cm}^3$. Se disuelve en ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrado pero es resistente a los álcalis. Se amalgama con hierro, cobalto, níquel, molibdeno y tungsteno. Por esta propiedad es utilizado en la extracción del oro con el cual también se amalgama⁵. La solubilidad es muy variable, en agua es de 50 partes por billón (ppb) y en petróleo varía de 4 a 23 ppb⁹.

1.2 GÉNESIS DEL MERCURIO

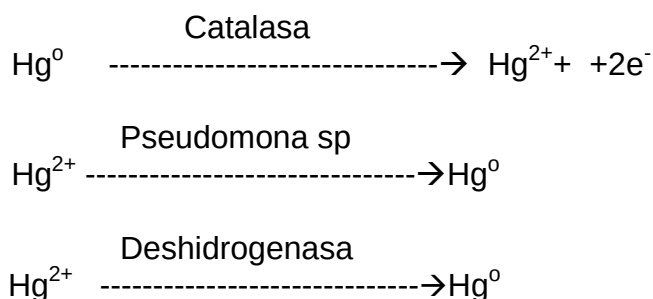
La principal fuente de mercurio es la desgasificación natural de la corteza terrestre, procedente de las erupciones volcánicas que arrojan entre 25.000 y 150.000 toneladas de mercurio por año. En la corteza terrestre el mercurio se encuentra mayormente como cinabrio, un sulfuro de mercurio (HgS) de color rojizo que puede estar asociado con otros sulfuros como la piritita (FeS_2), y como óxido de mercurio (HgO) generado en procesos posteriores de oxidación⁶. El contenido de mercurio en la corteza terrestre varía de un lugar a otro pero su promedio es de 0.05 mg/kg de roca.

1.3 CICLO DEL MERCURIO

En su ciclo, el mercurio pasa por desgasificación de los continentes a la atmósfera, y por esorrentía a los océanos. De los océanos por evaporación también pasa a la atmósfera. El mercurio de la atmósfera por acción pluvial y de los vientos, vuelve a los océanos y a los continentes. Se calcula que la cantidad de mercurio que llega a la superficie terrestre por acción pluvial es de 30.000 toneladas/ año, y su cantidad en los océanos es de 70 millones de toneladas⁷.

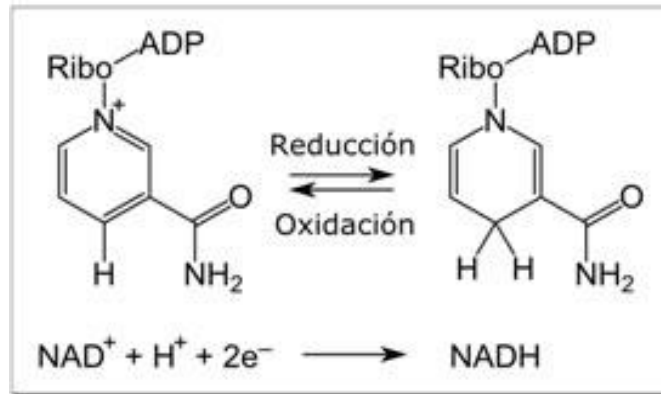
La mayoría del mercurio presente en el medio ambiente se encuentra inicialmente en su forma elemental volátil (Hg^0), pero posteriormente puede ser oxidado a su forma inorgánica (Hg^{2+}). Por acción de los microorganismos puede ser convertido a la forma orgánica como es el metilmercurio ($\text{H}_3\text{C}-\text{Hg}^+$), el cual es altamente tóxico. Este compuesto soluble en lípidos se acumula en peces y fauna marina, siendo el origen de la contaminación a través de la cadena trófica hasta los seres humanos⁸.

1.3.1 Formación de mercurio orgánico. El mecanismo de transformación del mercurio a la forma orgánica se efectúa a través de bacterias aeróbicas y anaeróbicas que utilizan diferentes enzimas como agentes catalizadores. A continuación se presentan las reacciones que se dan en presencia de bacterias aeróbicas:

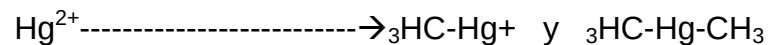


La enzima deshidrogenasa reduce el Hg^{2+} a Hg^0 y oxida el NADH a NAD^+ como se muestra en la **Figura 1**.

Figura 1. Oxido-reducción catalítica bacterial



Algunas bacterias emplean un segundo mecanismo de desintoxicación que convierte el:

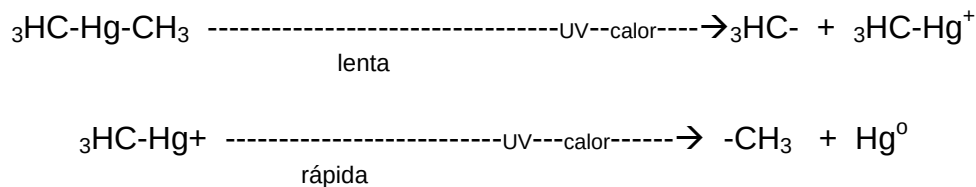


Estas formas de desintoxicación que utilizan los microorganismos para crear mercurio elemental (Hg^0), metilmercurio y dimetilmercurio, permiten remover el mercurio del medio ambiente presente en la litosfera y remitirlo a la atmósfera.

Otra forma de desintoxicación es la formación de ${}_3\text{HC-Hg}^+$ que puede ser inmovilizado en suelos y sedimentos tanto de aguas oceánicas como continentales por absorción de partículas cargadas negativamente como en la bentonita del barro.

En sedimentos se encuentra el mercurio metálico disperso debido a que se contrae en gotas esféricas por su alta tensión superficial (siete veces la del agua).

1.3.2 Reacciones en la atmósfera. El dimetilmercurio es fotolizado por la luz UV para dar Hg^0 y radicales metilo en 2 pasos: una reacción lenta y otra rápida.



Los radicales $\text{CH}_3\cdot$ pueden formar CH_4 (metano) o CH_3CH_3 (etano)

Los efectos ambientales del mercurio son considerables: además de las actividades propias del planeta, el mercurio también es una fuente de contaminación a través de la actividad antropogénica. Principalmente es liberado al *aire* por la quema de productos fósiles, fundiciones, combustión de residuos sólidos y por la minería artesanal. También es liberado al *suelo* y al *agua*, por la aplicación de fertilizantes en la agricultura y por los vertimientos de aguas residuales industriales.

Todo el mercurio que es liberado al ambiente, termina en los suelos y en las aguas superficiales. Si las aguas superficiales son ácidas con un pH entre 5 y 7, se les incrementa la concentración debido a la movilización y desplazamiento del mercurio en los suelos¹⁰.

1.4 TOXICIDAD

El mercurio tiene graves implicaciones para la salud humana. Altos niveles perjudican el cerebro, el sistema nervioso central, el corazón, los riñones, los pulmones y el sistema inmunológico. La enfermedad se llama hidrargismo, produciendo ulceraciones en las encías, ennegrecimiento de los dientes, vómito, diarrea, temblores, visión borrosa hasta la ceguera, sordera, incoordinación muscular y pérdida de la memoria con dificultad para aprender y cambios de

personalidad. También presenta reacciones alérgicas, irritación en la piel, cansancio y dolor de cabeza. Tiene efectos negativos para la reproducción, defectos de nacimiento y abortos. Daña el ADN y cromosomas induciendo el mongolismo. En los animales el daño es en los riñones, estómago, intestinos, fallas en la reproducción y alteración del ADN¹¹. Después de los elementos radiactivos, el mercurio es considerado como el elemento más tóxico.

Por consiguiente, la presencia de mercurio en el ambiente puede tener implicaciones graves por los efectos tóxicos que produce en los seres vivos.

Es importante conocer los niveles de mercurio en los componentes del ecosistema, a fin de identificar oportunamente posibles focos de contaminación y de esta forma establecer medidas para la remediación o inmovilización de este elemento.

1.5 ACCIDENTES POR MERCURIO

La historia reporta accidentes que han contaminado el ambiente por dispersión aérea principalmente como en el incendio de una mina de mercurio en Idría (Eslovenia) en 1803, que afectó a 900 personas. En 1953 una alteración neurológica poco frecuente llamada “enfermedad misteriosa” afectó a pescadores y pobladores de la Bahía de Minamata en Japón, debido al consumo de pescado y mariscos contaminados con mercurio, cuando la Chisso Corporation, empresa de fertilizantes, productos petroquímicos y plásticos vertió 81 toneladas de compuestos de mercurio desde 1932 hasta 1968. Muchos murieron y otros nacieron con lesiones cerebrales y miembros deformes¹². Varios incidentes sucedieron entre 1956 y 1960 en una zona rural de Irak, después de preparar pan con semillas de trigo que habían sido fumigadas con un fungicida órgano-mercurial. En 1971 y 1972 se repitieron estos incidentes pero con cebada tratada. Casos similares se presentaron en Paquistán en 1961 y en Guatemala en épocas

de siembras de trigo en 1963, 1964 y 1965. En Buenos Aires (Argentina) en 1980 se presentó una intoxicación masiva de bebés al usar pañales tratados con acetato de fenilmercurio para prevenir la pañalitis. En junio del año 2000 en Choropampa (Perú) se presentó un devastador derrame de mercurio en la compañía minera Yanacocha, la más grande del mundo, que afectó a más de mil pobladores que aún sufren las secuelas después de una década. Se considera el mayor desastre mundial con mercurio metálico¹³. Éste caso es un ejemplo de que a pesar de la tecnología empleada siempre hay graves riesgos latentes. En la región amazónica, ha sido frecuente la contaminación ambiental y humana especialmente por la extracción del oro en forma artesanal¹⁴. Estos reportes dan muestra de la gravedad de los accidentes de contaminación masiva que son generalmente de origen industrial.

1.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE MERCURIO

En la bibliografía se reportan algunos métodos espectrofotométricos para la determinación de mercurio a nivel micro, usando diferentes reactivos como la ditizona que con el mercurio forma ditizonato de mercurio de color naranja y cuya intensidad se cuantifica colorimétricamente a una longitud de onda de 490 nm²⁵. Este método fue escogido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) e implantado en los países latinoamericanos por la Oficina Panamericana de la Salud (OPS) de la O.E.A, en el área de Salud Ocupacional a principios de la década de los 60 del siglo XX. Su rango de lectura era del orden de ppm pero esta limitación se debía a la capacidad del equipo instrumental. Actualmente se puede detectar en niveles mayores de 2 µg/L en aguas potables²⁶.

