

**VALIDACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE  
COBRE, HIERRO, MERCURIO Y ARSÉNICO USANDO LAS METODOLOGÍAS  
DE LLAMA Y GENERACIÓN DE HIDRUROS EN AGUAS RESIDUALES , EN EL  
LABORATORIO DE ESTUDIOS AMBIENTALES DE LA UNIVERSIDAD  
PONTIFICIA BOLIVARIANA SECCIONAL BUCARAMANGA**

**LYDA PAOLA RUÍZ PIMIENTO**

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

**2016**

**VALIDACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE  
COBRE, HIERRO, MERCURIO Y ARSÉNICO USANDO LAS METODOLOGÍAS  
DE LLAMA Y GENERACIÓN DE HIDRUROS EN AGUAS RESIDUALES , EN EL  
LABORATORIO DE ESTUDIOS AMBIENTALES DE LA UNIVERSIDAD  
PONTIFICIA BOLIVARIANA SECCIONAL BUCARAMANGA**

**LYDA PAOLA RUÍZ PIMIENTO**

**Proyecto de Grado en modalidad de Pasantía Investigativa para optar al  
título de QUÍMICO**

**DIRECTOR**

**ÁNGELA MARCELA MONTAÑO**

**QUÍMICA, D.**

**CODIRECTOR**

**DIEGO LEONARDO BLANCO**

**QUÍMICO**

**QUÍMICA, Analista**

**YURY ANDREA MARTINEZ MEDINA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2016**

## DEDICATORIA

Un logro a quienes están y han estado en mi andar, a mi padre por su gran espíritu, pero en especial a mi madre quién nunca dudo de mis capacidades, quién siempre me alentó a diario y me demostró que si se puede, a ti mi heroína mi gordita bella Victoria, y al gran motor de mi vida mi ángel de luz tú mi Martín.

Al pensamiento crítico, y que viva la Universidad Pública.

Lyda Paola Ruíz Pimiento

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, a mi gran familia, Gonzalo, Victoria, Andrés y Martín, a mis demás familiares, a todas aquellas personas que me aman. A mis Colegas Químicos y Químicas.

A una sociedad incluyente, a la libre expresión al sentir y al dejar sentir.

A la gran familia del Laboratorio de Estudios Ambientales de la UPB, Dieguito, Yury, Alcides, Jonathan, profe Claudia y Doña Feli por su amistad y confianza.

A la profesora Ángela Montaña, por su don de gente por su gran sensibilidad y apoyarme en esta pasantía, mil gracias.

Al profesor Herminsul por su nobleza y disposición.

A mis compañeros de la UIS que en la medida del tiempo están en mi corazón y en mi imaginario.

A Alexander, por estar siempre para mí por brindarme su amor y por coincidir en el mismo camino, por aportar a mi felicidad nuestro Martín.

A la Universidad Industrial de Santander, por este gran trayecto de mi vida.

A todos y todas infinitas gracias.

*“Si buscas resultados distintos,  
no hagas siempre lo mismo” (ALBERT EINSTEIN)*

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN.....	28
1. MARCO TEÓRICO .....	31
1.1. CONCEPTO DE CALIDAD <sup>[10]</sup> .....	31
1.2. CONCEPTO DE LA ESTANDARIZACIÓN <sup>[10]</sup> .....	32
1.2.1 Etapas de la estandarización <sup>[1]</sup> .....	32
1.2.1.1 Etapa preliminar.....	32
1.2.1.2 Montaje de la metodología.....	32
1.2.1.3 Parte experimental o de mediciones .....	33
1.3 VALIDACIÓN <sup>[11]</sup> .....	33
1.3.1 Razones que justifican la validación de métodos analíticos. ....	34
1.3.2 Evaluación previa a la validación .....	35
1.4. LOS METALES PESADOS.....	36
1.4.1 Cobre (Cu).....	36
1.4.1.1 Efectos del cobre en la salud .....	37
1.4.2 Hierro (Fe) .....	37
1.4.2.1 Efectos del hierro sobre la salud .....	38
1.4.3 Mercurio.....	39
1.4.3.1 Efectos del Hg en la salud: .....	40
1.4.4 Arsénico.....	41

1.4.4.1 Efectos del As en la salud .....	42
1.5 METALES EN EL MEDIO AMBIENTE .....	44
1.5.1. Riesgos de la salud por contaminación con metales pesados .....	44
1.5.1.1 Efectos medio ambientales del cobre.....	44
1.5.1.2 Efectos medio ambientales del hierro .....	45
1.5.1.3 Efectos medio ambiente del mercurio .....	45
1.5.1.4 Efectos del As en el medio ambiente .....	47
1.5.2. Metales presentes en el agua .....	47
1.6 TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS.....	48
1.6.1. Toxicidad Cobre.....	48
1.6.2. Toxicidad Hierro.....	48
1.6.3. Toxicidad Arsénico.....	49
1.6.4. Toxicidad Mercurio.....	49
1.7 ANÁLISIS DEL RECURSO HIDRICO .....	49
1.7.1 Aseguramiento de la calidad analítica de datos ambientales .....	51
1.8. ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA .....	52
1.8.1. Generalidades de absorción atómica .....	52
1.8.2. Generación de Hidruros .....	54
1.8.3 Interferencias en absorción atómica por llama y generación de hidruros .....	59
1.9 CUANTIFICACIÓN DE METALES PESADOS .....	61
1.10 NORMATIVIDAD .....	62
1.11 ACREDITACIÓN EN COLOMBIA .....	63
1.12 COMPETENCIA EN LOS LABORATORIOS NTC-ISO/IEC 17025.....	64

1.13 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALITICOS .....	65
1.13.1 Exactitud .....	66
1.13.1.1 Errores .....	66
1.13.1.2 Precisión .....	66
1.1.3.2 Desviación estándar .....	66
1.13.3 Sensibilidad .....	67
1.13.4 Recuperación.....	67
1.13.5 Límite de detección y cuantificación del método .....	67
1.13.6 Incertidumbre .....	68
1.13.6.1 Clasificación de la incertidumbre.....	68
1.13.6.2 Incertidumbre estándar ( $u(x_i)$ ).....	69
1.13.6.3 Incertidumbre estándar relativa ( $u(x_i)/x_i$ ) .....	70
1.13.6.4 Incertidumbre estándar expandida ( $u_c(y)$ ).....	70
1.13.6.5 Incertidumbre expandida ( $U$ ).....	70
2. METODOLOGÍA .....	71
2.1 PRE-VALIDACIÓN .....	71
2.1.1 Pre-validación del método para la cuantificación de cobre, hierro, mercurio y arsénico por las técnicas de faa y hgaas .....	71
2.1.1.1 Verificación del material volumétrico .....	73
2.2 VERIFICACIÓN DE EQUIPOS .....	74
2.2.1 Espectrofotómetro.....	74
2.2.2 Equipo de absorción atómica .....	75
2.2.3 Equipos menores .....	75

2.2.3.1 Verificación de la balanza analítica Sartorius BP211D .....	75
2.2.3.2 Verificación Microwave .....	75
2.2.3.3 Verificación Baño Termostatado .....	76
2.3 DETERMINACIÓN DE FIGURAS DE MÉRITO.....	76
2.3.1 Chequeo de procedimientos .....	76
2.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS .....	77
2.4.1 Optimización de variables instrumentales .....	77
2.4.1.1 Tiempo de pre-Lectura de la muestra .....	78
2.4.1.2 Toma y preservación de muestras .....	81
2.4.1.3 Determinación de cobre y hierro total en aguas .....	82
2.4.1.3.1 Método de Referencia para Cu y Fe .....	82
2.4.1.3.2 Curva de Calibración para Cu y Fe .....	84
2.4.1.3.3 Intervalo de Validación para Cu y Fe .....	86
2.4.1.4 Determinación de arsénico y mercurio total en agua.....	86
2.4.1.4.1 Método de Referencia para As y Hg .....	87
2.4.1.4.2 Curva de calibración para As y Hg .....	90
2.4.1.4.3 Intervalo de validación para As y Hg .....	92
2.5 LINEALIDAD.....	93
2.5.1 Diseño Experimental.....	93
2.6 DETERMINACIÓN DE FIGURAS DE MÉRITO.....	95
2.6.1 El límite de detección.....	96
2.6.2 El límite de cuantificación.....	96
2.6.3 Precisión .....	96

2.6.4 Exactitud .....	96
2.6.5 Sensibilidad del método .....	97
2.7 ELABORACIÓN CARTAS CONTROL .....	97
2.8 CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE .....	97
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	105
3.1 PREVALIDACIÓN.....	105
3.1.1 Verificación de patrones .....	105
3.1.2 Verificación de equipos .....	105
3.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANALISIS PARA METALES.....	106
3.2.1 Cobre.....	106
3.2.1.1 Intervalo de validación para Cu.....	108
3.2.1.2 Curvas de calibración para Cu .....	108
3.2.1.3 Linealidad para Cu.....	110
3.2.1.4 Sensibilidad del método para la determinación de Cu.....	110
3.2.1.5 Límite de detección (LDM) para Cu .....	111
3.2.1.6 Límite de cuantificación para Cu .....	111
3.2.1.7 Precisión Cu .....	111
3.2.1.8 Exactitud Cu .....	112
3.2.1.9 Recuperación del método para determinación de Cu.....	112
3.2.1.10 Cartas control determinación de Cu .....	112
3.2.1.11 Incertidumbre para Cu .....	113
3.2.2 Hierro.....	120
3.2.2.2 Intervalo de validación para Fe .....	121

3.2.2.3 Curva de calibración para Fe .....	121
3.2.2.4 Linealidad para Fe .....	122
3.2.2.5 Sensibilidad del método para la determinación de Fe .....	123
3.2.2.6 Límite de detección (LDM) para Fe .....	123
3.2.2.7 Límite de cuantificación para Fe .....	124
3.2.2.8 Precisión Fe .....	124
3.2.2.9 Exactitud Fe .....	124
3.2.2.10 Recuperación del método para determinación de Fe .....	125
3.2.2.11 Cartas control determinación de Fe .....	125
3.2.2.12 Incertidumbre para Fe .....	126
3.2.3 Mercurio .....	133
3.2.3.1 Intervalo de validación para Hg .....	135
3.2.3.2 Curva de calibración para Hg .....	135
3.2.3.3 Linealidad para Hg .....	136
3.2.3.4 Sensibilidad del método para la determinación de Hg .....	137
3.2.3.6 Límite de cuantificación para Hg .....	137
3.2.3.7 Precisión Hg .....	138
3.2.3.8 Exactitud Hg .....	138
3.2.3.9 Recuperación del método para determinación de Hg .....	138
3.2.3.10 Cartas control determinación de Hg .....	139
3.2.3.11 Incertidumbre para Hg .....	140
3.2.4 Arsénico .....	147
3.2.4.1 Intervalo de validación para As .....	149

3.2.4.2 Curva de calibración para As .....	149
3.2.4.3 Linealidad para As .....	150
3.2.4.4 Sensibilidad del método para la determinación de As .....	151
3.2.4.5 Límite de detección (LDM) para As .....	151
3.2.4.6 Límite de cuantificación para As .....	151
3.2.4.7 Precisión As .....	152
3.2.4.8 Exactitud As .....	152
3.2.4.9 Recuperación del método para determinación de As .....	152
3.2.4.10 Cartas control determinación de As .....	153
3.2.4.11 Incertidumbre para As .....	154
4. CONCLUSIONES .....	162
5. RECOMENDACIONES .....	165
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	166
BIBLIOGRAFÍA .....	173