Posteriormente se reportó otro método colorimétrico en el cual el mercurio forma un complejo púrpura violeta al reaccionar con o-carboxifenildiazoamino p-azobenceno que absorbe a 540 nm. Este método se aplicó para el análisis de muestras ambientales (aire, agua, suelo) y muestras de fungicidas²⁷.

Otras técnicas instrumentales utilizadas han sido: potenciometría, fluorimetría y cromatografía líquida²⁸.

En la década 1980-1990, la Espectroscopía de Fluorescencia Atómica con vapor frío (CV-AFS), fue la más ampliamente utilizada en estudios del ciclo biogeoquímico del mercurio²⁹. Sin embargo en matrices acuosas, es crítico el tratamiento ácido y la extracción alcalina por destilación, ya que puede presentar alteraciones cuantitativas en la especiación.

Para el análisis de Hg en sedimentos se ha utilizado el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a la Espectroscopía de Fluorescencia Atómica con vapor frío (HPLC/CV-AFS). Se reporta una eficiencia del 95%. Sin embargo, la separación de las 4 especies de mercurio es crítica, lográndose unos límites de detección de 4.3 ppb para metilmercurio, 1.4 ppb para etilmercurio, 0.8 ppb para mercurio inorgánico (Hg^{2+}), 0.8 ppb para fenilmercurio³⁰.

Cuando se quiere determinar mercurio en su forma elemental, el método más utilizado es la Espectrofotometría de Absorción Atómica con vapor frío (CV-AAE). Este método asociado al sistema de Generación de Hidruros eleva su sensibilidad, haciéndolo más adecuado para el análisis ambiental³¹. Zhang y Adeloja, 2008 (951-957) lo aplicaron para determinar mercurio en muestras de sedimentos en lagos y ríos y encontraron que la presencia de iones metálicos como Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{3+} no interfiere con la medida de mercurio por este método.

En el año 2005, Kaercher y colaboradores describieron la determinación de mercurio total por vapor frío y generación de hidruros, usando diferentes temperaturas³². El mercurio inorgánico (Hg^{2+}) se mide con la celda a temperatura ambiente y el mercurio total (Hg^0) se mide cuando la celda está a una temperatura

igual o mayor de 650°C. El límite de cuantificación obtenido por este método fue de 55 ng/ g.

Usando muestras ambientales y biológicas, Rio Segade y Tyson, midieron el mercurio inorgánico y el mercurio total usando absorción atómica con vapor frío y borohidruro de sodio como único agente reductor³³. Los autores eliminan el uso de agentes oxidantes al reducir directamente las especies con borohidruro a diferentes concentraciones según la especie. Mientras el mercurio inorgánico fue directamente reducido a mercurio elemental, el metilmercurio pudo generar un producto intermedio como el hidruro de metilmercurio (MeHgH) que se reflejó en una pequeña señal de absorbancia. El límite de detección para mercurio total varió entre 6.6 a 18 ng.g⁻¹.

En el presente trabajo se propone la utilización de la espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros, utilizando el borohidruro de sodio como agente reductor, pero previa oxidación de todas las especies de mercurio contenidas en la muestra para asegurar la recuperación óptima del mercurio.

A nivel nacional para la determinación de mercurio en aguas usando Standard Methods 3112 B y en suelos EPA 7471 A, hay laboratorios acreditados por el IDEAM, la ONAC y la Superintendencia de Industria y Comercio.

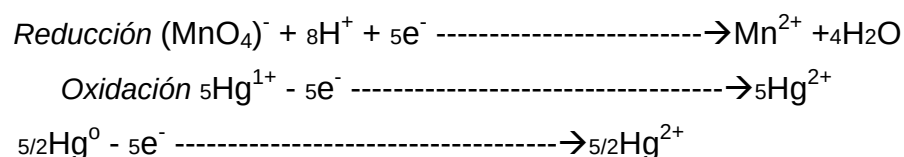
1.6.1 Técnica de absorción atómica con generador de hidruros. La *Espectrofotometría de Absorción Atómica* como técnica analítica instrumental está basada en la absorción por parte de un elemento analito, de una fracción de la energía emitida por una fuente de luz que sale de una lámpara cuyo cátodo está formado por el mismo elemento.

Hay algunos elementos que son difíciles de volatilizar en una llama o un horno. Para estos elementos se utiliza la técnica de generación de vapor, ya sea formando el hidruro metálico del elemento (As, Bi, Sb, Sn, Se y Te) o directamente vapores como en el caso del Hg^0 . La generación de vapor aumenta la sensibilidad de la técnica de absorción atómica, especialmente en estos elementos que tienen importancia como contaminantes ambientales o en toxicología. Para el análisis de mercurio, todas las especies son oxidadas a Hg^{2+} y después reducidas a mercurio elemental en el generador de hidruros, por acción del ión borohidruro en medio ácido. El vapor de mercurio es llevado por el gas de arrastre, en este caso nitrógeno, hasta una celda de cuarzo que está en el paso óptico de la radiación de la lámpara de cátodo hueco, donde absorbe energía proporcional a su concentración.

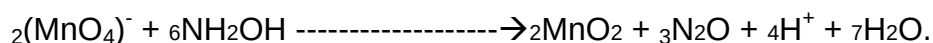
Las ventajas de este sistema se basan en que: a) separa el mercurio de su matriz química con eficiencia, eliminando así los efectos de interferencias de matriz en el proceso de atomización, disminuyendo la absorción de fondo y b) proporciona un medio más eficiente de atomización que en la absorción atómica convencional¹⁵.

A continuación se relacionan las reacciones que ocurren en cada una de etapas que se desarrollan para la determinación de mercurio utilizando el ión borohidruro en medio ácido:

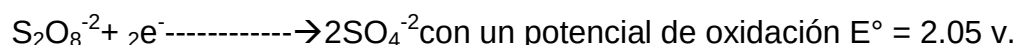
- En la digestión se utiliza permanganato de potasio para oxidar toda especie de mercurio y también para eliminar en parte los compuestos orgánicos que interfieren.



- En el proceso de oxidación, en aguas salinas, el permanganato de potasio puede oxidar el ion cloruro a cloro libre que absorbe a 253 nm, interfiriendo así con la lectura del mercurio. Este cloro libre se debe eliminar antes de reducir el mercurio. La solución reductora de hidroxilamina elimina el cloro libre, el exceso de permanganato y también disuelve el dióxido de manganeso (MnO₂) residual que se ha formado.

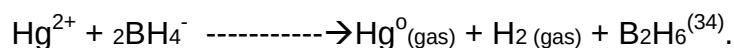


- Durante el procedimiento también se agrega persulfato de potasio para una completa y segura oxidación de la materia orgánica.



La solución de borohidruro de sodio se usa exclusivamente como agente reductor. En contacto con los ácidos el ión borohidruro libera hidrógeno.

Los mecanismos de reacción son complicados y se presentan con formación de radicales intermedios. Una forma simplificada de estos procesos de reducción es la reacción:



1.7 VALIDACIÓN

Validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización de un método, está sustentada en normas establecidas, previamente verificadas y comprobadas a través de procedimientos válidos que permiten ser utilizadas para cualquier estudio

particular¹⁶o aplicación específica prevista” (EPA NMX – CH – 152 – INTI – 2005)¹⁷.

La validación de un método analítico debe estar soportada por suficientes datos de laboratorio y una metodología bien documentada que cumpla con los requisitos establecidos en la norma internacional NTC-ISO/IEC 17025 que en “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración”, en su segunda edición especifica que los laboratorios deben aplicar métodos y procedimientos apropiados para todos los ensayos o las calibraciones dentro de su alcance.

1.7.1 Validación interna. Para la validación interna de un método se utilizan las siguientes figuras de mérito:

1.7.1.1 Límite de Detección (L.D): es la cantidad o concentración mínima de analito en una muestra, que puede ser detectada con un nivel de confianza, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es un parámetro definido a priori porque se fija antes de que se realice la medida. Con los datos de los blancos enriquecidos se determina el L.D, calculando la desviación estándar (s) y aplicando la fórmula:

$$L.D = \bar{x} + 3 s \quad \text{donde } \bar{x} \text{ es el valor promedio de las medidas.}$$

1.7.1.2 Límite de Cuantificación (L.C): es la concentración mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. Con los datos de los blancos enriquecidos se determina el L.C, calculando la desviación estándar (s) y aplicando la fórmula:

$$L.C = \bar{x} + 10 s$$

1.7.1.3 Linealidad: Es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos a diferentes concentraciones.

1.7.1.4 Sensibilidad: Mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Es la pendiente de la curva respuesta-concentración y entre más inclinada mayor sensibilidad.

1.7.1.5 Precisión: Grado de repetibilidad entre resultados de mediciones obtenidas independientemente bajo condiciones establecidas. Se determina mediante el cálculo del coeficiente de variación obtenido entre muestras naturales. Se expresa en forma porcentual como desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de varianza, ya sea como *repetibilidad* (la más pequeña precisión esperada) o *reproducibilidad* (la más grande precisión esperada).

$$\% \text{ RSD} = (s / \bar{x}) * 100$$

1.7.1.6 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).

$$\%R = (\text{cantidad experimental} / \text{cantidad real}) * 100.$$

1.7.1.7 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.

1.8 INCERTIDUMBRE

La incertidumbre es una estimación cuantitativa del error que está presente en todos los datos, y es la variación de esos resultados dentro de un rango debido a errores posibles presentes en cada paso del análisis. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en cada una de las fuentes de incertidumbre que hayan sido identificadas^{18, 19, 20, 21, 22, 23}.

1.8.1 Incertidumbre en las medidas analíticas “U”. En la búsqueda de resultados confiables, los analistas observan, 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 varían 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, variarán 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 análisis³⁸.

Es fundamental diferenciar los términos “error” e “incertidumbre”. Error es la diferencia entre el valor medido y el valor convencionalmente verdadero, del objeto que se está midiendo. Incertidumbre es la cuantificación de la duda que se tiene

sobre el resultado de la medición. Cuando sea posible, se trata de corregir los errores conocidos por ejemplo, aplicando las correcciones indicadas en los certificados de calibración. Pero cualquier error que, no se conozca su valor, es una fuente de la incertidumbre³⁵.

1.8.1.1 Fuentes de incertidumbre: 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, por ejemplo, la pesada de una muestra está influenciada por factores internos y externos que afectan el valor reportado por la balanza³⁶.

A continuación, se describe en forma detallada cada fuente de error al pesar.