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Ciclo Biogeoquímico del mercurio <sup>[28]</sup> .....	47
Figura 2. Etapas del desarrollo para análisis de calidad de los recursos hídricos <sup>[30]</sup> .....	50
Figura 3. Figuras de mérito en la estandarización de metodologías analíticas <sup>[10]</sup> ..	52
Figura 4. Esquema espectrofotómetro de llama por absorción atómica de doble haz.....	53
Figura 5: Diagrama esquemático del sistema de FIAS 100 para la generación de hidruros automatizado tomado del manual fabricante Perkin Elmer.....	57
Figura 6: Esquema de un sistema de generación de hidruros en Flujo Continuo con detección por Espectroscopia de Absorción Atómica <sup>[3]</sup> .....	58
Figura 7: Esquema de un sistema de generación de hidruros por inyección en Flujo con detección por Espectroscopia de Absorción Atómica. <sup>[3]</sup> .....	58
Figura 8: Esquema de un sistema por carga de generación de hidruros. <sup>[3]</sup> .....	59
Figura 9. Reducción de un haz de radiación por efecto de absorción. ....	62
Figura 10. Diagrama de la ubicación de soluciones de trabajo en la curva de calibración para la validación. ....	95
Figura 11. Diagrama de causa y efecto para la determinación de incertidumbre para el metal Cu .....	98
Figura 12: Diagrama de causa y efecto para la determinación de incertidumbre para el metal Fe.....	100
Figura 13 Diagrama de causa y efecto para la determinación de incertidumbre para el metal Hg .....	101
Figura 14: Diagrama de causa y efecto para la determinación de incertidumbre para el metal As.....	103
Figura 15. Curvas de Calibración Cobre .....	109

Figura 16. Carta control E 1 ppm Cu .....	112
Figura 17 Carta control Recuperación para Cu .....	113
Figura 18. Curva de Calibración promedio para Cobre .....	114
Figura 19: Contribuciones de Incertidumbre para la determinación de Cu .....	119
Figura 20: Curvas de Calibración Hierro .....	122
Figura 21. Carta control E 1 ppm Fe .....	125
Figura 22. Carta control Recuperación para Fe .....	126
Figura 23. Curva de Calibración promedio para Hierro .....	127
Figura 24. Contribuciones de Incertidumbre para la determinación de Fe .....	132
Figura 25: Curvas de Calibración Mercurio .....	136
Figura 26: Carta control E 10 ppb Hg .....	139
Figura 27: Carta control Recuperación para Hg .....	140
Figura 28. Curva de Calibración promedio para Mercurio .....	141
Figura 29. Contribuciones de Incertidumbre para la determinación de Hg .....	146
Figura 30: Curvas de Calibración Arsénico .....	150
Figura 31. Carta control E 20 ppb As .....	153
Figura 32. Carta Control Recuperación para As .....	154
Figura 33. Curva de Calibración promedio para Arsénico .....	155
Figura 34. Contribuciones de Incertidumbre para la determinación de As .....	160

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1: Parámetros o figuras de mérito de calidad de un método. ....	35
Tabla 2: Valor aceptable para cobre, hierro, arsénico y mercurio según resolución 2115 .....	62
Tabla 3. Reactivos, estándares y CMR que se emplearon en la validación del método para cuantificar Cu en aguas residuales por la técnica FAA. ....	72
Tabla 4. Reactivos, patrones y CMR que se emplearon en la validación del método para cuantificar Fe en aguas residuales por la técnica FAA. ....	72
Tabla 5. Reactivos, patrones y CMR que se emplearon en la validación del método para cuantificar Hg en aguas residuales por la técnica HGAAS. ....	72
Tabla 6. Reactivos, patrones y CMR que se emplearon en la validación del método para cuantificar As en aguas residuales por la técnica HGAAS. ....	73
Tabla 7. Acondicionamiento Método de FAA para Cu y Fe .....	78
Tabla 8. Acondicionamiento Método de HGAAS para Hg y As .....	80
Tabla 9. Condiciones recomendadas por el equipo FIAS 100 de Perkin Elmer para As. ....	80
Tabla 10. Condiciones recomendadas por el equipo FIAS 100 de Perkin Elmer para Hg.....	81
Tabla 11. Condiciones del Multiwave digestión de muestras y controles de calidad para Cu y Fe.....	83
Tabla 12. Condiciones del Multiwave digestión de muestras y controles de calidad para As. ....	88
Tabla 13: Soluciones estándares de trabajo en rango bajo y alto .....	94
Tabla 14. Análisis de muestras y estándares para Cu .....	107
Tabla 15. Datos curvas de calibración para la determinación de Cu.....	109
Tabla 16: Controles Validación Cu.....	110

Tabla 17. Datos de Absorbancia de los días de Validación para Cu .....	115
Tabla 18. Diferencias al cuadrado de cada día con la concentración para Cu ....	116
Tabla 19: Sumas de cuadrados para Cu.....	116
Tabla 20: Digestión de estándares y muestras por MULTIWAVE para Cu.....	117
Tabla 21: Cálculo de incertidumbre para la repetibilidad de la muestra de Cu ....	118
Tabla 22. Contribuciones de las fuentes de Incertidumbres para la determinación de Cu.....	118
Tabla 23. Análisis de muestras y estándares para Fe.....	120
Tabla 24: Datos curvas de calibración para la determinación de Fe .....	122
Tabla 25 Controles Validación Fe .....	123
Tabla 26. Datos de Absorbancia de los días de Validación para Fe .....	128
Tabla 27. Diferencias al cuadrado de cada día con la concentración para Fe ....	129
Tabla 28: Sumas de cuadrados para Fe .....	129
Tabla 29: Digestión de estándares y muestras por MULTIWAVE para Fe .....	130
Tabla 30. Cálculo de incertidumbre para la repetibilidad de la muestra de Fe ....	131
Tabla 31: Contribuciones de las fuentes de Incertidumbres para la determinación de Fe .....	131
Tabla 32. Análisis de muestras y estándares para Hg .....	133
Tabla 33. Datos curvas de calibración para la determinación de Hg.....	135
Tabla 34. Controles Validación Hg.....	137
Tabla 35: Datos de Absorbancia de los días de Validación para Hg .....	142
Tabla 36: Diferencias al cuadrado de cada día con la concentración para Hg ....	143
Tabla 37. Sumas de cuadrados para Hg.....	143
Tabla 38 Digestión de estándares y muestras por baño termostático para Hg ..	144
Tabla 39. Cálculo de incertidumbre para la repetibilidad de la muestra de Hg ....	145
Tabla 40. Contribuciones de las fuentes de Incertidumbres para la determinación de Hg.....	146
Tabla 41. Análisis de muestras y estándares para As.....	147
Tabla 42. Datos curvas de calibración para la determinación de As .....	149
Tabla 43. Controles Validación As .....	151

Tabla 44 Datos de Absorbancia de los días de Validación para As .....	156
Tabla 45: Diferencias al cuadrado de cada día con la concentración para As ....	157
Tabla 46. Sumas de cuadrados para As .....	157
Tabla 47: Digestión de estándares y muestras por MULTIWAVE para As .....	158
Tabla 48. Cálculo de incertidumbre para la repetibilidad de la muestra de As ....	159
Tabla 49. Contribuciones de las fuentes de Incertidumbres para la determinación de As .....	160

## ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SÍMBOLOS

<b>LEA-UPB-BGA</b>	Laboratorio de Estudios Ambientales de la Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga
<b>SM</b>	Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater
<b>IDEAM</b>	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales
<b>X</b>	Concentración
<b>NTC</b>	Normas técnicas Colombianas
<b>ISO</b>	Organización Internacional de Normalización
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<b>u.m.a</b>	Unidad de Masa Atómica
<b>C<sub>2</sub>H<sub>2</sub></b>	Acetileno
<b>Ar</b>	Argón
<b>FAA</b>	Espectrofotometría de Absorción Atómica por llama directa
<b>HGAAS</b>	Espectrofotometría de Absorción atómica por generación de hidruros.
<b>As</b>	Arsénico
<b>Cu</b>	Cobre
<b>Fe</b>	Hierro
<b>Hg</b>	Mercurio
<b>SI</b>	Sistema Internacional
<b>EPA</b>	Environmental Protection Agency
<b>MRC</b>	Material de referencia certificado para Patrón de 1000 mg/L de Cu, Patrón de 1000mg/L de Fe Patrón de 1000mg/L de As y Patrón de 1000mg/L de Hg
<b>REDOX</b>	Reacciones de óxido – reducción

<b>Ppb</b>	Partes por billón
<b>Ppm</b>	Partes por millón
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>HCl</b>	Ácido Clorhídrico
<b>HNO<sub>3</sub></b>	Ácido Nítrico
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido Sulfúrico
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	Carbonato de Calcio
<b>KMnO<sub>4</sub></b>	Permanganato de Potasio
<b>K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub></b>	Persulfato de Potasio
<b>NH<sub>2</sub>OH.HCl</b>	Clorhidrato de Hidroxilamina
<b>U</b>	Incertidumbre Expandida
<b>U<sub>c</sub></b>	Incertidumbre Estándar Combinada
<b>K</b>	Factor de cobertura
<b>Psi</b>	Libra-fuerza por pulgada cuadrada
<b>FC</b>	Flujo continuo
<b>IF</b>	Inyección en flujo
<b>LA</b>	Límite de advertencia
<b>LAS</b>	Límite advertencia superior
<b>LAI</b>	Límite de advertencia inferior
<b>LC</b>	Límite crítico
<b>LCS</b>	Límite de crítico superior
<b>LCI</b>	Límite crítico inferior

## GLOSARIO <sup>[1]</sup>

**Analito:** El constituyente de interés en una muestra.

**Blanco del método ( $B_K$ ):** Muestra que sin contener analitos pasa a través de todos los pasos del método.

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

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

**Espectrometría de absorción atómica <sup>[2]</sup>:** Técnica analítica instrumental basada en la absorción de un 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.

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

**Error, error sistemático, error aleatorio:** Los errores analíticos que se cometen al efectuar los análisis pueden ser determinados o indeterminados. Los errores determinados o sistemáticos van en una sola dirección y se deben a fallos de instrumentos, personas o métodos; deben eliminarse o corregirse sus efectos, puesto que afectan la exactitud del método. Los errores indeterminados o aleatorios son de origen desconocido, actúan en ambas direcciones y determinan la variabilidad de los resultados o precisión del método.

**Exactitud de una medición:** Proximidad entre el resultado de una medición y el valor verdadero del mesurando.

**Hidruro** <sup>[3]</sup>: La mayoría de los elementos forman compuestos con el hidrogeno. Sin hablar de la polaridad del hidrogeno, estos son llamados hidruros.

**Incertidumbre:** Parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando.

**Interferencias:** Son perturbaciones que alteran una, varias o todas las etapas del proceso analítico y por consiguiente a los resultados analíticos, que se ven afectados por errores sistemáticos.

**Intervalo de trabajo, rango:** Diferencia en magnitud entre la mayor y menor concentración de analíto que puede determinarse satisfactoriamente con adecuada linealidad, exactitud y precisión.

**Límite de cuantificación:** Es la menor cantidad de analíto que puede ser determinada cuantitativamente con una incertidumbre asociada, para un nivel dado de confianza.

**Límite de detección:** Es la menor cantidad de analíto que puede ser distinguida del ruido de fondo, para un nivel dado de confianza.

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

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

**Mesurando:** Magnitud particular sometida a medición.

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

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

**Muestra:** Parte del sistema que se somete a análisis.

**Precisión:** Indica el grado de concordancia entre los datos obtenidos para réplicas de una misma muestra, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones preestablecidas

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

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

**Recuperación:** Es la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente una especie química que ha sido adicionada a una muestra, se expresa como (%R)

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

**Relación señal-ruido. Ruido de fondo:** En sistemas instrumentales es la señal residual o línea base registrada con concentración cero de analito, es decir, es la

señal que proporciona un blanco. Matemáticamente suele expresarse como la desviación estándar de la respuesta de un cierto número de blancos.

**Repetibilidad (de los resultados de las mediciones):** Proximidad entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mesurando, realizadas bajo las mismas condiciones de medición. (Aplicación de un mismo procedimiento, a un mismo objeto, por el mismo operador, en intervalos cortos de tiempo, con el mismo equipamiento instrumental, en el mismo lugar).

**Representatividad:** Esta propiedad se refiere al buen muestreo. Se trata de encontrar una concordancia adecuada entre los resultados y el conjunto compuesto por la muestra, el objeto, el problema analítico y la necesidad económica, social, científica y técnica.

**Reproducibilidad:** Proximidad entre los resultados de mediciones de un mismo mesurando, realizadas bajo distintas condiciones de medición.

**Residual:** Es la diferencia entre el valor observado experimentalmente y el valor estimado en una recta de regresión o curva de calibración.

**Revalidación:** Repetición total o parcial de la validación de un método analítico debido a modificaciones en el propio método, equipos, muestras a analizar, etc. Con el objetivo de garantizar que los resultados continúen siendo confiables.

**Robustez:** Medida de la capacidad de un método analítico de permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo de rutina.

**Selectividad:** Un método analítico se dice que es selectivo si es capaz de originar resultados que dependan exclusivamente del analito para su cuantificación. El

grado de selectividad es inversamente proporcional al grado de interferencia. Interferencias son perturbaciones que alteran una, varias o todas las etapas del proceso analítico y por consiguiente a los resultados analíticos, que se ven afectados por errores sistemáticos. De acuerdo a esto se deduce que la selectividad está directamente relacionada con la exactitud.

**Sensibilidad:** Es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración. Normalmente se mide como la pendiente de la curva de calibración.

**Sesgo:** Error sistemático o determinado.

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

**Validación** <sup>[4]</sup>: Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos de un método de análisis para una utilización o aplicación específica prevista.

## RESUMEN

**TÍTULO:** VALIDACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE COBRE, HIERRO, MERCURIO Y ARSÉNICO USANDO LAS METODOLOGÍAS DE LLAMA Y GENERACIÓN DE HIDRUROS EN AGUAS RESIDUALES , EN EL LABORATORIO DE ESTUDIOS AMBIENTALES DE LA UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA SECCIONAL BUCARAMANGA

**Autor(es):** Ruíz, Lyda \*\*

**Palabras clave:** Metrología, metales pesados, agua, validación, incertidumbre.

### DESCRIPCIÓN

La metrología es la ciencia de las mediciones y sus aplicaciones. Abarca también los principios relativos a las magnitudes y unidades; está presente en los aspectos: económico, legal y técnico-científico de nuestro diario vivir.

El LEA-UPB-BGA en su sistema de calidad interno requiere trazar una línea metrológica, que asegure el desarrollo de nuevas técnicas analíticas en el análisis de agua residual.

En la evaluación de la calidad del agua, los metales pesados indican el grado de contaminación y toxicidad del líquido. Dicha existencia altera procesos químicos y biológicos, generando efectos perjudiciales en los seres humanos y en el agua. La finalidad de esta pasantía de investigación es el estudio, desarrollo y validación de dos técnicas analíticas de absorción atómica; una en llama para determinación de metales pesados como cobre y hierro, la otra con generador de hidruros para determinación de metales pesados como arsénico y mercurio en aguas residuales.

Bajo los requisitos técnicos de la NTC ISO 17025, se originó un documento para la UPB y la UIS, donde se evidencia el alcance de la validación de las metodologías analíticas normalizadas. Los procedimientos analíticos desarrollados (3111B, 3112B y 3114B) produjeron resultados precisos y exactos en el marco de las especificaciones y las figuras de mérito de calidad establecidas. Dentro de las figuras de mérito que se escogieron para demostrar la competencia de los métodos empleados son: Linealidad e intervalo de respuesta lineal, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud y la estimación de la incertidumbre.

---

\* Proyecto de grado modalidad Pasantía de Investigación

\*\* Facultad de ciencias. Escuela de Química. Director: Ángela Montaña, *Ph. D.* Diego Blanco, Qco. Codirector: Yury Martínez, Qca.

## ABSTRACT

**TITLE:** VALIDATION THROUGH SPECTROMETRY OF ATOMIC ABSORPTION OF COPPER, IRON, MERCURY AND ARSENIC USING FLAME METHODOLOGIES AND HYDRIDE GENERATION IN SEWAGE WATERS, IN THE LABORATORY OF ENVIRONMENTAL STUDIES OF THE PONTIFICIA BOLIVARIANA UNIVERSITY IN BUCARAMANGA.\*

**Author(s):** Ruíz, Lyda \*\*

**Keywords:** Metrology, heavy metals, water, validation, uncertainty.

### **DESCRIPTION:**

Metrology is the science of measurements and their applications. It also includes the relative principles of the magnitudes and units: it is present in the economic, legal and techno-scientific aspect of our daily life.

The LEA-UPB-BGA, in its inner quality system, requires drawing up a metrological line that assures the development of new analytic techniques in the analysis of sewage water.

In the evaluation of the water's quality, the heavy metals indicate the degree of contamination and toxicity of the liquid. This existence alters chemical and biological processes, generating harmful effects in human beings and water. The purpose of this research internship is the study, development and validation of two analytical techniques of atomic absorption; one in flame for determination of heavy metals such as copper and iron, and the another one with hydride generator for the determination of heavy metals such as arsenic and mercury in sewage waters.

Under the technical requirements of the NTC ISO 17025, it was originated a document for the UPB and UIS, in which is shown the range of the validation of normalized analytic methodologies. The developed analytic procedures (3111B, 3112B y 3114B) produced precise and exact results in the framework of the specifications and established achievements figures of quality. Within the merit figures chosen to demonstrate the competence of the employed methods, we have linearity and interval of lineal response, sensibility detection limit, quantification limit, precision, accuracy and estimation of the uncertainty.

---

\* Graduation Project in Research Internship modality

\*\* Sciences Faculty. Chemistry School. Director: Angela Montaña, Ph. D. Diego Blanco, Chem. Co-director: Yury Martínez, Chem

## INTRODUCCIÓN

La superficie terrestre del planeta está compuesta por un 70% de agua, de éste porcentaje solo un poco menos del 1% se encuentra disponible para el uso humano y para el mantenimiento de los ecosistemas naturales. Esta fracción se encuentra amenazada por desechos provenientes de las actividades diarias que involucran al ser humano generando la formación de aguas negras y residuales, los cuales perjudican a quienes se encuentren en contacto con ellas.

Desde el punto de vista químico es importante la calidad del agua, puesto que casi todos los procesos que ocurren en la naturaleza tienen lugar en sustancias disueltas en agua. El agua es un medio de transporte de nutrientes, importante para la vida, ya que para algunos sistemas el agua sirve de contenedor de las sustancias vitales<sup>[5]</sup>. Sin embargo, se puede contaminar por las diversas actividades humanas y volverse no apta para muchos de sus propósitos, e incluso, volverse nociva para los seres vivos <sup>[6]</sup>.

La contaminación del agua es un problema ambiental que se da en todos los lugares del mundo. Día a día el hombre contamina el agua arrojando basura, desechos humanos e industriales a ríos, lagos, acuíferos y al mar. Dichos desechos, incluso en concentraciones muy pequeñas, son extremadamente tóxicos para la vida marina, y pueden producir brotes de hepatitis, cólera y disentería en los seres humanos. Debido a dichas prácticas humanas es que el color cristalino radiante del agua se ha ido perdiendo y ha venido tomando un color marrón en respuesta a la alteración de su calidad<sup>[7]</sup>.

La investigación científica constituye una forma de conservar y emplear de manera racional éste recurso, ésta nos genera información sobre los tipos y niveles de

contaminación. Además, con base en ella se puede realizar una evaluación integral de la calidad del agua donde se contemple la caracterización de sus componentes desde múltiples perspectivas, incluyendo los aspectos hidrológico, fisicoquímico y biológico. De igual forma, haciendo uso de la investigación se pueden implementar y validar técnicas de análisis de aguas con el fin de evitar el deterioro de las mismas y preservarlas.

La metrología (mediciones) es la ciencia de la trazabilidad que nos garantiza la normalización de valores (con la exactitud requerida), empleando los instrumentos y métodos apropiados. Siguiendo esta idea, el LEA asumió el reto de implementar esta herramienta para la calidad de sus análisis y la validación de nuevos métodos analíticos relacionados con el agua residual.

Dentro de las obligaciones que demanda la NTC ISO/IEC 17025:2005 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”, para los laboratorios donde se implementen análisis de aguas residuales, está: aplicar métodos apropiados. Además estos métodos deben ser normalizados, regulados y obligados a efectuar sus procedimientos basados en la norma antes mencionada; si no cumplen con lo planteado en la norma no obtendrán una validación satisfactoria, y no se entregarán resultados de carácter confiable y trazable<sup>[8]</sup>.

La presente pasantía de investigación fue financiada en su totalidad por el Laboratorio de Estudios Ambientales de la Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga, tuvo como objetivo implementar y validar el análisis de Cu, Fe, Hg y As mediante la técnica analítica de absorción atómica en llama y generación de hidruros y se determinó principalmente la precisión, trazabilidad e incertidumbre de estas dos técnicas. Los resultados de este estudio sirvieron como soporte en el proceso de acreditación de dos metales por parte del LEA, ante el IDEAM como ente acreditador.

El resultado de la pasantía garantiza la satisfacción de clientes a través de la prestación de servicios con criterios de calidad basados en procesos, recomendados por organismos internacionales y nacionales debidamente validados, estandarizados<sup>[9]</sup> e implementados en el laboratorio por la pasante de investigación

## **1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1. CONCEPTO DE CALIDAD<sup>[10]</sup>**

Calidad significa cumplir satisfactoriamente un objetivo específico bien definido, es decir, que un producto o servicio satisface expresamente o subjetivamente las necesidades de los usuarios o beneficiarios. Las dos grandes áreas de la calidad son Gestión de la calidad y Aseguramiento de la calidad (Garantía de Calidad). El concepto de Calidad en laboratorios se aplica más estrictamente al análisis químico cuantitativo y se relaciona estrechamente con las buenas prácticas profesionales y la satisfacción del cliente; para aplicar y sistematizar estas buenas prácticas en todos los sectores del laboratorio es conveniente implementar un adecuado Sistema de Calidad que asegure una óptima relación laboratorio/cliente.

Sistema de Calidad: es la estructura organizacional, las responsabilidades, los procedimientos, los procesos y los recursos necesarios para implementar la administración de la calidad (ISO 8402/94).

Un sistema de calidad consta de: una base documental en la cual se describen los procedimientos, instrucciones y planes ajustándose a una norma. Recursos tanto físicos como humanos. Los físicos comprenden locales, maquinarias e instrumentos de medida. Los humanos comprenden un personal adiestrado en técnicas de calidad y técnicas de ensayo. Aseguramiento de la calidad: Son todas las actividades planificadas y sistemáticamente aplicadas en el sistema de calidad y demostradas cuando se requieren para brindar la suficiente confianza de que el sistema cumplirá con los requerimientos de calidad (ISO 8402-1994).

## **1.2. CONCEPTO DE LA ESTANDARIZACIÓN <sup>[10]</sup>**

La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso que tiene como objetivo establecer o definir las condiciones de análisis en que se pretende cuantificar un analito. Que dependiendo de la técnica analítica a la que pertenezca el método, la matriz o matrices, el analito, la cantidad de parámetros de estandarización y de la metodología empleada para su desarrollo puede requerir de un tiempo considerable (en algunos casos puede superar los seis meses).

### **1.2.1 Etapas de la estandarización <sup>[1]</sup>**

#### **1.2.1.1 Etapa preliminar**

- La etapa preliminar consiste en evaluar una serie de parámetros y condiciones que permitan obtener información relevante y orientar el proceso de la estandarización propiamente dicha, esto se logra haciendo una revisión documental sobre el tema.

#### **1.2.1.2 Montaje de la metodología**

- Selección del método, evaluar el método y su aplicación al analito de interés y a todas las matrices.
- Creación de un archivo físico (carpeta) para toda la documentación generada en el proceso.
- Conocer o generar el procedimiento del método disponiendo de una copia de trabajo.
- Conocimiento del principio químico y/o físico del método y de la técnica utilizada, se debe elaborar un resumen conciso.
- Conocimiento exacto del funcionamiento del equipo de medición. En lo posible construir un diagrama de flujo para el manejo del equipo o por lo menos los

pasos que se deben seguir en orden cronológico para su adecuada operación desde el encendido hasta el apagado.