- **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 siguiente ecuación:

$$W_1 = W_2 + W_2(d_{\text{aire}}/d_{\text{objeto}} - d_{\text{aire}}/d_{\text{pesa}})$$

En donde W_1 es la masa corregida del objeto, W_2 es la masa de los pesos estándar, d_{objeto} es la densidad del objeto, d_{pesa} es la densidad de los pesos y d_{aire} es la densidad del aire desplazado por ellos y tiene un valor de 0.0012 g/cm^3 (36).

- **Efectos de la temperatura**

Los intentos para pesar un objeto, cuya temperatura es diferente a 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 temperatura³⁶.

- **División de escala de la balanza**

Dependiendo del modelo de balanza usada, varía la división de la escala es decir, con cuántos decimales se obtiene el valor de pesada en una balanza determinada, 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 con la ley de propagación de errores para encontrar la incertidumbre durante la pesada de una sustancia.

- **Medición de un volumen**

La medición precisa del volumen es tan importante para muchos métodos analíticos como la medición precisa de la masa. Existen en general dos clases de material volumétrico: de llenado *in*, volumen preciso en el interior del recipiente como en el caso de matraces aforados; y de volumen *ex*, volumen preciso una vez descargado el recipiente como en el caso de pipetas. El fabricante del material reporta las condiciones bajo las cuales se calibró el material y la tolerancia de la medida³⁶.

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

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

$$F_T = \pm (V \cdot \Delta T \cdot Z)$$

donde F_T es el factor de temperatura, V es el volumen medido, ΔT la diferencia entre la temperatura de calibración y la experimental y Z el factor de compresibilidad del agua³⁶.

- **Incertidumbre generada durante una dilución**

El factor de dilución normalmente se emplea cuando se miden elementos químicos en muestras de concentración de masa (mg/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 siguiente ecuación:

$$F_{dn} = V_2/V_1$$

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 (UFd_n), se realiza combinando las incertidumbres de ambas mediciones: volumen de la alícuota de muestra y volumen de aforo, de forma relativa y cuadrática, de acuerdo con la ecuación³⁶:

$$UFd_n/Fd_n = (UV_1/V_1)^2 + (UV_2/V_2)^2$$

Muchas metodologías necesitan la elaboración de una curva de calibración para la cuantificación del analito de interés, ésta 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 (φ) y la propiedad medida (γ). Dicha relación en la mayoría de las ocasiones es lineal y se describe mediante la siguiente ecuación:

$$\gamma = m\varphi + b$$

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 calibración³⁶.

1.8.1.2 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. (Incertidumbre Tipo A)

b) usando información disponible: certificados de calibración, tolerancias del material volumétrico, manuales de instrumentos, etc. (Incertidumbre 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 3 el intervalo proporcionado por el fabricante (con lo que se supone que el intervalo de confianza sigue una distribución rectangular)³⁷.

1.8.1.3 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 ⁽³⁹⁾. 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 verdadero³⁵.

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

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

1.9 ANALISIS ESTADISTICO

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

- **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.

- **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, tienen un signo y afectan por igual a todos los datos de un conjunto. Existen tres tipos de errores sistemáticos: 1) los que se deben al instrumento de medida, ya sea porque tiene pequeños defectos o por inestabilidad de sus componentes; 2) los errores del método que surgen del comportamiento químico o físico no ideal de los sistemas analíticos; 3) los errores personales que se deben al mal manejo del analista por falta de precaución o experiencia.

- **Propagación de errores en los cálculos aritméticos**

Con frecuencia es necesario estimar la desviación estándar de un resultado calculado a partir de dos o más datos experimentales, donde cada uno tiene una desviación estándar conocida. Como se muestra en la **Tabla 1**, la forma de hacer estos estimados depende del tipo de operaciones aritméticas empleadas.

Tabla 1. Tipo de operaciones matemáticas en desviación estándar

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	$y = \text{antilog}_{10} a$	$\frac{S_y}{y} = 2.303 S_a$

- **El contraste t para datos emparejados**

Para comparar dos métodos de análisis por medio del estudio de muestras que contienen, de manera sustancial, diferentes cantidades de analito, se observa la diferencia d, entre cada par de resultados obtenidos por los dos métodos.

Si no existen diferencias entre los dos métodos, estas diferencias se obtienen de una población con media $\mu_d = 0$. Para probar la hipótesis nula, se prueba si d difiere significativamente de cero utilizando el estadístico t ⁽³⁵⁾.

- **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 VALIDACIÓN DE METODOS

2.1.1 Pre- validación. La pre-validación como etapa preliminar es un pre-requisito que permite obtener información relevante para orientar el procedimiento para la validación.

Primero se elaboró una lista de reactivos y materiales de referencia, se hizo una revisión de la ficha técnica de los productos y los certificados de los patrones de referencia. Se verificaron los equipos, su estado y mantenimiento; igualmente el material volumétrico y el material de vidrio. Posteriormente, se determinaron cuáles son las soluciones testigo, estándares o patrones y las muestras naturales y adicionadas.

– Verificación de reactivos y patrones

Los reactivos, patrones y material de referencia certificado (CRM) necesarios para la validación, se identificaron con el fin de conocer la fecha de vencimiento, precauciones de manejo, pureza, cantidad y conservación del reactivo puro o en solución. La **Tabla 2** muestra este registro.

- Verificación de equipos

A los equipos utilizados se les hizo previamente un mantenimiento preventivo y la calibración correspondiente para garantizar las condiciones óptimas de funcionamiento.

La balanza fue sometida a procedimientos de calibración desarrollados por la empresa MC & Co (Bogotá, Colombia), laboratorio acreditado y autorizado para realizar calibración de balanzas, la cual expidió el certificado de calibración.

Tabla 2. Reactivos, patrones y CRM utilizados en la validación del método para cuantificar mercurio en aguas y suelos.

Reactivos/patrones/CRM	Especificaciones	Procedencia
Ácido sulfúrico	Sigma-Aldrich. Lot. 90120	Alemania
Ácido nítrico	Merck. Lot. K40442456	Alemania
Ácido Clorhídrico	Merck. Lot. K43212717	Alemania
Permanganato de potasio	J.T. Baker Lot. 7404-1	EE. UU.
Persulfato de potasio	Merck Lot. K40707991	Alemania
Clorhidrato de hidroxilamina	Carlo Erba. Lot. 455474	Italia
Borohidruro de sodio	Merck. Lot. S6177973	Alemania
Hidróxido de sodio	Merck. Lot. B0693098	Alemania
CRM Patrón de mercurio	Certi PUR Merck 126985	Alemania

Las medidas de absorbancia se realizaron en un *Espectrofotómetro de Absorción Atómica Agilent 240 FS*, y las reacciones para producir mercurio como vapor frío, se llevaron a cabo en el *Generador de Hidruros Agilent VGA 77*. Estos equipos fueron revisados y calibrados por la empresa Agilent (México).

- Verificación del material volumétrico

Se verificó el material volumétrico necesario para el desarrollo de la metodología. Se identificó el material aforado como balones, de volumen *in*. De volumen *ex* solo se utilizaron pipetas no aforadas ya que la medición de volúmenes para la preparación de las curvas de calibración, patrones y patrones adicionados, se realizaron con *micropipetas* de medidas en microlitros (μL).

2.1.2 Determinación de figuras de mérito. En la parte experimental se establecieron las siguientes figuras de mérito:

- Límite de detección del método
- Límite de cuantificación

- Rango dinámico de trabajo
- Linealidad
- Sensibilidad
- Recuperación
- Precisión
- Exactitud

2.1.3 Determinación de la Incertidumbre. La incertidumbre se calcula según lo establecido en la norma guía *Eurachem 2012*. Esta norma establece la necesidad de estimar la incertidumbre de ensayo y también las incertidumbres asociadas a las calibraciones internas, y se representa por el diagrama de causa y efecto.

Se calculan todas las fuentes individuales de incertidumbre y se combinan de acuerdo a la ley de propagación de errores, para obtener la incertidumbre estándar combinada U_c . Este valor se multiplica por un factor de cobertura k que normalmente es igual a 2 que indica la *incertidumbre expandida* U , que acompaña los resultados analíticos. De esta forma se obtiene un intervalo donde existe un 95% de probabilidad de que se encuentre el valor verdadero.

2.2 DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL EN AGUAS

2.2.1 Toma y preservación de muestras. Se tomaron muestras representativas de 200 ml de agua en recipientes de vidrio, las cuales se acidificaron hasta $\text{pH} \leq 2$ con ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, para preservarlas y refrigerarlas para un almacenamiento máximo de 28 días. Las muestras que tenían sólidos sedimentables se homogenizaron para que las fracciones tomadas para el análisis fueran representativas.

2.2.2 Método de referencia. El procedimiento para la determinación de mercurio total en muestras de agua se realizó siguiendo el método establecido en el Standard Methods 3112 B, 21st Edition 2005.

2.2.3 Digestión de la muestra. La muestra de agua con el analito, debidamente diluida según el caso, se trató con H_2SO_4 conc. y HNO_3 conc., luego se agitó y se agregó solución de KMnO_4 hasta coloración permanente. Después se añadió $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ y se calentó en baño maría por 2 horas. Se dejó enfriar y luego se adicionó $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ para eliminar el exceso de KMnO_4 y para finalizar se completó al volumen adecuado de acuerdo con la dilución previamente establecida. (NOTA: Si se observa algún precipitado se debe filtrar la solución para evitar interferencias por sólidos en suspensión).

2.2.4 Curva de calibración. La curva de calibración se preparó a partir de la solución Stock certificada de 1000 mg/L de Hg, estandarizada por Merck Germany, Chart/Lot HC 126985 de 2011. De esta solución se preparó una solución estándar de 1 mg/L de Hg en medio ácido al 10%. A partir de esta solución se prepararon los puntos de la curva, agregando con micropipeta alícuotas de 75, 150, 250, 375 y 500 μL a los respectivos balones de 25 ml que contenían ácido de modo que al aforar con agua destilada, la solución final quedara al 10% de ácido. Así se obtuvieron los patrones de 3, 6, 10, 15, y 20 $\mu\text{g/L}$. Se preparó un blanco con agua destilada al 10% en ácido. La curva de calibración fue leída cada vez que se analizaron muestras.

2.2.5 Intervalo de aplicación. El intervalo de aplicación del procedimiento para el cual se realizó la validación fue desde el blanco hasta 20 $\mu\text{g/L}$ Hg.