- Inventario de los reactivos que se necesitan para toda la estandarización (identificación, precauciones, calidad, cantidad, grado de pureza, conservación y almacenamiento del reactivo puro y en solución).
- Inventario de vidriería y otros materiales necesarios señalando las cantidades necesarias y los requerimientos de limpieza.
- Establecer los procedimientos para la descontaminación, limpieza del material y la disposición de los desechos.
- Diseñar un plan para la preparación de reactivos y análisis de: estándares, muestras y muestras adicionadas.
- Diseño de un formato para la captura de los datos.
- Definición del intervalo de aplicación del método.
- Verificación y optimización de las condiciones y de los parámetros instrumentales incluyendo curva de calibración.

### **1.2.1.3 Parte experimental o de mediciones**

- En esta etapa se lleva a cabo todo el proceso de estandarización aplicando la metodología y todas las actividades programadas en el procedimiento, con el fin de asegurar la correcta determinación del analito en toda la variedad de matrices.

## **1.3 VALIDACIÓN <sup>[11]</sup>**

Validar un método de análisis consiste en verificar y documentar su validez, esto es, la adecuación a unos determinados requisitos previamente establecidos. La definición de la norma NTC/ISO/IEC 17025 es: “*confirmación, a través del examen*

*y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”.*

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

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

### **1.3.1 Razones que justifican la validación de métodos analíticos.**

**1.3.1.1** Un método siempre debe validarse cuando es necesario verificar que sus parámetros de calidad se adecuan a un problema analítico particular que debemos resolver en nuestro laboratorio.

**1.3.1.2** Debe validarse para demostrar que es adecuado para los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.

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

**1.3.2 Evaluación previa a la validación** Antes de iniciar el procedimiento de validación se debe tener en cuenta lo siguiente:

**1.3.2.1** Tener perfectamente caracterizado el analito.

**1.3.2.2** Trabajar suficientemente con el método de análisis para tener amplio conocimiento acerca de él y esto nos ofrezca garantías de que la validación puede ser satisfactoria. Esto se logra desarrollando paso a paso y concienzudamente todo el procedimiento de estandarización.

**1.3.2.3** Definir claramente objetivo, alcance, procedimiento y todos los parámetros de calidad del método. Solo cuando el procedimiento está definido en todos sus detalles y se tiene convencimiento de que las condiciones descritas son idóneas para alcanzar los resultados esperados debe iniciarse la validación.

**1.3.2.4** Crear un archivo físico (plan de validación) donde se describa paso a paso todo el procedimiento de validación. Se deben incluir hojas de recolección de datos.

**Tabla 1: Parámetros o figuras de mérito de calidad de un método.**

<b>Tipo matemático-estadístico</b>	<b>Tipo Operatorio-económico</b>
✓ Exactitud	✓ Inversión
✓ Precisión	✓ Mantenimiento
✓ Incertidumbre	✓ Rapidez
✓ Sensibilidad	✓ Facilidad del uso
✓ Selectividad	✓ Simplicidad
✓ Límites	✓ Gastos directos
✓ Robustez	✓ Gastos indirectos

## 1.4. LOS METALES PESADOS

El término **metal pesado** se ha venido utilizando en la literatura científica desde hace unos setenta años para referirse a una serie de elementos metálicos con determinadas características comunes. Actualmente, se reconoce como tales a aquellos elementos metálicos que son potencialmente tóxicos para el medio ambiente. No obstante, a lo largo de este periodo han sido muchas las definiciones que se han utilizado para su clasificación.

**1.4.1 Cobre (Cu)** El cobre es el primer elemento que se encuentra ubicado en el Grupo once (**IB**) del Sistema Periódico. Sus propiedades físicas y químicas tales como elevada conductividad térmica, alta conductividad eléctrica, maleabilidad, baja corrosión, capacidad para formar aleaciones y abundancia, lo convierten en uno de los metales más importantes. Es de color rojizo, encontrándose tanto en suelos, rocas, aguas, sedimentos y aire como en todos los animales y las plantas.

Su configuración electrónica externa es  $3d^{10}4s^1$ , siendo los estados de oxidación habituales uno y dos. En disolución el estado de oxidación estable es dos y se encuentra rodeado octaédricamente por seis moléculas de agua. La mayoría de los compuestos y complejos que forma son azules o verdes y habitualmente solubles en agua.

En la corteza terrestre presenta una concentración media de  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , siendo los minerales más importantes: calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ), calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) y malaquita ( $\text{CuCO}_3\cdot\text{Cu}(\text{OH})_2$ ), aunque también aparece en otros minerales como cuprita ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), azurita ( $2\text{CuCO}_3\cdot\text{Cu}(\text{OH})_2$ ) y bornita ( $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ). En ríos y lagos su concentración media se encuentra en torno a  $4 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , mientras que en el agua de mar está en torno a  $0,15 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y puede llegar a  $200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  en el aire<sup>[12]</sup>.

Cuando el cobre o sus compuestos se emiten al aire, como sucede con las plantas industriales que procesan el mineral de cobre, éste lo hace en forma de partículas que pueden ser arrastradas varios kilómetros desde la fuente de emisión. Posteriormente, estas partículas se depositarán en el suelo debido a la gravedad o a las precipitaciones (lluvia o la nieve), o bien pueden llegar hasta el mar, donde se pueden unir a las partículas suspendidas en el agua, depositándose finalmente en los sedimentos.

En el caso de las aguas residuales industriales o urbanas el proceso es similar, ya que se acumula en los sedimentos de los ríos, lagos y estuarios. Una vez que el cobre llega a los sedimentos, si se producen alteraciones en las características fisicoquímicas del sistema, puede ocurrir que parte de éste se lixivie en el agua y sea absorbido por los distintos microorganismos presentes en el sistema, o sea retenido en forma particulada en el sistema de filtración de los organismos bénticos. Posteriormente, comienza su incorporación a la cadena trófica hasta poder llegar al hombre<sup>[13]</sup>.

**1.4.1.1 Efectos del cobre en la salud** En el caso del hombre, los efectos adversos sobre la salud se manifiestan por daños en el hígado y el riñón, anemia, inmunotoxicidad, etc., aunque los más habituales suelen ser los trastornos gastrointestinales, que se manifiestan por vómitos, náuseas y dolor abdominal poco después de ingerir bebidas con contenidos elevados de cobre. Además, y dada la esencialidad de este elemento para el organismo, su deficiencia también puede provocar algunas enfermedades como anemia, osteoporosis o niveles altos de colesterol. Por tanto, es necesario que se mantenga una concentración de cobre prácticamente constante en el organismo para que no se produzcan efectos sobre la salud [14].

**1.4.2 Hierro (Fe)** El hierro es un metal de transición cuyo símbolo químico es Fe, su número atómico es 26, peso atómico relativo 55,845g/mol, presenta niveles de

oxidación  $2^+$  y  $3^+$ , su configuración electrónica característica es  $[\text{Ar}]3d^64s^2$ . Es uno de los metales más abundantes en el universo, y el cuarto elemento en frecuencia en la corteza terrestre. Generalmente es encontrado en el suelo, siendo parte de diversos minerales, en el agua y en muchos alimentos<sup>[15]</sup>.

Es maleable, tenaz, de color gris plateado y magnético. Los cuatro isótopos estables, que se encuentran en la naturaleza, tienen las masas 54, 56, 57 y 58. Los dos minerales principales son la hematita,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , y la limonita,  $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Las piritas,  $\text{FeS}_2$ , y la cromita,  $\text{Fe}(\text{CrO}_2)_2$ , se explotan como minerales de azufre y de cromo, respectivamente. El hierro se encuentra en muchos otros minerales y está presente en las aguas freáticas y en la hemoglobina roja de la sangre.

La presencia del hierro en el agua provoca precipitación y coloración no deseada. Existen técnicas de separación del hierro del agua<sup>[16]</sup>.

**1.4.2.1 Efectos del hierro sobre la salud** El Hierro puede ser encontrado en carne, productos integrales, patatas y vegetales. El cuerpo humano absorbe Hierro de animales más rápido que el Hierro de las plantas. El Hierro es una parte esencial de la hemoglobina: el agente colorante rojo de la sangre que transporta el oxígeno a través de nuestros cuerpos.

Puede provocar conjuntivitis, coriorretinitis, y retinitis si contacta con los tejidos y permanece en ellos. La inhalación crónica de concentraciones excesivas de vapores o polvos de óxido de hierro puede resultar en el desarrollo de una neumoconiosis benigna, llamada siderosis, que es observable como un cambio en los rayos X. Ningún daño físico de la función pulmonar se ha asociado con la siderosis. La inhalación de concentraciones excesivas de óxido de hierro puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en trabajadores expuestos a carcinógenos pulmonares. LD50 (oral, rata) =30 mg/kg. (LD50: Dosis Letal 50. Dosis individual de una sustancia que provoca la muerte del 50% de la población

animal debido a la exposición a la sustancia por cualquier vía distinta a la inhalación. Normalmente expresada como miligramos o gramos de material por kilogramo de peso del animal.)<sup>[17]</sup>.

**1.4.3 Mercurio** El mercurio es un metal de transición se encuentra 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.m.a Es el único metal líquido a temperatura ambiente y su dilatación es uniforme a cualquier temperatura. Tiene un punto de  $-39^{\circ}\text{C}$  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 amalgama<sup>[18]</sup>. La solubilidad es muy variable, en agua es de 50 partes por billón (ppb) y el petróleo varia de 4 a 23 ppb<sup>[19]</sup>.

El mercurio forma soluciones llamadas amalgamas con algunos metales (por ejemplo, oro, plata, platino, uranio, cobre, plomo, sodio y potasio).

En sus compuestos, el mercurio se encuentra en los estados de oxidación  $2^{+}$ ,  $1^{+}$  y más bajos; por ejemplo,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  o  $\text{Hg}_3(\text{AsF}_6)_2$ . A menudo los átomos de mercurio presentan dos enlaces covalentes; por ejemplo,  $\text{Cl-Hg-Cl}$  o  $\text{Cl-Hg-Hg-Cl}$ . Algunas sales de mercurio (II), por ejemplo,  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  o  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ , son muy solubles en agua y por lo general están disociadas. Las soluciones acuosas de estas sales reaccionan como ácidos fuertes a causa de la hidrólisis que ocurre. Otras sales de mercurio (III), como  $\text{HgCl}_2$  o  $\text{Hg}(\text{Cn})_2$ , también se disuelven en agua, pero en solución sólo están poco disociadas.

Hay compuestos en que los átomos de mercurio están directamente enlazados a átomos de carbono o de nitrógeno; por ejemplo,  $\text{H}_3\text{C-Hg-CH}_3$  o  $\text{H}_3\text{C-CO-NH-Hg-NH-CO-CH}_3$ . En complejos, como  $\text{K}_2(\text{HgI}_4)$ , a menudo tiene tres o cuatro enlaces<sup>[20]</sup>.

**1.4.3.1 Efectos del Hg en la salud:** El mercurio puede provocar diversos efectos perjudiciales para la salud. El tipo y la gravedad de estos efectos en la salud dependen de la forma y la cantidad de mercurio a la que se esté expuesto, y de la cantidad de mercurio que se haya acumulado en el cuerpo con el tiempo. No es probable que los compuestos de mercurio inorgánico perjudiquen la salud de personas adultas con los niveles que se han encontrado a veces en los suministros de agua potable. Los niños pequeños son más sensibles que los adultos al mercurio inorgánico ya que sus cuerpos lo absorben más fácilmente. Se necesita más información sanitaria para determinar si la exposición a niveles bajos de mercurio inorgánico puede provocar efectos perjudiciales en las personas. En niveles elevados de contaminación (que no suelen encontrarse en el agua potable), el mercurio inorgánico puede afectar el sistema nervioso provocando síntomas como irritabilidad, nerviosismo, cambios en la vista y el oído, y problemas de memoria. En estudios realizados con animales, se ha demostrado que pequeñas cantidades de mercurio inorgánico pueden pasar del cuerpo de la madre al feto. Otros efectos sobre la salud, como daños en los riñones, ciertos tipos de tumores y cambios en el sistema inmunológico, han sido detectados en animales expuestos a niveles muy elevados de mercurio inorgánico.