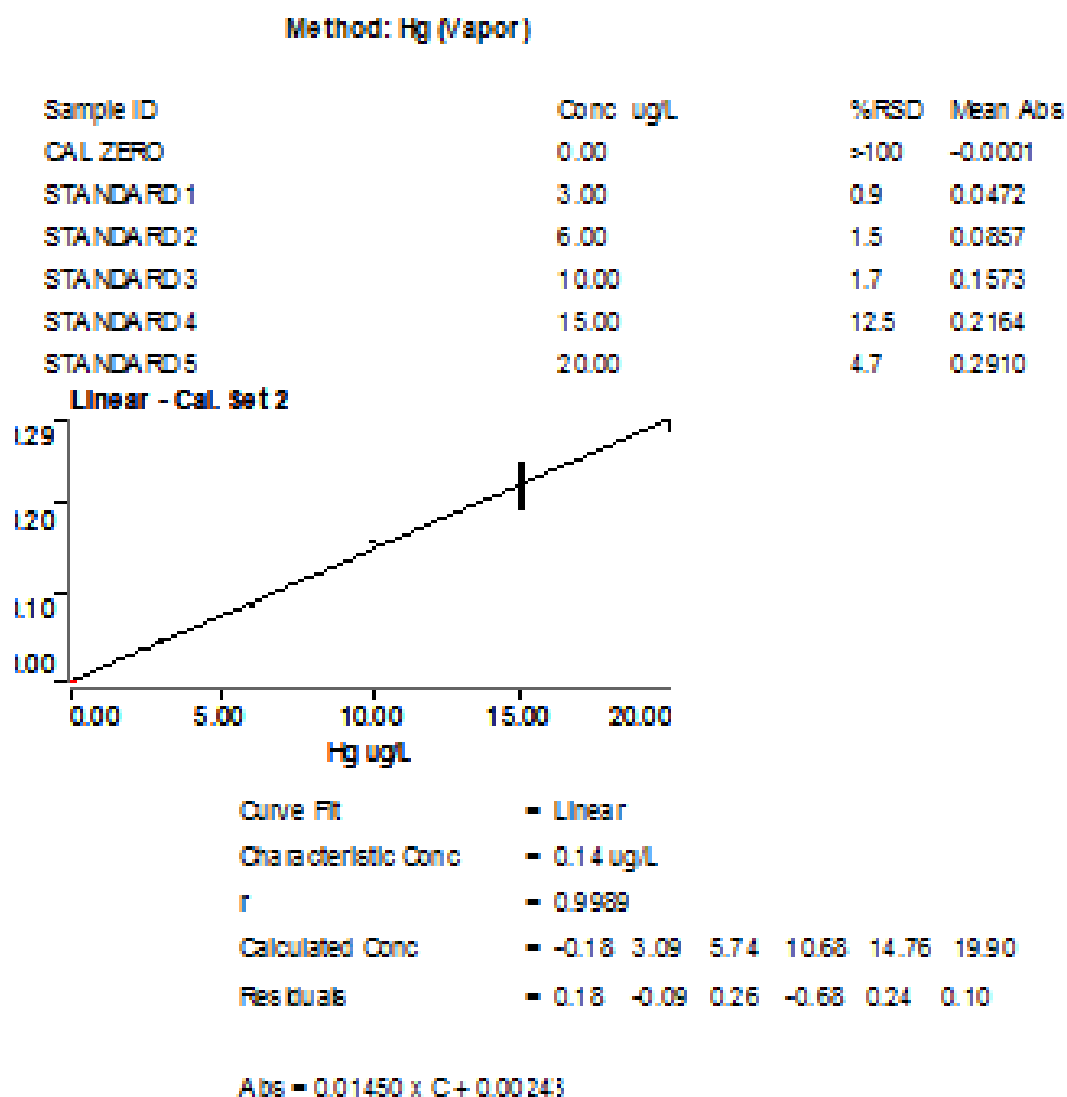
2.2.6 Linealidad. Se realizó la prueba de t de *student* a la recta de mínimos cuadrados para comprobar la linealidad de la curva dentro del rango de validación. Fue necesario utilizar una prueba estadística adecuada para ver si el coeficiente

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:

$$t_{cal} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

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 A. 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. Como ejemplo se observa la **Figura 2**.

Figura 2. Parte del reporte del resultado de una curva de calibración.



2.2.7 Descripción de las muestras utilizadas en la validación

- **Blancos:** Se prepararon blancos con agua destilada fresca al 10% en ácido. Esta solución se mantuvo refrigerada a una temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ durante todo el periodo de la validación, de ella se tomaron diariamente las alícuotas para el análisis respectivo.

- **Muestras naturales:** Las muestras naturales utilizadas durante la validación se codificaron como **Muestra M1A y M2A** (rango bajo y alto de mercurio): El volumen de muestra de agua recolectado fue de 1 litro, la muestra fue preservada con ácido hasta pH < 2. Las muestras de agua recolectadas se mantuvieron refrigeradas a una temperatura promedio de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante todo el periodo de la validación; de ellas se tomaron diariamente las alícuotas requeridas para el análisis.
- **Patrones preparados en el laboratorio:** Los patrones utilizados durante la validación fueron preparados en el laboratorio a partir de la solución estándar de 1 mg/L: **Patrón P1A:** Patrón de rango bajo (4 µg/L Hg, para aguas) y **Patrón P2A:** Patrón de rango alto (12 µg/L Hg, para aguas).
- **Muestras adicionadas:** En el laboratorio se prepararon las siguientes muestras adicionadas: **Muestra adicionada M1A + A1:** 249 mL de la muestra M1 más 1 mL de la solución estándar de 1 mg/L Hg, y **Muestra adicionada M2A + A2:** 249 mL de la muestra M2 más 1 mL solución estándar de 1 mg/L Hg.

2.2.8 Descripción del proceso de validación. Para la validación del método analítico todos los patrones se prepararon el primer día, se almacenaron en botellas vidrio color ámbar previamente enjuagadas con las respectivas soluciones y se mantuvieron refrigeradas.

Para complementar el proceso de validación, se realizaron las siguientes actividades preliminares:

- a) **Determinación de los rangos de validación:** Para establecer estos rangos se realizó una revisión de los resultados históricos obtenidos para muestras analizadas en el laboratorio. En esta revisión se consideraron las diluciones más

frecuentes y las muestras que se analizaron directamente. Además se consideraron las recomendaciones propuestas en trabajos de validación realizados por otras entidades (nacionales e internacionales) y en el rango de concentraciones recomendada por el método de referencia.

b) Se verifico el porcentaje de recuperación:

Es necesario demostrar que el promedio de recuperación **R**, no difiere significativamente (con un nivel de probabilidad de 0.05) del 95-105 % de la recuperación esperada **d**.

La recuperación promedio **R** es aceptable sí $0.95 \leq R/d \leq 1.05$

La recuperación también es aceptable si:

$$R = 0.95 d - s \times t_{m-1}/(m)^{1/2} \quad (\text{para } R/d < 0.95)$$

$$R = 1.05 d + s \times t_{m-1}/(m)^{1/2} \quad (\text{para } R/d > 1.05)$$

Donde:

t_{m-1} es la t estadística de doble cola (bilateral) a un nivel de probabilidad de 0.10 y $m - 1$ grados de libertad. Aquí m (número de lotes) = 12 y $t_{m-1} = 2.20$

El cálculo de la recuperación del adicionado en las muestras 1 y 2 se realiza usando el esquema estadístico propuesto de doble cola (bilateral), como se indica:

$$d = v(SM - U) / \sqrt{v + V}$$

Dónde:

GMC = U = Promedio aritmético de los resultados de la muestra sin adicionar

SM = Concentración de la solución madre del patrón a adicionar

v = Volumen de SM para el adicionado

V = Volumen de muestra para el adicionado

2.2.9 Determinación de la Exactitud. Se utilizó un patrón de 4 µg/L.

2.3 DETERMINACIÓN DE MERCURIO DISUELTO EN AGUAS

Los análisis se hicieron en las mismas muestras de agua recolectadas para la determinación de mercurio 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.

2.3.1 Digestión de la muestra. Para el análisis de mercurio disuelto fue necesaria una filtración previa de la muestra colectada y sin acidificar. Se tomó un filtro de membrana con porosidad de 0.45 µm y se colocó en el equipo de filtración al vacío previamente lavado como se indicó anteriormente. El filtro se lavó con agua desmineralizada antes de su uso. Se filtró un volumen de 500 ml de la muestra sin acidificar. Al filtrado se agregó HNO_{3conc.} hasta pH 2. Se siguió con el mismo tratamiento descrito para determinar mercurio total en aguas.

2.3.2 Validación. Aunque la validación de mercurio en agua filtrada se da prácticamente igual, aquí solo se introduce un factor (filtración) en el tratamiento de la muestra previamente a la digestión, sin embargo, se le hizo un manejo de datos separado para corroborar el procedimiento.

2.4 DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL EN SUELOS

2.4.1 Toma y preservación de muestras. Se tomaron muestras de 1 Kilo, se homogenizaron para tener una buena representatividad y se empacaron al vacío para preservarlas.

2.4.2 Método de referencia. El procedimiento para la determinación de mercurio total en muestras de suelo se realizó siguiendo el método establecido en el Environmental Protection Agency [SW 846, On-line]. Method 7471A: Atomic absorption spectroscopy. United States, 2007.[Revision 2]. Available from internet: URL: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/7471b.pdf>

2.4.3 Digestión de la muestra. La muestra de suelo se trató con agua regia, se agitó y se agregó solución de KMnO_4 hasta que permaneció el color púrpura durante 15 minutos, luego se adicionó persulfato de potasio y se calentó en baño maría. Se dejó enfriar y se agregó $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ para eliminar el exceso de KMnO_4 . Se esperaron 30 segundos hasta que el exceso de permanganato desapareció y luego se filtró. Se completó a volumen y pasamos la muestra al generador de hidruros donde reaccionó con el NaBH_4 y HCl para liberar el Hg^0 que fue arrastrado por el gas nitrógeno a la celda donde fue leído por el espectrofotómetro de absorción atómica, a 253.7 nm de longitud de onda.

2.4.4 Curva de calibración. La curva de calibración se preparó a partir del Certipur de 1000 mg/L de Hg, estandarizada por Merck Germany, Chart/Lot HC 126985 de 2011, siguiendo el mismo procedimiento utilizado en la determinación de mercurio en aguas.

2.4.5 Intervalo de aplicación. El intervalo de aplicación del procedimiento para el cual se realizó la validación fue desde el blanco hasta 5000 $\mu\text{g/Kg}$ Hg para suelos.