Se desconoce si el mercurio inorgánico puede provocar estos efectos en las personas. Los compuestos de mercurio orgánico son las formas más perjudiciales del mercurio. La sangre los absorbe con facilidad a través del tracto digestivo y, en niveles elevados, puede llegar a dañar el sistema nervioso y los riñones. El mercurio orgánico es especialmente perjudicial para los niños pequeños puesto que puede penetrar con facilidad en el sistema nervioso e interferir en el desarrollo

del cerebro. También puede pasar fácilmente de la sangre de la madre al feto y provocar daños en el cerebro. No se dispone de suficiente información para demostrar que el mercurio orgánico provoca cáncer en las personas. Los efectos perjudiciales del mercurio en el sistema nervioso están bien documentados a partir de casos en los que algunas personas estuvieron expuestas a niveles elevados de mercurio en la comida y en el lugar de trabajo<sup>[21]</sup>.

**1.4.4 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 ( $\sim 5 \times 10^{-4}\%$  de la corteza terrestre). Si bien una gran cantidad de As en el medio ambiente proviene de fuentes naturales (meteorización, actividad biológica, emisiones volcánicas), existe una importante contribución a partir de actividades antropogénicas, tales como procesos industriales (minería, fundición de metales, pesticidas, conservantes de la madera, etc.).

El elemento puede estar presente en distintos estados de oxidación (-III, 0, III, V) y en formas inorgánicas y orgánicas, en un amplio rango de concentraciones en aire, agua, suelos, vegetales y animales. Las especies químicas más importantes son:

- Arseniato y otras formas inorgánicas de As(V)
- Arsenito y otras formas inorgánicas de As(III)
- Formas metiladas de As (V) como el ácido dimetilarsínico (DMA(V), el monometilarsonato (MMA(V)) y otras formas orgánicas de As(V).
- Formas metiladas de As(III) como el ácido dimetilarsenioso (DMA(III)) y otras formas orgánicas de As(III)
- Óxido de trimetilarsina (TMAO(V))
- Arsenobetaína (AB)
- Arsenocolina (AC)
- Cation tetrametilarsonio (TMA<sup>+</sup>)
- Arsenoazúcares

- Arsenolípidos
- Otras especies

Las formas fisicoquímicas individuales pueden incluir material particulado y formas disueltas como especies inorgánicas simples, complejos orgánicos o el elemento adsorbido en partículas coloidales. La especiación del arsénico en materiales ambientales es de interés debido a los diferentes niveles de toxicidad exhibidos por las distintas especies.

Con relación a este aspecto, el arsenito es la forma inorgánica más tóxica, 10 veces más que el arseniato. La toxicidad de especies metiladas de As(III) y As(V) es variada. AB y AC son virtualmente no tóxicas<sup>[22]</sup>.

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  $\text{As}^{+3}$  y  $\text{As}^{+5}$ , en menor proporción y poco comunes las especies  $\text{As}^0$  y  $\text{As}^{-3}$ . 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  $\text{As}^{+3}$  estado de oxidación más móvil y el de mayor toxicidad y dependiendo del pH se encuentran en esos estados<sup>[23]</sup>.

**1.4.4.1 Efectos del As en la salud** El Arsénico es uno de los más tóxicos elementos que pueden ser encontrados. Debido a sus efectos tóxicos, los enlaces de Arsénico inorgánico ocurren en la tierra naturalmente en pequeñas cantidades. Los humanos pueden ser expuestos al Arsénico a través de la comida, agua y aire.

La exposición puede también ocurrir a través del contacto con la piel con suelo o agua que contenga Arsénico.

Los niveles de Arsénico en la comida son bastante bajos, no es añadido debido a su toxicidad, pero los niveles de Arsénico en peces y mariscos puede ser alta, porque los peces absorben Arsénico del agua donde viven. Por suerte esto es mayormente la forma de Arsénico orgánico menos dañina, pero peces que contienen significantes cantidades de Arsénico inorgánico pueden ser un peligro para la salud humana.

La exposición al Arsénico puede ser más alta para la gente que trabaja con Arsénico, para gente que bebe significantes cantidades de vino, para gente que vive en casas que contienen conservantes de la madera y gente que viven en granjas donde el Arsénico de los pesticidas ha sido aplicado en el pasado.

La exposición al Arsénico inorgánico puede causar varios efectos sobre la salud, como es irritación del estómago e intestinos, disminución en la producción de glóbulos rojos y blancos, cambios en la piel, e irritación de los pulmones. Es sugerido que la toma de significantes cantidades de Arsénico inorgánico puede intensificar las posibilidades de desarrollar cáncer, especialmente las posibilidades de desarrollo de cáncer de piel, pulmón, hígado, linfa.

A exposiciones muy altas de Arsénico inorgánico puede causar infertilidad y abortos en mujeres, puede causar perturbación de la piel, pérdida de la resistencia a infecciones, perturbación en el corazón y daño del cerebro tanto en hombres como en mujeres. Finalmente, el Arsénico inorgánico puede dañar el ADN. El Arsénico orgánico no puede causar cáncer, ni tampoco daño al ADN. Pero exposiciones a dosis elevadas puede causar ciertos efectos sobre la salud humana, como es lesión de nervios y dolores de estómago <sup>[24]</sup>.

## 1.5 METALES EN EL MEDIO AMBIENTE

**1.5.1. Riesgos de la salud por contaminación con metales pesados** Algunos metales como cobalto, cromo, hierro, zinc, entre otros, son vitales en procesos metabólicos pues hacen parte de metaloenzimas, mientras otros como arsénico, mercurio y plomo tiene efectos adversos y no se conocen mecanismos de homeóstasis en humanos <sup>[25]</sup>. En los seres humanos, la deficiencia o el exceso de un oligoelemento puede influenciar la adsorción, distribución, metabolismo y la eliminación de otros. Por ejemplo la deficiencia de hierro, conocida como anemia hipocrómica, causa un aumento en la adsorción de plomo y cadmio en el tracto gastrointestinal <sup>[26]</sup>.

**1.5.1.1 Efectos medio ambientales del cobre** El cobre se encuentra en todos los compartimentos ambientales de forma natural, por lo que su acumulación a través de la cadena alimentaria debe provenir de su incorporación al medio por otras vías. Esta acumulación se realiza por procesos naturales, como pueden ser las erupciones volcánicas, los incendios forestales (no provocados), el polvo arrastrado por el aire, los restos de fauna y vegetación o la espuma del mar, y por las actividades antropogénicas, entre las más importantes se pueden citar: combustión de residuos y combustibles fósiles, aguas residuales industriales y urbanas, residuos de minería, producción de madera, producción de fertilizantes, etc. Cuando el cobre o sus compuestos se emiten al aire, como sucede con las plantas industriales que procesan el mineral de cobre, éste lo hace en forma de partículas que pueden ser arrastradas varios kilómetros desde la fuente de emisión.

Posteriormente, estas partículas se depositarán en el suelo debido a la gravedad o a las precipitaciones (lluvia o la nieve), o bien pueden llegar hasta el mar, donde se pueden unir a las partículas suspendidas en el agua, depositándose finalmente en los sedimentos. En el caso de las aguas residuales industriales o urbanas el

proceso es similar, ya que se acumula en los sedimentos de los ríos, lagos y estuarios. Una vez que el cobre llega a los sedimentos, si se producen alteraciones en las características fisicoquímicas del sistema, puede ocurrir que parte de éste se lixivie en el agua y sea absorbido por los distintos microorganismos presentes en el sistema, o sea retenido en forma particulada en el sistema de filtración de los organismos bénticos. Posteriormente, comienza su incorporación a la cadena trófica hasta poder llegar al hombre <sup>[14]</sup>.

**1.5.1.2 Efectos medio ambientales del hierro** El hierro (III)-O-arsenito, pentahidratado puede ser peligroso para el medio ambiente; se debe prestar especial atención a las plantas, el aire y el agua. Se recomienda encarecidamente que no se permita que el producto entre en el medio ambiente porque persiste en éste <sup>[16]</sup>.

**1.5.1.3 Efectos medio ambiente del mercurio** Varias formas de mercurio se dan de manera natural en el medio ambiente. Las formas naturales de mercurio más comunes en el medio ambiente son el mercurio metálico, sulfuro de mercurio, cloruro de mercurio y metilmercurio. Ciertos microorganismos y procesos naturales pueden hacer que el mercurio en el medio ambiente pase de una forma a otra.

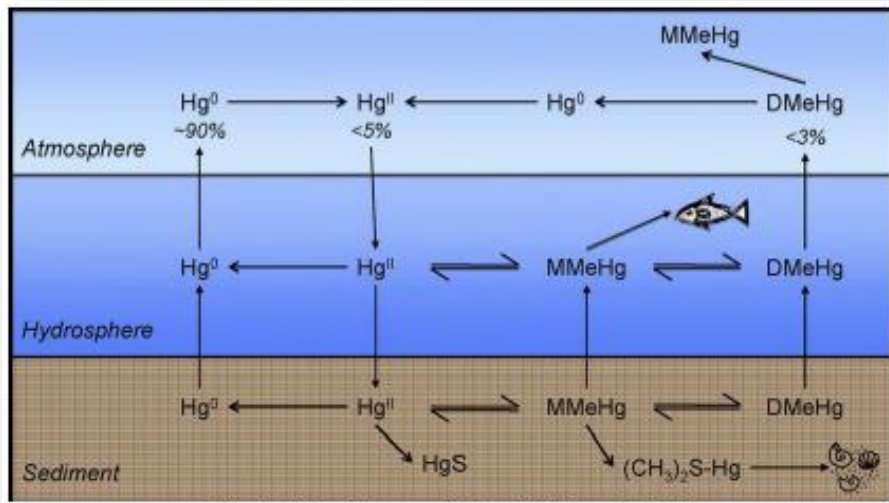
El mercurio elemental en la atmósfera puede transformarse en formas inorgánicas de mercurio, lo que abre una significativa vía para la sedimentación de mercurio elemental emitido. El compuesto orgánico de mercurio más común que generan los microorganismos y procesos naturales a partir de otras formas es el metilmercurio. El metilmercurio es particularmente inquietante porque puede acumularse (bioacumulación y biomagnificación) en muchos peces de agua dulce y salada comestibles, así como en mamíferos marinos comestibles, en concentraciones miles de veces mayores que las de las aguas circundantes.

Por tratarse de un elemento, el mercurio no se puede descomponer ni degradar en sustancias inofensivas. Durante su ciclo, el mercurio puede cambiar de estado y especie, pero su forma más simple es el mercurio elemental, de suyo nocivo para los seres humanos y el medio ambiente. Una vez liberado a partir de los minerales, o depósitos de combustibles fósiles y minerales yacientes en la corteza terrestre, y emitido a la biosfera, el mercurio puede tener una gran movilidad y circular entre la superficie terrestre y la atmósfera. Los suelos superficiales de la tierra, las aguas y los sedimentos de fondo se consideran los principales depósitos biosféricos de mercurio [27].

En condiciones naturales, el mercurio se da en alguno de los siguientes estados:

- Como vapor metálico y mercurio líquido/elemental
- Unido a minerales que contienen mercurio (sólido)
- Como iones en solución o unido a compuestos iónicos (sales inorgánicas y orgánicas)
- Como complejos iónicos solubles
- Como compuestos orgánicos no iónicos gaseosos o disueltos
- Unido a partículas o materia orgánica o inorgánica mediante adsorción iónica, electrofílica o lipofílica.

**Figura 1. Ciclo Biogeoquímico del mercurio [28].**



**1.5.1.4 Efectos del As 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, la concentración elevada de este elemento en el agua y en el suelo son considerados potencialmente tóxicos<sup>[29]</sup>.

**1.5.2. Metales presentes en el agua** Los metales presentes en el agua son diversos y generalmente contaminan los cuerpos de agua por la actividad humana, causando graves estragos al medio ambiente y a la población en general, disminuyendo la ya reducida cantidad de agua para consumo humano ya existente.

Las aguas procedentes de las industrias como la minería, la de recubrimientos metálicos, las fundidoras y otras más, contaminan el agua con diversos metales. Por ejemplo las sales de metales como el zinc, el mercurio, la plata y el cadmio

son muy tóxicas para la flora y fauna terrestres y acuáticas. Las sales solubles en agua de los metales pesados son muy tóxicas y acumulables por los organismos que las absorben, los cuales a su vez son fuente de contaminación de las cadenas alimenticias al ser ingeridos por uno de sus eslabones dentro de los cuales podría estar el hombre (procesos de bioacumulación y biomagnificación)<sup>[14]</sup>.