2.4.6 Linealidad. En este caso se utilizó el mismo procedimiento descrito en el apartado 2.2.6.

2.4.7 Descripción de las muestras utilizadas en la validación

- **Blancos:** Se prepararon blancos siguiendo el mismo procedimiento de las muestras de aguas para observar el efecto matriz.
- **Muestras naturales:** Las muestras naturales utilizadas durante la validación fueron las siguientes:
 - **Muestra M1S:** Muestra de suelo con cantidad de mercurio analizada durante un período de dos meses para tener determinada su concentración y que estuviese en un rango bajo.
 - **Muestra M2S:** Muestra de suelo con cantidad de mercurio analizada durante un período de dos meses para tener determinada su concentración y que estuviera en un rango alto.
- **Patrones preparados en el laboratorio:**
 - **Patrón P1S:** Estándar de rango bajo 180 µg/Kg Hg, para suelos.
 - **Patrón P2S:** Estándar de rango alto 4000 µg/Kg Hg, para suelos.
- **Muestras adicionadas:** En el laboratorio se prepararon las siguientes muestras adicionadas:
 - **Muestra adicionada M1S + A1:** A M1S se le adicionaron 500µg/Kg.
 - **Muestra adicionada M2S + A2:** A M2S se le adicionaron 500µg/Kg.

2.4.8 Descripción del proceso de Validación. Se realizó de tal como está descrito en el numeral 2.2.8.

2.4.9 Determinación de la Exactitud. Se utilizó como *Muestra de Referencia* un suelo proveniente de las pruebas interlaboratorios del Ideam cuyo valor oscila alrededor de 4,75 mg Hg/Kg, con límites inferior y superior iguales a 3,56 y 5,76 mg/kg. Este material se sometió al tratamiento realizado en el laboratorio.

3. RESULTADOS

3.1 DETERMINACION DE MERCURIO TOTAL EN AGUAS

En la Tabla 3 se muestran los datos correspondientes a los blancos enriquecidos y en la Tabla 4, los datos experimentales obtenidos en la determinación de los límites de detección y cuantificación del método, como también el coeficiente de variación

Tabla 3. Lectura de blancos enriquecidos, promedio y desviación estándar

Nº BLANCO	CONCENTRACION µg/L
1	0,27
2	0,24
3	0,20
4	0,25
5	0,30
6	0,21
7	0,27
9	0,20
10	0,25
11	0,30
12	0,21
Promedio	0,245
s	0,036

Tabla 4. Valores obtenidos para la determinación del Límite de Detección (LDM), Límite de Cuantificación (LCM) y Coeficiente de Variación (CV).

Lote N°	Unidades	Resultado1	Resultado 2
1	µg/L	0,27	0,24
2	µg/L	0,20	0,25
3	µg/L	0,30	0,21
4	µg/L	0,27	0,24
5	µg/L	0,20	0,25
6	µg/L	0,30	0,21

Parámetros	Datos
Concentración promedio(µg/L)	0,245
s	0,036
LDM	0,35
LCM	0,58
CV	14

3.1.1 Recuperación en aguas.

Rango bajo:

$$C_{\text{exp}} M_1 + A_1 = 6,9 \text{ µg/L}$$

$$C_{\text{exo}} M_1 = 3,1 \text{ µg/L}$$

$$A_1 = 3,8 \text{ µg/L}$$

$$d_1 = 3,98 \text{ µg/L}$$

Rango alto:

$$C_{\text{exp.}} M_2 + A_2 = 16,7 \text{ µg/L}$$

$$C_{\text{exp.}} M_2 = 12,8 \text{ µg/L}$$

$$A_2 = 3,9 \text{ µg/L}$$

$$d_2 = 3,94 \text{ µg/L}$$

De acuerdo a las anteriores ecuaciones el porcentaje de exactitud para los adicionados fue de: $R/d1 = 0,95$ y $R/d2 = 0,98$ que equivalen a una recuperación del 95,48% y 98,95% respectivamente.

Con respecto a la exactitud se obtuvieron valores de 4.25% para bajas concentraciones de mercurio y de 2.5% para altas concentraciones.

Para el Coeficiente de Variación, la Gráfica de Horwitz⁴⁰ muestra la variación de los valores medios con respecto a la concentración (ver Anexo B). En la Tabla 5, se presentan los resultados de blancos, patrones y muestras para calcular finalmente los coeficientes de variación que se relacionan en la Tabla 6.

Tabla 5. Resultados de blanco, patrones, muestras y adicionadas.

N°	Muestra	L1		L2		L3		L4		L5		L6	
1	BK 1	0,27	0,24	0,2	0,25	0,3	0,21	0,27	0,24	0,2	0,25	0,3	0,21
2	Patrón P1	3,97	4,31	3,8	3,52	3,92	4,01	3,75	4,06	3,96	2,97	3,83	3,85
3	Patrón P2	11,63	13,3	11,05	13,5	11,5	11,2	11,31	11,2	11,4	11,8	11,6	11,2
4	Muestra M1	3,68	2,4	3,17	3	3,44	3,2	2,26	3,2	3,52	2,5	3,48	3,4
5	Muestra M2	13,3	12,77	12,15	12,16	15,04	15,85	13,52	11,27	11,5	11,63	12,39	12,32
6	M1 + A1	7,38	8,41	6,66	6,70	6,3	6,57	6,05	7	7,01	6	7,39	6,65
7	M2 + A2	20,2	15,1	16,13	15,51	15,04	15,85	13,43	15,14	20,66	18,08	19,97	15,31

Tabla 6. Expresión de los coeficientes de variación

Muestra	N° Datos	Promedio	Desviación estándar S	CV (%)
BK 1	12	0,245	0,04	16,3
Patrón P 1	12	3,83	0,33	8,6
Patrón P 2	12	11,7	0,82	7
Muestra M1	12	3,1	0,5	16,1
Muestra M2	12	12,8	1,4	10,9
Muestra M1+A1	12	6,9	0,66	9,6
Muestra M2+A2	12	16,7	2,4	14,4

Finalmente, en la Tabla 7 se presenta un resumen de los parámetros determinados para el método de mercurio en aguas y los valores obtenidos.

Tabla 7. Parámetros determinados para el método mercurio en aguas.

Parámetros		Valor
Límite de detección		0,35 µg/L Hg
Límite de cuantificación		0,58 µg/L Hg
Coeficiente de variación		16,3 %
Límites para carta de control Estándar = 4 µg/L Hg CV = 8,6 %	Límite Superior de Control o Acción LSC	4,82 µg/L Hg
	Límite Superior de Alarma LSA	4,49 µg/L Hg
	Límite Inferior de Alarma LIA	3,17 µg/L Hg
	Límite Inferior de Control o Acción LIC	2,84 µg/L Hg
Recuperación	Recuperación	95-98%
Precisión	Desviación estándar/	0,035
Exactitud	Error relativo (%)	4,25 – 2.5%

Con base en lo anterior se establece que el método del Standard Methods 3112 B, 21st Edition 2005 es aplicable en el laboratorio de Consultas Industriales según los resultados de validación mostrados; el porcentaje de recuperación (%R) se encuentra dentro de los límites establecidos como criterio de aceptación (90 % a 110 %), esto indica que el método tiene un alto grado de exactitud y las interferencias se minimizan.

3.2 DETERMINACIÓN DE MERCURIO DISUELTO EN AGUAS

Los análisis se hicieron en las mismas muestras de agua recolectadas para la determinación de mercurio total pero sometidas a un proceso de filtración, por tanto las verificaciones, protocolo, intervalo de aplicación, método de referencia y demás factores son los mismos; sin embargo, se le hizo un manejo de datos para corroborar el procedimiento.

En la Tabla 8 se reproducen los resultados de blancos, patrones y muestras para calcular finalmente los coeficientes de variación que se muestran en la Tabla 9.

Tabla 8: Resultados de blanco, patrones, muestras y adicionadas.

N°	Muestra	L1		L2		L3		L4		L5		L6	
1	BK 1	0,27	0,24	0,2	0,25	0,3	0,21	0,27	0,24	0,2	0,25	0,3	0,21
2	Patrón P1	3,97	4,31	3,8	3,52	3,92	4,01	3,75	4,06	3,96	2,97	3,83	3,85
3	Patrón P2	11,63	13,3	11,05	13,5	11,5	11,2	11,31	11,2	11,39	11,8	11,6	11,2
4	Muestra M1	2,24	2,3	2,55	3	2,28	2,4	2,28	2,3	2,35	2,4	2,34	2,4
5	Muestra M2	10,58	11,12	11,22	11,25	11,1	11,36	10,95	11,09	11,47	11,52	11,4	11,28
6	M1 + A1	5,21	5,35	5,29	5,34	5,35	5,43	5,52	5	5,21	5	5,36	5,47
7	M2 + A2	16,27	16,5	14,87	15,05	16,52	16,09	15,11	15,43	16,78	16,00	16,1	15,90

Tabla 9. Expresión de los coeficientes de variación.

Muestra	N° Datos	Promedio	Desviación estándar S	CV (%)
BK 1	12	0,245	0,04	16,3
Patrón 1	12	3,83	0,33	8,6
Patrón 2	12	11,7	0,82	7,0
Muestra M1 _F	12	2,4	0,21	8,7
Muestra M2 _F	12	11,2	0,26	2,3
Muestra M1 _F +A1	12	5,3	0,17	3,2
Muestra M2 _F +A2	12	15,9	0,63	4,0

3.3 DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL EN SUELOS

En la Tabla 10 se muestran los datos correspondientes a los blancos enriquecidos y en la Tabla 11, los obtenidos en la determinación de los límites de detección y cuantificación del método, como también el coeficiente de variación.

Tabla 10. Lectura de blancos enriquecidos, promedio y desviación estándar.

Nº BLANCO	CONCENTRACION (µg/kg)
1	9,4
2	10,3
3	9,5
4	9,7
5	10,7
6	9,1
7	11,5
8	9,3
9	10,6
10	9,7
11	10,5
12	11,3
Promedio	10,133
s	0,798

Tabla 11. Valores obtenidos para la determinación del Límite de detección (LDM), Límite de cuantificación (LCM) y Coeficiente de variación (CV).

Parámetros	Datos
Concentración promedio (µg/Kg)	10,13
s	0,80
LDM (µg/Kg)	12,5
LCM (µg/Kg)	18,11
%CV	7,87

Tabla 12. Datos de blanco, patrones, muestras y adicionadas.

Muestra	L1		L2		L3		L4		L5		L6	
BK 1	9,4	10,3	9,5	9,7	10,7	9,1	11,5	9,3	10,6	9,7	10,5	11,3
Patrón P1S	178	174	195	189	200	191	170	192	167	171	195	174
Patrón P2S	3906	3820	4346	3945	3977	4129	3918	4036	4060	3756	4036	3760
Muestra M1S	180	207	216	178	210	200	178	190	208	219	189	183
Muestra M2S	3003	2820	3169	3221	3214	2830	2710	2843	3082	2670	2953	3239
M1S + A1	663,3	617	609,8	612,2	682	624,3	637	651,3	676,4	655,4	610,9	676
M2S + A2	3595,2	3520	3390	3640,5	3395	3412,1	3392	3475	3767,6	3483	3375,8	3597

Tabla 13. Expresión de los coeficientes de variación.

Muestra	Nº Datos	Promedio	Desviación estándar (s)	CV (%)
Muestra M1S	12	196,50	15,26	7,77
Muestra M2 S	12	2.979,50	205,20	6,89
BK 1	12	10,13	0,80	7,87
M1S+A1	12	642,97	27,80	4,32
M2 S+A2	12	3.503,60	123,92	3,54
Patrón P1S	12	183,00	11,73	6,41
Patrón P2S	12	3.981,25	203,93	5,12

3.3.1 Recuperación en suelos.

Rango bajo:

$$C_{\text{exp}} M_{1S} + A_1 = 642,97 \mu\text{g/kg}$$

$$C_{\text{exo}} M_{1S} = 196,5 \mu\text{g/kg}$$

$$A_1 = 500 \mu\text{g/kg}$$

Rango alto:

$$C_{\text{exp. M}_{2\text{S}}} + A_2 = 3503,60 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

$$C_{\text{exp. M}_{2\text{S}}} = 2979,50 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

$$A_2 = 500 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

De acuerdo a estos datos, los porcentajes de recuperación son del 89,29% y 104,82% respectivamente.

Para la exactitud se obtuvo de lectura un valor experimental de 4.64 mg/kg para un patrón de 4.75 mg/kg lo que da un valor de 2.31%.

Finalmente, en la Tabla 13 se presentan los resultados obtenidos para cada una de las variables evaluadas.

Los parámetros del método fueron obtenidos con base en las siguientes condiciones:

- El límite de detección determinado para el método es de 12,527 $\mu\text{g/Kg}$ Hg, valor adecuado para el tipo de muestras que se analizan en el laboratorio.
- El límite de cuantificación determinado para el método es de 18,114 $\mu\text{g/Kg}$ Hg, valor adecuado para el tipo de muestras que se analizan en el laboratorio y que corresponden al cumplimiento del Protocolo de Louisiana 29B, que es el que regula el contenido de ciertos metales en el suelo.

Tabla 14. Parámetros determinados para el método mercurio en suelos.

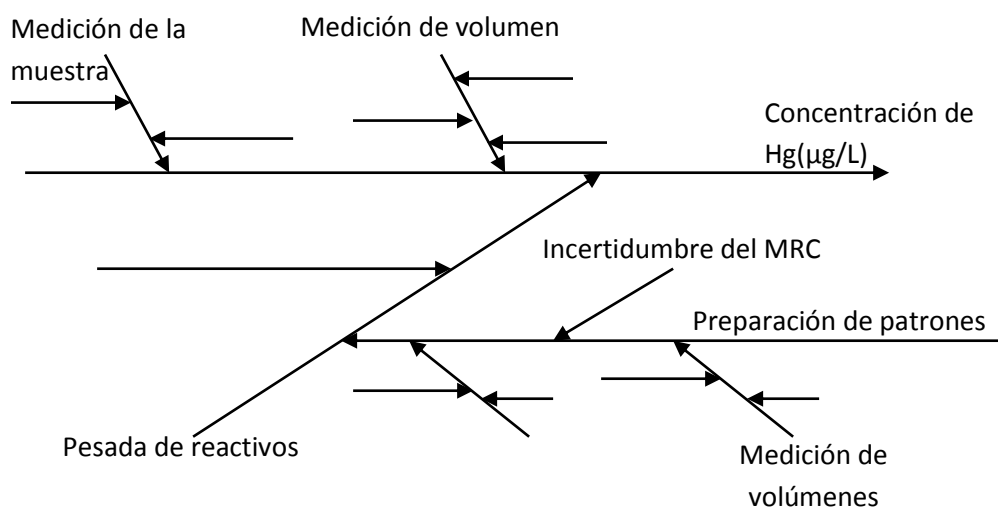
Parámetros		Valor
Límite de detección		12,5 µg/Kg Hg
Límite de cuantificación		18,1 µg/Kg Hg
Coeficiente de variación		7,87 %
Límites para carta de control Estándar = 180µg/Kg Hg CV = 13,8 %	Límite Superior de Control LCS	257 µg/Kg Hg
	Límite Superior de Advertencia LAS	231µg/Kg Hg
	Límite Inferior de Advertencia LAI	129µg/Kg Hg
	Límite Inferior de Control LCI	104µg/Kg Hg
Recuperación	Recuperación	89,29-104,
Precisión	Desviación estándar	0,798
Exactitud	Error relativo (%)	2,31%

- El rango de porcentaje de recuperación de muestras adicionadas para el método analítico se encuentra dentro de los límites establecidos como criterio de aceptación (85 % a 115 %), esto indica que el método tiene un alto grado de exactitud y puede eliminar las interferencias.
- La precisión y la exactitud determinadas para el método analítico en las condiciones del laboratorio están dentro de los límites establecidos en el Sistema de Gestión de Calidad.
- Se establece la carta de control para el método de acuerdo con las especificaciones de los límites establecidos en la conclusión del método.

4. INCERTIDUMBRE

4.1. CALCULO DE INCERTIDUMBRE – ANALISIS DE MERCURIO TOTAL EN AGUAS

- Fuentes de Incertidumbre para análisis de mercurio en aguas



Pesada de reactivos.
❖ Error máximo en la medición entregado por la Balanza.
❖ Incertidumbre en la calibración de la balanza.
❖ División escala de la balanza.
Medición de volumen de reactivos
❖ Tolerancia material volumétrico usado
❖ División D de la escala de medición
❖ Efecto de la diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura de calibración del material volumétrico utilizado para titular
❖ Dispersión de las mediciones volumétricas (Verificación del material volumétrico utilizado en la titulación)
Medición de volúmenes de los patrones
❖ Tolerancia material volumétrico empleado para titular.
❖ Efecto de la diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura de calibración del material volumétrico utilizado para titular

- **Determinación de Incertidumbre en el método de análisis de mercurio en aguas**

Fuente de Incertidumbre	Obtención del valor numérico
PESADA DE REACTIVOS	
Error máximo en la medición entregado por la balanza. Con base en calibración externa trazable al Sistema Internacional de Medidas. En el certificado de calibración emitido por MetroLabor reporta como error máximo $E = 0.001$ g la incertidumbre estándar se calcula así:	$U1 = E / (3)^{1/2}$, $U1 = 0.001 \text{ g} / \sqrt{3} = 5.7 \cdot 10^{-4}$
Incertidumbre en la calibración Incertidumbre μ declarada en el certificado de calibración la incertidumbre estándar se calcula así:	$U2 = \mu / (3)^{1/2} = 0.00012 / \sqrt{3} = 0.000069$
División de escala de aparato la división de escala de la balanza $D = 0.0001$ g la incertidumbre estándar se calcula así:	$U3 = [D] / (3)^{1/2} = 0.0001 / \sqrt{3} = 0.000057$
Incertidumbre combinada pesada. se combinan todas la anteriores Incertidumbre estándar, se calcula así:	$Uc \text{ 1 (pesada)} = [(u1)^2 + (u2)^2 + (u3)^2]^{1/2}$
Incertidumbre Estándar Relativa en el pesada IER 1 () = $Uc \text{ 1} / x$ Donde x es el peso así:	$\frac{[(5.7 \cdot 10^{-4})^2 + (0.000069)^2 + (0.000057)^2]^{1/2}}{0.00057} =$
	IER1 = $Uc1/x = 0.00057/5 \text{ g} = 0.000114$
Medición de volumen de reactivos	
Tolerancia material volumétrico usado esta tolerancia se obtiene del valor T especificado en el material volumétrico: $T = \pm 0.015$	$0.015 / \sqrt{3} = 0.0086$
División D de la escala de medición División D de la escala = 0.05 Incertidumbre estándar	$0.05 / \sqrt{3} = 0.028$
Efecto de la diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura de calibración del material volumétrico	$(5 \cdot 2 \cdot 2 \cdot 10^{-4}) / \sqrt{3} = 0.00115$

utilizado para titular Se obtiene esta contribución a partir una variación estimada en la temperatura de $X=5^{\circ}\text{C}$, del coeficiente de expansión de volumen para el agua $2 \cdot 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ Incertidumbre estándar	
Incertidumbre combinada para el volumen	$U_{c2} = ((0.0086)^2 + (0.028)^2 + (0.00115)^2)^{1/2}$ $= 0.0293$
Incertidumbre Estándar Relativa para el Volumen $IER\ 2 = U_{c\ 2} / x$ Donde x es el volumen del material volumétrico utilizado	$IER\ 2 = 0.0293/2 = 0.0146$
Medición de volúmenes de los patrones	
❖ Tolerancia material volumétrico usado	$1,6 \cdot 10^{-4} / \sqrt{3} = 0,0001$
❖ Efecto de la diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura de calibración del material volumétrico utilizado para titular	$(5 \cdot 0,1 \cdot 2 \cdot 10^{-4}) / \sqrt{3} = 0.0001$
Incertidumbre combinada para el volumen	$U_{c3} = ((0.0001)^2 + (0.0001)^2)^{1/2}$ $= 0,000141$
Incertidumbre Estándar Relativa $IER\ 3 = U_{c\ 3} / x$ Donde x es el volumen del material volumétrico utilizado	$IRE3 = 0,000141/0,1 = 0,00141$