## 1.6 TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS

**1.6.1. Toxicidad Cobre** La ingesta diaria de cobre (Cu) varía enormemente dependiendo del tipo de dieta seguida. El Cu necesario para el mantenimiento de la fisiología normal en los humanos se obtiene tanto del agua como de los alimentos. El agua de bebida tiene una concentración promedio de 4-10 µg Cu/L, y en su mayoría se encuentra unido a la materia orgánica presente en ella.

**1.6.2. Toxicidad Hierro** El hierro es un metal esencial para todos los organismos vivos y es el segundo metal más abundante en la Tierra (cerca del 4,7% de la corteza de la Tierra es hierro). Debido a que forma parte de la hemoglobina de la sangre de los peces, debe ser incluido como uno de los ingredientes de su dieta. Cuando el hierro se presenta con una concentración demasiado alta en el agua, puede causar daño a los peces e incluso la muerte. El hierro se puede presentar en diferentes estados,  $\text{Fe}^{2+}$  (hierro ferroso) y  $\text{Fe}^{3+}$  (hierro férrico). Cuando el  $\text{Fe}^{2+}$ , entra en contacto con el aire, se oxida a  $\text{Fe}^{3+}$ . En peces, esta reacción puede generar obstrucción branquial por acumulación de hidróxido de hierro, causando efectos subletales o mortalidad. El tiempo que demore en presentarse esta adherencia de hierro, va a depender del pH del agua, su salinidad y su temperatura.

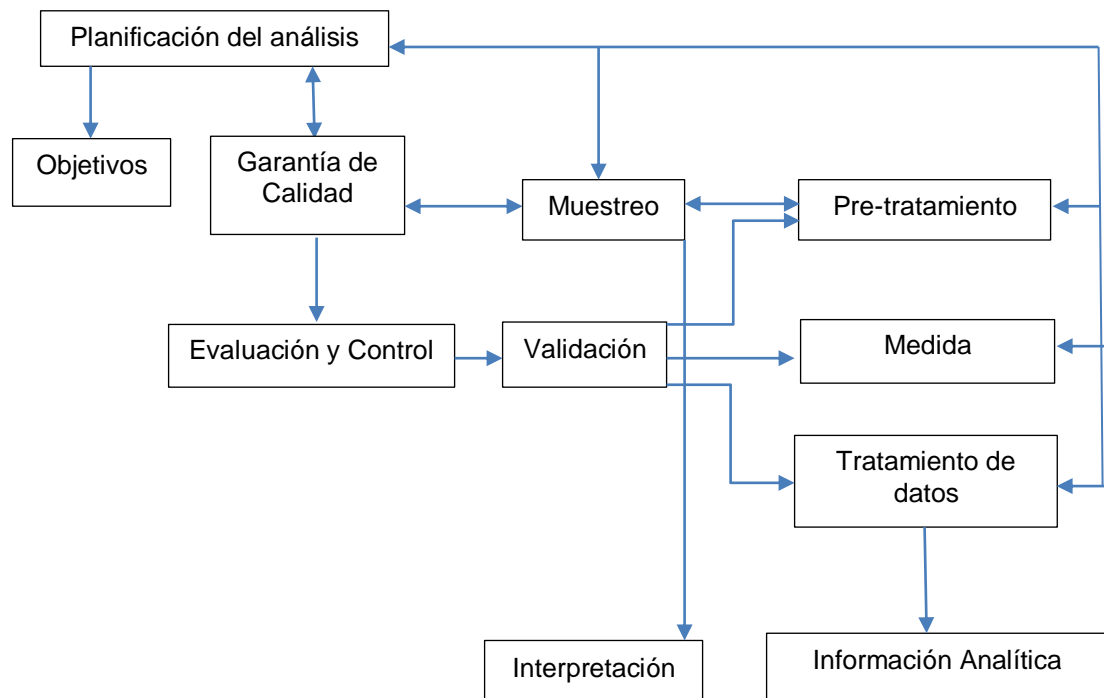
**1.6.3. Toxicidad Arsénico** La mayor fuente de contaminación de arsénico es por vía hídrica, ya que al ser un medio que transporta en mayor proporción que el suelo, tiene mayores posibilidades de contaminar cierta región y sus individuos.

**1.6.4. Toxicidad Mercurio** La toxicidad del mercurio depende de su forma química y, por lo tanto, los síntomas y signos varían según se trate de exposición al mercurio elemental, a los compuestos inorgánicos de mercurio, o a los compuestos orgánicos de mercurio (en particular los compuestos de alquilvercurio como sales de metilvercurio y etilvercurio, y el dimetilvercurio).

## **1.7 ANÁLISIS DEL RECURSO HIDRICO**

Para el desarrollo del análisis de sustancias contaminantes en agua se hace necesario contemplar la normativa de calidad SM, resolución 0631-2015, para así asegurar la eficacia del análisis, el cual está constituido por las siguientes etapas: muestreo, pre-tratamiento de la muestra, medición (mediante ensayos químicos y/o técnicas instrumentales) y tratamiento estadístico de datos obtenidos como se muestra en la figura N°2 <sup>[30]</sup>.

**Figura 2. Etapas del desarrollo para análisis de calidad de los recursos hídricos<sup>[30]</sup>.**



El objetivo de la etapa de muestreo es recolectar una muestra que sea representativa del cuerpo de agua que se requiere analizar. En este proceso se tienen en cuenta aspectos tales como la elección adecuada de los equipos y contenedores usados, así como la aplicación de protocolos de conservación de los analitos.

En la mayoría de los casos se requiere efectuar un pre-tratamiento a las muestras con el fin de eliminar o minimizar posibles interferencias, lo cual se logra por filtración, pre-concentración, separación, reacción previa y formación de derivados, entre otros. Una vez adecuada la muestra, se procede a la determinación del analito, para esto es necesario seleccionar el método más idóneo en función de la sensibilidad y selectividad requerida en el problema de análisis.

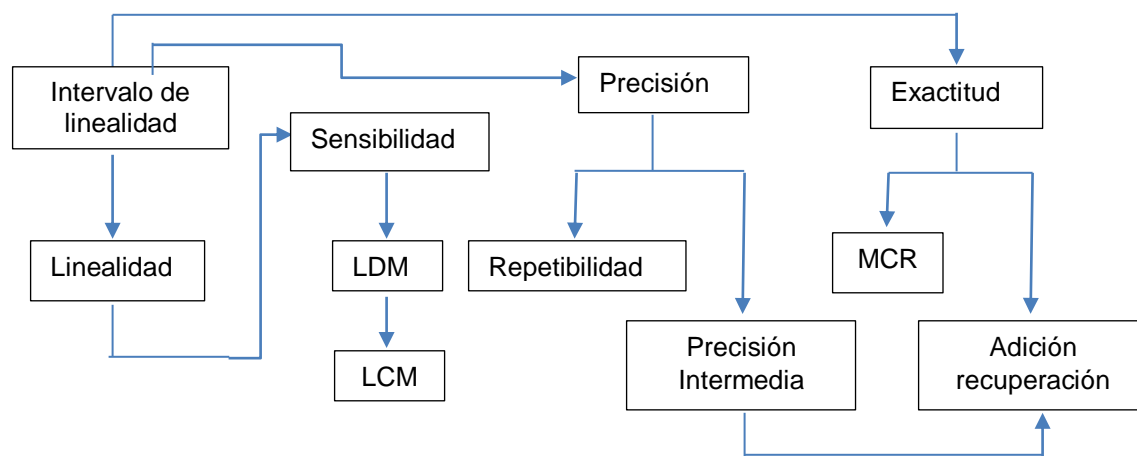
De esta forma, se obtendrán una serie de valores que posteriormente se transformarán mediante un tratamiento estadístico en resultados analíticos útiles para la interpretación medioambiental de los mismos. Esto se debe a que con base en ellos se llegan a establecer leyes y normas de mitigación, control de la contaminación y protección del medio ambiente<sup>[10]</sup>.

**1.7.1 Aseguramiento de la calidad analítica de datos ambientales** El aseguramiento de la calidad analítica es fundamental en los laboratorios de análisis ambiental, ya que expone a los clientes y a los organismos de control que las evaluaciones se hacen de forma transparente, objetiva, documentada, y que los procedimientos de todos los estudios o análisis ambientales requeridos por las autoridades competentes son confiables y de calidad.

Para garantizar la confiabilidad de las medidas se deben cumplir con una serie de actividades sistemáticas y planificadas, entre las cuales se encuentra la validación de las metodologías analíticas. Siendo este proceso un requisito de la norma NTC-ISO-IEC 17025.

Por tanto, los laboratorios deben validar todos los métodos que utilicen a través de la demostración formal de las figuras analíticas de mérito que se muestran en la figura N° 3 cuyo fin será la acreditación de cada uno de los métodos que se ofrecen en los laboratorios<sup>[10]</sup>.

**Figura 3. Figuras de mérito en la estandarización de metodologías analíticas<sup>[10]</sup>.**



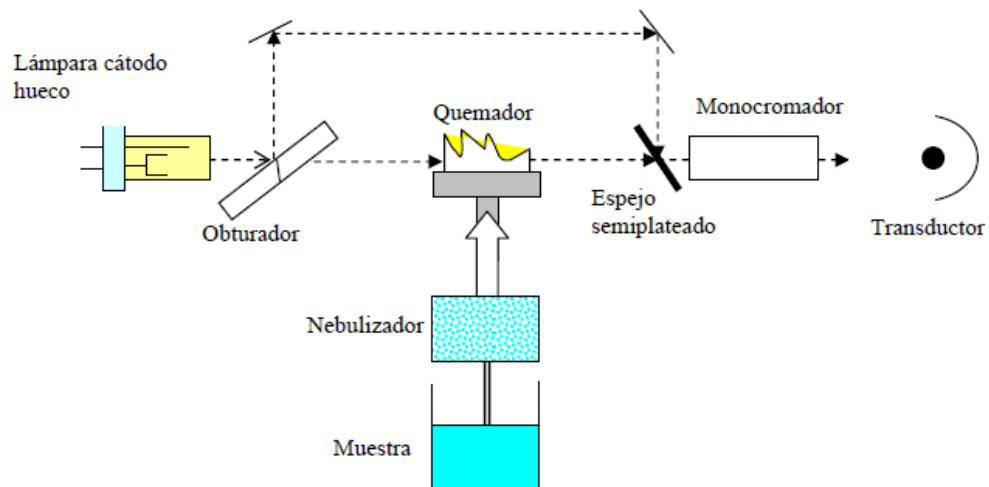
## 1.8. ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

**1.8.1. Generalidades de absorción atómica** La técnica de Absorción Atómica (AA) se fundamenta en la espectroscopia óptica; esta a su vez, parte de los diagramas de niveles de energía para explicar las posibles transiciones de los electrones externos a niveles superiores debido a la absorción de una cantidad de energía o longitud de onda específica según el tipo de átomo <sup>[31]</sup>.

Este método permite llevar a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo de entre 70 a 80 elementos. Los límites de detección para muchos de estos metales son menores a una parte por mil millones. La espectroscopia puede estar basada en la medición de absorción, emisión o fluorescencia, de las cuales la espectroscopia de absorción atómica es la que más se utiliza de las tres. En esta es necesario llevar la muestra a un estado de vapor atómico. Este proceso, conocido como atomización, consiste en volatilizar la muestra y descomponerla en sus átomos y quizá algunos iones gaseosos. Para la atomización de las muestras se utilizan principalmente la llama y la atomización al horno. El principio de operación de un

espectrómetro de absorción atómica se observa en la figura N° 4. La radiación del elemento que interesa, cuya fuente de luz suele ser una lámpara de cátodo hueco, se direcciona a través de una llama que contiene el gas atómico. La solución del analito se nebuliza por medio de un atomizador o nebulizador en finas gotas y se lleva a la llama. El disolvente de las gotas se evapora de inmediato y las partículas de sal se descomponen en sus átomos, iones y electrones. Los átomos de la muestra absorberán la radiación que emita el mismo átomo en la lámpara de cátodo hueco, con lo que se atenúa la energía de la fuente. Mediante un monocromador se separa la línea espectral del elemento que interesa de cualquier otra radiación que venga de la fuente o de la llama. La energía radiante de la llama se transforma en corriente eléctrica mediante un tubo fotomultiplicador <sup>[31]</sup>.