4.1.1 Cálculo de la incertidumbre combinada total:

$$U_{c\text{total}} = [(IER\ 1)^2 (IER\ 2)^2 (IER\ 3)^2]^{1/2}$$

$$U_{c\text{total}} = [(0,000114)^2 (0,0146)^2 (0,00141)^2]^{1/2}$$

$$U_{c\text{total}} = 0,0146$$

4.1.2 Cálculo de la incertidumbre expandida del método

$$U_{\text{expmét}} = \pm 2 * U_{c\text{total}} = 2 \cdot 0.0146 = 0.0292$$

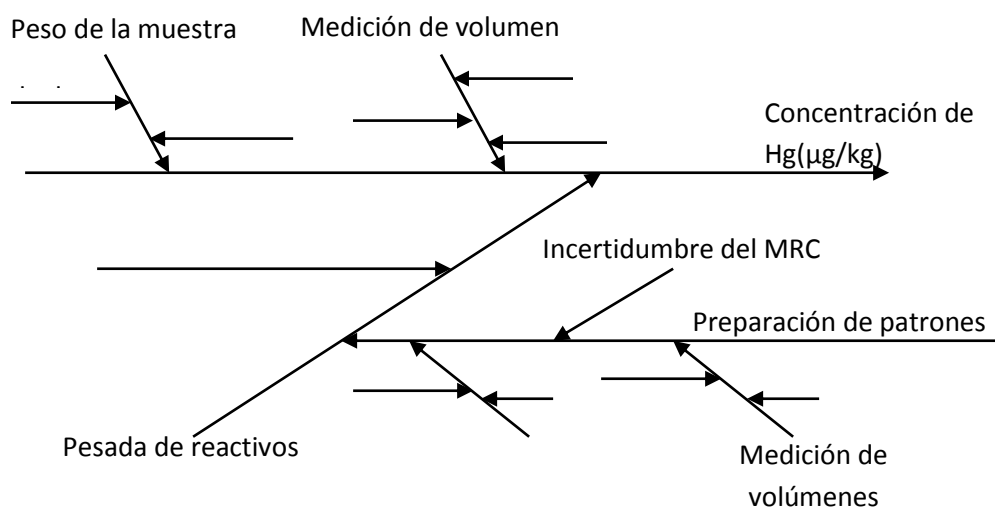
4.1.3 Cálculo de la incertidumbre expandida en la medición (en la concentración del analito)

$U = C \mu\text{g/L} * U_{\text{expmét}}$, en donde C es el valor de la medición.

4.1.4 Expresión del resultado final. Expresión del resultado: $C \pm U \mu\text{g/L}$, donde C es el valor de la concentración obtenida.

4.2 CALCULO DE INCERTIDUMBRE – ANALISIS DE MERCURIO TOTAL EN SUELOS

- Fuentes de Incertidumbre para análisis de mercurio en suelos



PESADA DE MUESTRAS
❖ Error máximo en la medición entregado por la Balanza.
❖ Incertidumbre en la calibración de la balanza.
❖ División escala de al balanza.
PESADA DE REACTIVOS.
❖ Error máximo en la medición entregado por la Balanza.
❖ Incertidumbre en la calibración de la balanza.
❖ División escala de la balanza.
❖ Dispersión de las mediciones de peso
Medición de volumen de reactivos
❖ Tolerancia material volumétrico (bureta).
❖ División D de la escala de medición (bureta)
❖ Efecto de la diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura de calibración del material volumétrico utilizado para titular
❖ Dispersión de las mediciones volumétricas (Verificación del material volumétrico utilizado en la titulación)
Medición de volúmenes de los patrones
❖ Tolerancia material volumétrico.
❖ Efecto de la diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura de calibración del material volumétrico utilizado para titular

- **Determinación de Incertidumbre en el método de análisis de mercurio en suelos**

Fuente de Incertidumbre	Obtención del valor numérico
Incertidumbre pesada de la muestra	
Error máximo en la medición entregado por la balanza. Con base en calibración externa trazable al Sistema Internacional de Medidas. En el certificado de calibración emitido por MetroLabor reporta como error máximo $E = 0.001$ g la incertidumbre estándar se calcula así:	$U1 = E / (3)^{1/2}, U1 = 0.001g / \sqrt{3} = 5.7 \cdot 10^{-4}$
Incertidumbre en la calibración Incertidumbre μ declarada en el certificado de calibración la incertidumbre estándar se calcula así:	$U2 = \mu / (3)^{1/2} = 0.00012 / \sqrt{3} = 0.000069$

División de escala de aparato la división de escala de la balanza D=0.0001g la incertidumbre estándar se calcula así:	$U3 = [D] / (3)^{1/2} = 0.0001 / \sqrt{3} = 0.000057$
Incertidumbre combinada pesada. se combinan todas la anteriores Incertidumbre estándar, se calcula así:	$Uc\ 1\ (pesada) = [(u1)^2 + (u2)^2 + (u3)^2]^{1/2}$
Incertidumbre Estándar Relativa en la pesada IER 1 () = Uc 1 / Donde x es el peso así:	$\frac{[5.7 \cdot 10^{-4}]^2 + (0.000069)^2 + (0.000057)^2}{0.00057} =$
	IER1= Uc1/x = 0.00057/ 2g= 0.000285
PESADA DE REACTIVOS	
Error máximo en la medición entregado por la balanza. Con base en calibración externa trazable al Sistema Internacional de Medidas con un error máximo E =0.001 g la incertidumbre estándar se calcula así:	$U1 = E / (3)^{1/2}, U1=0.001g / \sqrt{3} = 5.7 \cdot 10^{-4}$
Incertidumbre en la calibración Incertidumbre μ declarada en el certificado de calibración la incertidumbre estándar se calcula así:	$U2 = \mu / (3)^{1/2} = 0.00012 / \sqrt{3} = 0.000069$
División de escala de aparato la división de escala de la balanza D=0.0001g la incertidumbre estándar se calcula así:	$U3 = [D] / (3)^{1/2} = 0.0001 / \sqrt{3} = 0.000057$
Incertidumbre combinada pesada. se combinan todas la anteriores Incertidumbre estándar, se calcula así:	$Uc\ 1\ (pesada) = [(u1)^2 + (u2)^2 + (u3)^2]^{1/2}$
Incertidumbre Estándar Relativa en el pesada IER 1 () = Uc 1 / x Donde x es el peso así:	$\frac{[5.7 \cdot 10^{-4}]^2 + (0.000069)^2 + (0.000057)^2}{0.00057} =$
	IER2= Uc1/x = 0.00057/ 5g= 0.000114
Medición de volumen de reactivos	
Tolerancia material volumétrico usado esta tolerancia se obtiene del valor T especificado en el material volumétrico: T =+/-0.015	$0.015 / \sqrt{3} = 0.0086$

División D de la escala de medición División D de la escala = 0.05 Incertidumbre estándar	$0.05 / \sqrt{3} = 0.028$
Efecto de la diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura de calibración del material volumétrico utilizado para titular Se obtiene esta contribución a partir una variación estimada en la temperatura de $X=5^{\circ}\text{C}$, del coeficiente de expansión de volumen para el agua $2 \cdot 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ Incertidumbre estándar	$(5 \cdot 2 \cdot 10^{-4}) / \sqrt{3} = 0.00115$
Incertidumbre combinada para el volumen	$Uc2 = ((0.0086)^2 + (0.028)^2 + (0.00115)^2)^{1/2}$ $= 0.0293$
Incertidumbre Estándar Relativa para el Volumen $IER\ 2 = Uc\ 2 / x$ Donde x es el volumen del material volumétrico utilizado	$IER\ 3 = 0.0293/2 = 0.0146$
Medición de volúmenes de los patrones	
❖ Tolerancia material volumétrico usado	$1.6 \cdot 10^{-4} / \sqrt{3} = 0,0001$
❖ Efecto de la diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura de calibración del material volumétrico utilizado para titular	$(5 \cdot 0,1 \cdot 2 \cdot 10^{-4}) / \sqrt{3} = 0.0001$
Incertidumbre combinada para el volumen	$Uc3 = ((0.0001)^2 + (0.0001)^2)^{1/2}$ $= 0,000141$
Incertidumbre Estándar Relativa $IER\ 3 = Uc\ 3 / x$ Donde x es el volumen del material volumétrico utilizado	$IRE4 = 0,000141/0,1 = 0,00141$

4.2.1 Cálculo de la incertidumbre combinada total:

$$U_{C\text{total}} = [(IER\ 1)^2 (IER\ 2)^2 (IER\ 3)^2 + (IER\ 4)^2]^{1/2}$$

$$U_{C\text{total}} = [(0,000285)^2 + (0,000114)^2 + (0,0146)^2 + (0,00141)^2]^{1/2}$$

$$U_{C\text{total}} = 0,0147$$

4.2.2 Cálculo de la incertidumbre expandida del método

$$U_{\text{expmét}} = \pm 2 * U_{C_{\text{total}}} = 2 * 0.0147 = 0.0294$$

4.2.3 Cálculo de la incertidumbre expandida en la medición (en la concentración del analito)

$U = C \text{ } \mu\text{g/L} * U_{\text{expmét}}$, en donde C es el valor de la medición.

4.2.4 Expresión del resultado final. Expresión del resultado: $C \pm U \text{ } \mu\text{g/Kg}$, donde C es el valor de la concentración obtenida.

5. CONCLUSIONES

- La validación interna permitió cuantificar y evaluar experimentalmente las figuras de mérito que dan confianza a los métodos analíticos. El límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, sensibilidad, precisión, exactitud, porcentaje de recuperación e incertidumbre, permitieron demostrar que las metodologías aplicadas pueden ser usadas por el Laboratorio Químico de Consultas Industriales.
- Las metodologías validadas poseen porcentajes de coeficiente de variación adecuados logrando clasificar a las técnicas como precisas para los fines previstos.
- Se observó que los porcentajes de coeficientes de variación de las medidas aumentan significativamente al disminuir la concentración, esto indica que las muestras de baja concentración están sujetas a un mayor error en la cuantificación que las muestras de alta concentración.
- 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%.
- Con base en lo anterior se establece que el procedimiento del Standard Methods 3112 B para aguas y el procedimiento EPA 7471 A para suelos, son aplicables en el Laboratorio Químico de Consultas Industriales, según los resultados de validación mostrados.

6. RECOMENDACIONES

Durante todo el procedimiento es importante tener en cuenta:

- Un adecuado manejo de las muestras, con un buen sistema de almacenaje y toma cuidadosa de porciones o volúmenes para evitar cualquier tipo de contaminación.
- Verificar que el agua destilada esté libre de contaminación con mercurio.
- Tomar en cuenta el tiempo de preservación de las soluciones preparadas.
- Trabajar cuando la lámpara de mercurio en el espectrofotómetro de absorción atómica emita una buena señal y sensibilidad, medidas con un patrón fijo.
- Las ratas de flujo en el generador de hidruros deben mantenerse constantes durante todo el tiempo de lectura, para obtener resultados semejantes. En este trabajo se mantuvo un flujo de 1 ml/min de borohidruro, 1 ml/min de ácido clorhídrico y 6.5 ml/min de muestra. En esa proporción reaccionaron en la cámara del generador para liberar el mercurio elemental.
- Un cuidadoso manejo de datos, permite llevar un historial para mantener un control periódico del método.

Se sugiere hacer una comparación entre los métodos con Generador de hidruros y con Pirolizador con Efecto Zeeman para determinar mejores porcentajes de recuperación y minimizar efectos de matriz y residuos al final del análisis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrometry using the MHS Mercury/Hydride System. Perkin-Elmer, September 1987.
2. BOUCIO, L., SOUZA, V y ALBORES, A. Cadmium and Mercury Toxicity in a human fetal hepatic cell line. Toxicology. vol. 102, Issue 3, September 18, 1995. p. 285-299.
3. BRANCHES, F.J, et al. The Price of Gold: Mercury Exposure in the Amazonian Rain Forest. Clinical Toxicology 31 (2), 1993. p. 295-306.
4. BROWN, S.M., ELKINS-TANTON, L.T. Composition of Mercury's earliest crust from magma ocean models. Massachusetts Institute of Technology. Dep. Earth, Atmospheric and Planetary Sciences, Building, 54-823.
5. CHAPPLE, G. The Determination of Arsenic, Selenium and Mercury levels in U.S. EPA quality control samples using the GBC HG 3000 continues flow hydride generator GBC AA. Aplication no. 17, 1990. Australia.
6. Consultores, C.A. Incertidumbre de la medición: Teoría y Práctica. 2004 Bogotá D:C.
7. COY, G.A. Protocolo Estandarización de Métodos Analíticos. Instituto de Hidrología, Metrología y Estudios Ambientales (IDEAM), 1999.
8. Determinación del nivel de Mercurio en Aguas y Soluciones Ácidas. Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI). Hilo INTI no. 3, Marzo 2005.

9. DOADRIO VILLAREJO, A.L. Ecotoxicología y Acción Toxicológica del Mercurio. Anal. Real Academia Nacional de Farmacia. Vol. 70, 2004. p. 933-959.
10. ELLISON, S. L. Quantifying Uncertainty in analytical chemistry. 2000. U.S.A, Eurochem/Citac.
11. Evaluación Mundial sobre el Mercurio. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Diciembre, 2005. p. 96-107.
12. FITZGERALD, W.F y LAMBORGE, H. Geochemistry of Mercury in the Environment Treatise on Geochemistry. vol. 9. 2007. p. 1-47.
13. GSIS, Mary B y ANSARI, Best. Environmental Chemistry – Treatise on Geochemistry. Reference work Award (2004).
14. Guía para la Validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el Laboratorio Clínico. Centro Nacional de Metrología (CENAM), México. Abril de 2008.
15. HENAO, L.E. Estandarización de un método espectrofotométrico. Instituto de Hidrología, Metrología y Estudios Ambientales. Bogotá D.C, 1999.
16. HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, L y GONZÁLEZ PÉREZ, C. Introducción al Análisis Instrumental. Edit. Ariel. Enero 2002.
17. JINXIANG, Li y YONGMING, Liu y TIEZHENG, L. Determination of Lead by hydride generation atomic absorption spectrometry: Part1. A new medium for generating hydride. Analytica Chimica Acta, vol. 23. 1990. p. 745-748.

18. KAERCHER, L.E., GOLDSCHMIDT, F y GOTTFRIED, Paniz. Universidad Federal de Santa María, Brasil. Determination of inorganic and total mercury by vapor generation atomic absorption spectrometry using different temperatures of the measurement cell. *Spectrochimica Acta Part B* 60 (2005). p. 705 -710.
19. KUDO, Akira y MIYAHARA, Shojiro. Mercury dispersion from Minamata Bay to the Yatsushiro Sea. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 8, Issue 6, December 1984. p. 507-510.
20. MARGETÍNOVÁ, J., et al., Speciation Analysis of Mercury in Sediments and river water samples by HPLC/CV-AFS. *Analytica Chimica Acta*. vol. 615, Issue 2, (2008). P. 115 – 123.
21. MAROTO SÁNCHEZ, A. Incertidumbre en Métodos Analíticos de Rutina. Tesis Doctoral, Tarragona 2002. Fac. Química, Universitat Rovira, Virgili.
22. MAROTO, A. Estrategias para el cálculo de la incertidumbre. Universitat Rovira i Virgili Tarragona, España. 2001.
23. MARTINE, L., et al., Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *Trend in Analytical Chemistry*. vol. 24, Issue 5. May (2005), p. 383-393.
24. MENDOZA, F. CAROLINA, L. ¿Cómo interpretar la validación de una técnica Analítica?. Química, Universidad Nacional de Colombia. 2005.
25. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales, p. 134. APHA-AWWA-WPCF. En: Standard Methods for the Examination of Water and wastewater. 17 Edition, 1989.

26. MILLAN, R., CARPENA, R.O y SCHMIDT, T. Rehabilitación de Suelos contaminados con Mercurio. *Ecosistemas* 16, (2), Mayo 2007. p. 56-66.
27. OLIVERO, Verbel J y JHONSON RESTREPO, B. El Lado Gris de la Minería del Oro. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Cartagena. 2002. ISBN: 958-33-3885-0.
28. Requerimientos sobre Validación de métodos en el marco de la Acreditación de Laboratorios según la Norma ISO 17025. Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) (2005).
29. RIMALDI, V., GRAY, J.E., Y COSTAGLIOLA, P. Concentration, distribution and traslation of mercury and methylmercury in mine-waste, sediment, soil, water and fish, collected in mercury mine Monte Amista, Italy. *Science of the Total Environmental*. vol. 414. January 2012. p. 318-327.
30. RIO SEGADE, S., TYSON, J.F., Determination of inorganic mercury and total mercury in biological and environmental samples by flow-injection cold vapor-atomic absorption spectrometry using sodium borohydride as the sole reducing agent. *Spectrochimica Acta Part B* 58 (2003). p. 797 – 807.
31. RIU, J., BOQUE, R y Maroto, A. Exactitud y trazabilidad. Universitat Rovira i Virgili Tarragona, España. 2001.
32. RODRÍGUEZ, R., OLDECOP, L y LINARES, R. Los grandes desastres medioambientales producidos por la actividad minero-metalúrgica a nivel mundial: causas y consecuencias ecológicas y sociales. *Revista del Instituto de Investigaciones FIGMMG*, vol. 12, no. 24, 2009. p. 7-25 UNMSM.

33. SÁNCHEZ RODRIGUEZ, L.E. Comparación de dos Métodos de determinación de Mercurio Total en Cabello por Espectroscopías de Absorción Atómica con Generador de Hidruros y Diferencial de Efecto Zeeman con Piroizador. Maestría en Toxicología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2009.
34. SANDELL, E.B. Colorimetric Methods of Analysis. Wiley Interscience, New York, 1959, p. 445.
35. SEPÚLVEDA, L.E., AGUDELO, L.M y ARENGAS, A. El Mercurio, sus implicaciones en la Salud y en el Ambiente. Revista Luna Azul. ISSN 1909-2474. Universidad de Caldas. 2007
36. SUKUMAR, Ch, et al. Spectrophotometric Determination of Mercury in Environmental Samples and Fungicides based on its Complex. Talanta, vol. 57, Issue 3, (2002), p. 461-465.
37. Validación de Métodos de Ensayo. Gestión de Calidad en Laboratorios de Ensayo y Calibración. Instituto Nacional de Salud. Colombia. Agosto 2005.
38. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Instituto de Salud Pública de Chile. Guía Técnica No. 1. Edición 2010.
39. WOLFGANG, A., SCHMID, A. y Lazos, R. Guía para estimar la incertidumbre de la medición. Centro Nacional de Metrología – CENAM, México. 2000.
40. ZHANG, Y., ADELOJA, S.B. A novel sequential injection-cold vapor atomic absorption spectrometric system for rapid and reliable determination of mercury. Sensor and environmental technology, University Churchill Australia. Agosto 2007. Science Direct Talanta 74 (2008). p. 951 – 957.

ANEXOS

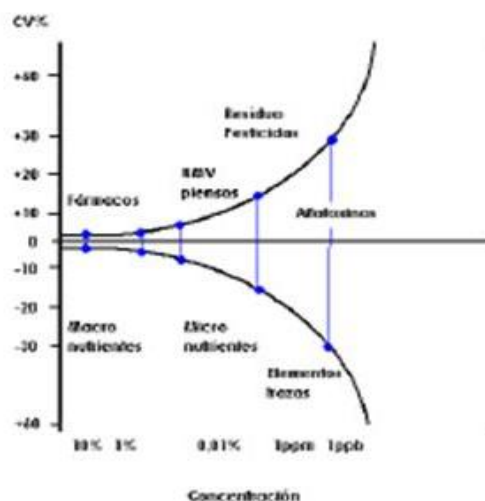
ANEXO A. Valores de la distribución t de student para un 95 % de confianza

GI	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

ANEXO B. Coeficiente de Variación – gráfica de Horwitz

Coeficiente de Variación de Horwitz (CV_h): Es el coeficiente de variación definido por W. Horwitz, a través de la ecuación obtenida de un estudio estadístico. En dicho estudio, Horwitz después de reunir una serie de datos (provenientes de 150 ensayos de interlaboratorios organizados por AOAC), observó que el coeficiente de variación de los valores medios dados por los diferentes laboratorios aumentaban a medida que disminuía la concentración del analito. Comportándose como muestra la siguiente gráfica, conocida como la trompeta de Horwitz.



La ecuación de Horwitz, esta definida como:

$$CV_h = 2^{(1-0.5 \log c)} \quad \text{o} \quad \sigma_H = 0.02 \times c^{0.8495}$$

Dónde:

CV_h = Coeficiente de variación de Horwitz

σ_H = Desviación estándar calculada conforme al modelo de precisión de Horwitz.

c = concentración del analito expresado en potencia de 10 (Ver tabla N° 1).

Este coeficiente de variación (CV_h) esta expresado en potencia de 2, y la concentración media del analito expresado como potencia de 10, de esta forma independiente del analito y el método utilizado se puede estimar el CV esperado para la precisión.

Tabla N° 1:

Concentración	Razón (Potencia de 10)	Unidad
100	1	100% (100 g/100 g)
> 10	10^{-1}	> 10 % (10 g/100 g)
> 1	10^{-2}	> 1 % (1 g/100g)
> 0,1	10^{-3}	> 0,1 % (1 mg/g ó 0,1 g/100 g)
0,01	10^{-4}	100 mg/kg
0,001	10^{-5}	10 mg/Kg
0,0001	10^{-6}	1 mg/Kg
0,00001	10^{-7}	100 µg/Kg
0,000001	10^{-8}	10 µg/Kg
0,0000001	10^{-9}	1 µg/Kg