**Figura 4. Esquema espectrofotómetro de llama por absorción atómica de doble haz.**

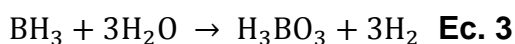
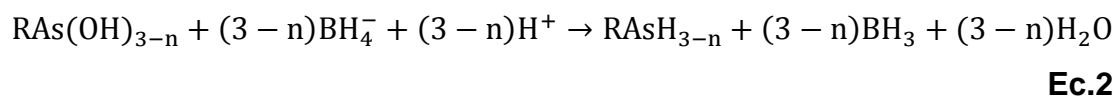
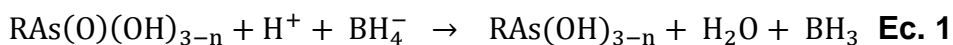


El análisis cuantitativo basado en la ley de Beer, para la absorción molecular, se aplica igualmente a la absorción atómica. Este método es bastante selectivo debido a que las líneas que emite la lámpara de cátodo hueco son muy finas (0,002 a 0,005 nm).

**1.8.2. Generación de Hidruros** [32] La generación de hidruros (HG) es un mecanismo complementario de atomización de la muestra de ensayo en espectrometría de absorción atómica; el analito reacciona con un agente reductor en un dispositivo externo, desde allí el hidruro formado es conducido por un gas de arrastre hacia una celda de cuarzo. Los elementos que pueden ser analizados son Te, Sn, Se, Sb, Pb, Ge, Bi, **As** y **Hg**.

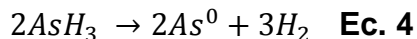
La técnica de absorción atómica con generación de hidruros permite cuantificar en el orden de ppb o ultratrazas elementos como **As**, Se, **Hg**, Sn, Sb, Ge, Bi y Te, que tienen la propiedad de formar el hidruro correspondiente. La muestra disuelta en ácido diluido se mezcla con un agente reductor, tal como una solución de cinc y ácido clorhídrico, cloruro de estaño ( $\text{SnCl}_2$ ) o borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ). 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 complicado, y se han propuesto las siguientes reacciones <sup>[33]</sup>, donde R se refiere a un radical orgánico o puede ser hidrógeno, por ejemplo:



Los hidruros volátiles como la arsina ( $\text{AsH}_3$ ) 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:



Al pasar la luz emitida por la lámpara a través del conjunto de átomos, la absorción crece a medida que éstos se producen, llega a un máximo y cae al consumirse el analito y agotarse los átomos de la celda de absorción. Se puede registrar el máximo de absorción, que corresponde a la altura de pico, o el área bajo la curva, para relacionarlas con la concentración del analito. La cuantificación de las diferentes especies de As puede realizarse separándolas antes de la formación del hidruro mediante procedimientos como la cromatografía <sup>[34]</sup>, o bien a través del cambio en las condiciones de formación de los hidruros como tiempos de reacción y reactivos específicos <sup>[33, 35, 36]</sup>.

En esta técnica, los metales disueltos son llevados a su forma atómica elemental mediante calentamiento por una llama generada por una mezcla de gases combustibles. Las mezclas más empleadas son: aire-acetileno y argón. Las temperaturas de la llama van de 1900 °C a 2800 °C.

Los átomos en forma de nube gaseosa, son irradiados por un haz de luz de una longitud de onda específica, de acuerdo con el metal analizado; esto se logra mediante el empleo de lámparas con cátodo del metal de interés o con lámparas de descarga sin electrodo. Los átomos absorben una fracción de la radiación proveniente de la lámpara y la fracción restante es captada por un fotodetector y un dispositivo transductor, que la convierten en una señal eléctrica, que posteriormente es registrada por un software.

Como se mencionó anteriormente, el valor de señal obtenido es proporcional a la concentración de los átomos presentes en la nube de gases; de este modo es

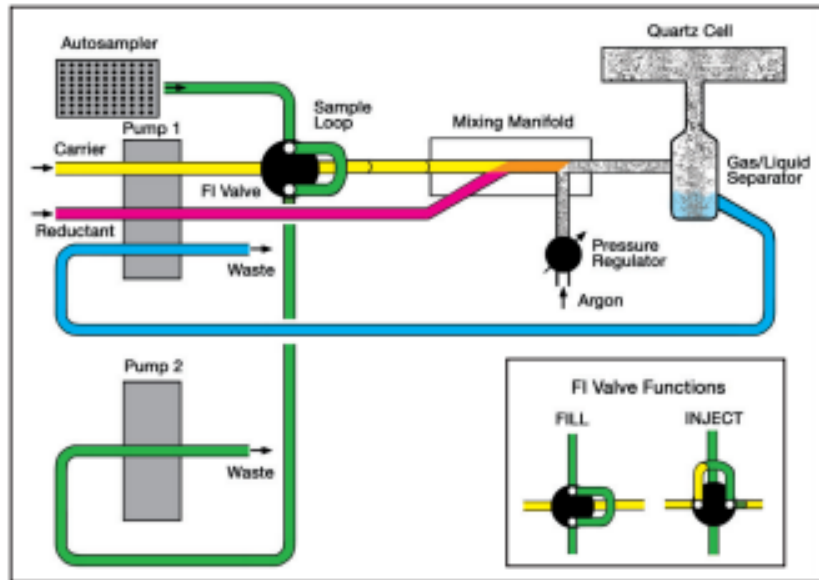
posible construir una curva de calibración analizando soluciones patrón de concentración conocida y midiendo la magnitud de la absorción de cada una de ellas.

Una variante de la absorción atómica por llama es la generación de hidruros donde se emplea para la determinación de algunos elementos volátiles y semivolátiles (**As, Hg, Se, Te, Bi, Sn y Sb**), cuya sensibilidad es muy baja al ser determinados por llama directa. Aplicando la técnica de generación de hidruros se alcanzan límites de detección del orden de 1 ppb.

En esta última, el analito reacciona con borohidruro de sodio y/o cloruro de estaño en medio ácido para formar el hidruro del metal, muy volátil. El hidruro del metal de interés es conducido hacia una celda calentada por la llama o calentamiento eléctrico, mediante un gas de arrastre inerte.

Una vez el vapor llega a la celda, el hidruro se descompone por acción de la temperatura liberando el metal en estado atómico; allí los átomos son irradiados por un haz de luz de longitud de onda específica y se produce la absorción <sup>[37]</sup>.

**Figura 5: Diagrama esquemático del sistema de FIAS 100 para la generación de hidruros automatizado tomado del manual fabricante Perkin Elmer.**



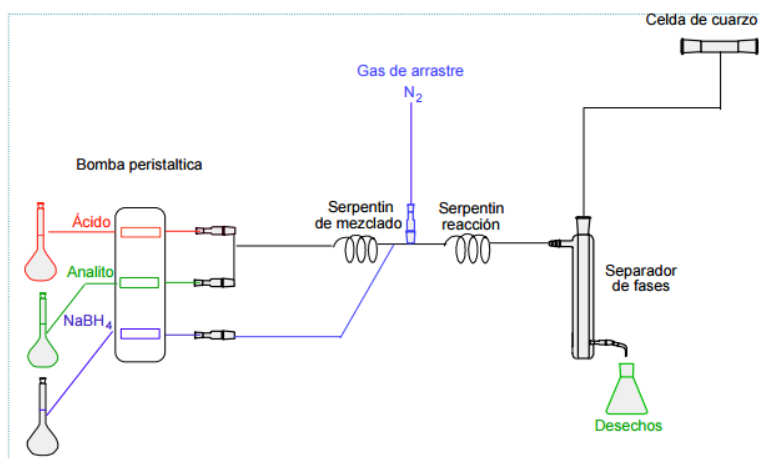
Existen básicamente tres modos de generación de hidruros en solución:

- ✓ Flujo continuo (FC)
- ✓ Inyección en flujo (IF) y
- ✓ De modo manual

### **Sistema de flujo continuo**

En el modo de generación de hidruros a través de flujo continuo, un flujo constante de la solución de la muestra se mezcla con un flujo constante de la solución de  $\text{NaBH}_4$  y el gas de purga. Las distintas fases (liquida y gaseosa) son luego separadas (en un separador de fases) y la mezcla de los gases resultantes es conducida hasta el atomizador, como se muestra en la figura 6 <sup>[3]</sup>.

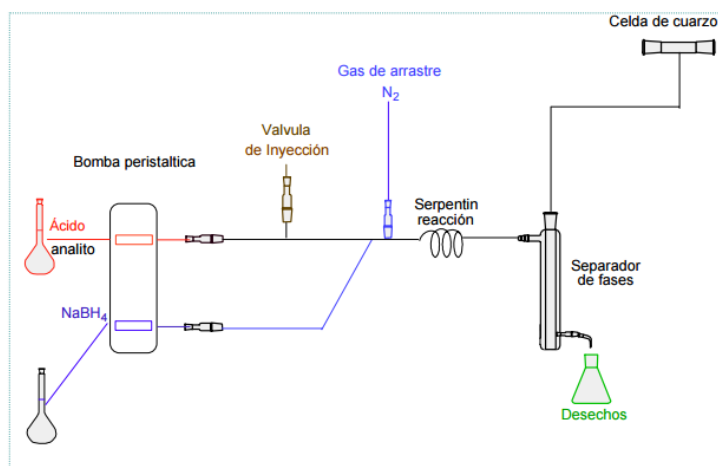
**Figura 6: Esquema de un sistema de generación de hidruros en Flujo Continuo con detección por Espectroscopia de Absorción Atómica<sup>[3]</sup>.**



### Sistemas de inyección en flujo

El modo de inyección en flujo es muy similar al de flujo continuo con una diferencia que en lugar de un flujo constante de muestra se utiliza un flujo constante de solución portadora en el cual se inyecta un segmento de la muestra, como se muestra en la figura 7. <sup>[3]</sup>

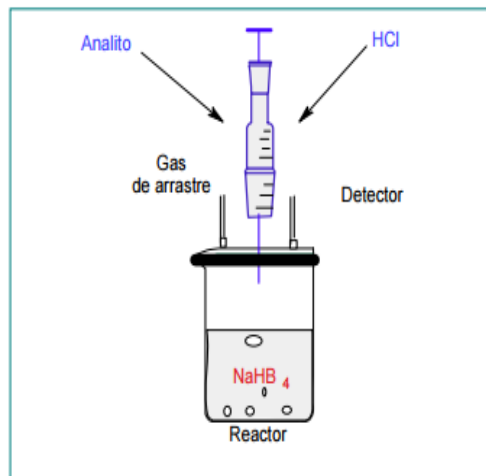
**Figura 7: Esquema de un sistema de generación de hidruros por inyección en Flujo con detección por Espectroscopia de Absorción Atómica. <sup>[3]</sup>**



### Sistemas en modo manual “*in Batch*”

En el modo manual, en un envase de vidrio o plástico el cual sirve tanto como de reactor como de separador de fases, se colocan de manera sucesiva una cantidad fija de solución de la muestra y del reductor ( $\text{NaBH}_4$ ), así finalmente el hidruro generado, es removido del envase con el gas de arrastre, como se muestra en la figura 8. [3]

**Figura 8: Esquema de un sistema por carga de generación de hidruros. [3]**



#### 1.8.3 Interferencias en absorción atómica por llama y generación de hidruros

Las interferencias en absorción atómica son tradicionalmente clasificadas en espectrales, químicas y físicas. Las interferencias espectrales se generan cuando dos elementos absorben a longitudes de onda muy similares, por ejemplo, la absorción del cobre ocurre a 324,754 nm y la absorción del europio es a 324,753 nm, un equipo de baja resolución no genera longitudes de onda diferenciables en la tercera cifra decimal, presentando problemas para su cuantificación, están asociadas al solapamiento de bandas espectrales que no pueden ser resueltas. Las interferencias químicas se presentan cuando se forman en solución compuestos muy estables que no se disocian en la atomización como por ejemplo la formación de sulfatos y fosfatos con metales alcalinos y alcalinotérreos, están

relacionadas con los procesos químicos que se llevan a cabo durante la atomización, los cuales modifican la absorción del analito. Las interferencias físicas ocurren cuando hay sólidos en suspensión que taponan los ductos y dañan la atomización. A continuación se describirán en detalle los dos tipos de interferencias que generan un mayor impacto:

**a. Interferencias químicas:**

- **Formación de compuestos estables:** Se genera por el efecto de aniones y cationes los cuales crean compuestos poco volátiles a la temperatura normal de la llama generando una reducción considerable en la sensibilidad, en ciertos casos es posible disminuir estas interferencias al aumentar progresivamente la temperatura de la llama. De igual manera, se emplean agentes liberadores que interactúan con el ión de interferencia para disminuir o evitar la formación de dichos compuestos, entre estos característicos están los iones de estroncio o lantano; para este mismo fin, se emplean agentes protectores los cuales generan compuestos estables de alta volatilidad en el analito de interés; también lo son estos tres ejemplos la sal de amonio del ácido 1-pirrodinacarboxílico (APDC), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y la 8-hidroxiquinolina.
- **Ionización:** Es característico en metales con fácil ionización, los iones generados por estos metales absorben longitudes de onda diferentes del átomo en su estado basal o neutro, por ende la respuesta obtenida corresponde a un número de especies menor que el real.
- **Equilibrios de disociación:** se da en la formación de diversos compuestos en el núcleo de la llama producto a la presencia de diferentes tipos de iones. Es aquí donde se genere posiblemente este equilibrio a su vez ocasiona una disminución en la señal.

**b. Interferencias espectrales:** no son muy frecuentes en absorción atómica, entre ellas se da la cercanía entre las longitudes de onda de algunos elementos, la formación de partículas sólidas que dispersan el haz proveniente de la lámpara de cátodo hueco y el efecto de la matriz en relación al analito de interés.

## 1.9 CUANTIFICACIÓN DE METALES PESADOS

La absorción atómica es considerada un método cuantitativo esta emplea la ley de Lambert-Beer, para relacionar la atenuación de la radiación proveniente del haz con la concentración del analito. Anexo a esto, se tiene en cuenta la longitud del camino óptico y el coeficiente de extinción molar <sup>[31]</sup>. La expresión matemática que resume esta ley está en la ecuación 5:

$$A = abC \quad \text{Ecuación N° 5}$$

Donde

A= Absorbancia de la muestra de ensayo

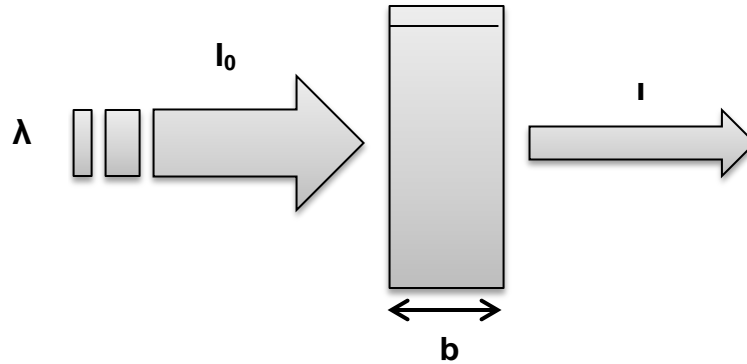
a= Absortividad molar

b= Longitud del camino óptico

C = Concentración del analito de interés

Toda especie molecular absorbe radiación electromagnética de su misma frecuencia. Este proceso genera una absorción de radiación del haz incidente proveniente de la fuente, esta es la respuesta de la disminución del haz, que finalmente es la señal obtenida que se amplificará por el fotomultiplicador, como se puede ver en la figura N° 9:

**Figura 9. Reducción de un haz de radiación por efecto de absorción.**



### 1.10 NORMATIVIDAD

En nuestro país la norma estipulada para la calidad del Agua está regida por la Resolución **2115**, en la cual se nombran características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia de la calidad del agua apta para el consumo humano <sup>[38]</sup>.

**Artículo 5°** Características Químicas que tienen reconocido efecto adverso en la salud humana

**Tabla 2: Valor aceptable para cobre, hierro, arsénico y mercurio según resolución 2115**

Elementos	Expresado como	Valor máximo aceptable (mg/L) <sup>[38]</sup>	Valor máximo aceptable (mg/L) <sup>[39]</sup>
Arsénico	As	0,01	0,10
Cobre	Cu	1,0	1,0
Hierro	Fe	--	Análisis y Reporte
Mercurio	Hg	0,001	0,002

Para el vertimiento de residuos líquidos, las concentraciones para el control de la carga de sustancias de interés sanitario deben ser de 0,01 mg As/L, 1 mg Cu/L, 0,02 mg Hg/L; Fe no registra<sup>[38]</sup> y en vigencia con la resolución N° 0631<sup>[39]</sup>. En Colombia existe una carencia de normas ambientales que decreten las concentraciones máximas permisibles para recomendar la protección de aguas en sitios contaminados con estos metales.

### **1.11 ACREDITACIÓN EN COLOMBIA**

La acreditación, basados en el decreto 2269/93 proceso mediante el cual se registra la competencia técnica y la idoneidad de organismos de certificación e inspección, laboratorios de ensayo y metrología.

Ventajas que cuentan los laboratorios que se acreditan:

- Asegurar el cumplimiento de condiciones de seguridad y calidad dentro de la competencia,
- Proporciona un comercio rápido y con menores costos de transacción,
- Muestra competitividad, seguridad en los productos ofrecidos y se abre al comercio internacional, ciencia y tecnología.

El papel de la acreditación es el de otorgar confianza a los resultados de evaluación de la conformidad respecto del cumplimiento de normas técnicas o reglamentos técnicos, basándose principalmente en el los procedimientos aceptados globalmente y la verificación de las condiciones de aseguramiento metrológico.

El proceso de acreditación es confiable puesto que es el resultado de un proceso global de definición de los requisitos, tanto de la actividad de acreditación y de los

organismos que la desarrollan como de cada uno de los tipos de organismos de evaluación de la conformidad que sean acreditables.

Confianza en la acreditación:

- Competencia técnica
- Independencia e imparcialidad
- Procedimientos globalmente aceptados
- Esquema de vigilancia
- Evaluación por pares / Reconocimiento internacional

La acreditación se debe realizar de conformidad con la norma NTC ISO/IEC 17011, aplicable al organismo de acreditación y de acuerdo con las normas técnicas para cada una de las modalidades de organismos de evaluación. El laboratorio de estudios ambientales de la Universidad Pontificia Bolivariana, se encuentra clasificado dentro de los laboratorios de ensayo o prueba, los cuales deben cumplir con la norma ISO/IEC 17025:1995.

Los aspectos que se evalúan en el proceso de acreditación son:

- Organización: existencia legal, imparcialidad.
- Competencia técnica: recurso humano, recursos documentales, trazabilidad y atestación.
- Sistema de gestión: manual de calidad, procedimientos, documentos <sup>[40]</sup>.

### **1.12 COMPETENCIA EN LOS LABORATORIOS NTC-ISO/IEC 17025**

La competitividad de los laboratorios de ensayo y calibración, es un factor determinante para avalar la confiabilidad de la respuesta de los mismos. La norma internacional ISO/IEC 17025, es una referencia documental de requisitos necesarios que todo laboratorio de ensayo y calibración debe implementar para demostrar confiabilidad en las mediciones.

Dentro de la selección de los métodos analíticos de análisis o calibración, los laboratorios pueden aplicar métodos y procedimientos convenientes para todos los ensayos, que se encuentren divulgados en normas internacionales y/o nacionales, libros o revistas técnicas especializadas, publicados por organizaciones técnicas reconocidas o especificados por el fabricante del equipo. Estos métodos deben ser validados para su aplicación en los laboratorios <sup>[15]</sup>.

### **1.13 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALITICOS**

Bajo el concepto de validación en la norma ISO 9000:2005, es la confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista. Dicho requisito analítico debe estar de acuerdo con el problema que se pretende resolver. Es por ello que la validación de métodos de ensayo, es el proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones del método, así como, la identificación de atributos que pueden modificar esas características <sup>[41]</sup>.

En este proceso, la determinación de los parámetros de desempeño o figuras de mérito, se debe realizar empleando equipos dentro de unas especificaciones de trabajo y calibración pertinente. Igualmente, el responsable de la validación debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo y debe poseer suficiente conocimiento del mismo, con el fin de garantizar la capacidad de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio <sup>[42]</sup>.

Dentro de las figuras de mérito más importantes a determinar, encontramos la exactitud, error, límite de cuantificación, límite de detección, precisión, recuperación, desviación estándar y estimación de la incertidumbre, entre otros.

**1.13.1 Exactitud** La exactitud se define como la proximidad entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado para la misma. Este término se describe normalmente por medio de errores absolutos y relativos. El error absoluto es la diferencia entre la media de un número de mediciones y el valor teórico aceptado como correcto. El error relativo es la división del error absoluto y el valor teórico, multiplicado por cien <sup>[42, 43]</sup>.

**1.13.1.1 Errores** Durante las diferentes mediciones en los ensayos, pueden presentarse desviaciones entre las diferentes medidas, estas desviaciones se pueden deber a los diferentes tipos de errores que se pueden presentar durante un proceso de medición. Estos errores pueden ser de dos tipos, aleatorios y sistemáticos. Los **aleatorios** son aquellos errores indeterminados, de los cuales no se conoce su naturaleza y que afectan la precisión de una medición. Los **sistemáticos**, son aquellos que pueden determinarse, y ocasionan que la media de una serie de datos difiera del valor aceptado (exactitud de las medidas); estos errores pueden ser debidos al instrumento, al comportamiento químico y físico no ideal de los sistemas analíticos, y los debidos al personal que realiza el análisis ya sea por falta de precaución o de experiencia <sup>[43]</sup>.

**1.13.1.2 Precisión** Es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones determinadas. La precisión depende sólo de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero esperado. La medida de la precisión generalmente, se expresa en términos de una desviación estándar de los resultados de la prueba. También puede expresarse en términos de la varianza y el coeficiente de variación <sup>[42, 43]</sup>.

**1.1.3.2 Desviación estándar** Es una medida del grado de dispersión de los valores alrededor de una media, es decir, la precisión que existe en una distribución de valores. La desviación estándar de una población de  $n$  valores,  $\sigma$ , está dada por la siguiente expresión <sup>[42]</sup>.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}{n}} \quad \text{Ec. 6}$$

Generalmente, en los ensayos se analiza una muestra y no toda la población. En este caso la desviación estándar para la muestra,  $s$ , está dada por <sup>[42.]</sup>:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Ec. 7}$$

**1.13.3 Sensibilidad** Es una medida de su capacidad de diferenciar pequeñas concentraciones de un analito. Cuantitativamente, la sensibilidad de calibrado de un método se define como la pendiente de la curva de calibración, es decir, la relación de la señal del método con respecto a la concentración de analito <sup>[43]</sup>.

**1.13.4 Recuperación** La recuperación es la fracción de analito adicionada a una muestra de prueba (muestra adicionada), previa al análisis que es determinada efectivamente por el método; este parámetro se expresa en porcentaje de recuperación (%R), y se calcula de la siguiente forma:

$$\%R = \left[ \frac{CF - CU}{CA} \right] * 100 \quad \text{Ec. 8}$$

Donde CF es la concentración de analito medida en la muestra fortificada, CU es la concentración de analito medida en la muestra sin fortificar y CA es la concentración del analito adicionado en la muestra fortificada <sup>[42]</sup>.

**1.13.5 Límite de detección y cuantificación del método** El límite de detección del método (LDM) se define como, la menor concentración de analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo unas condiciones establecidas de análisis. El límite de cuantificación del método es la

menor concentración de un analito que puede determinarse con una precisión y una exactitud determinada, bajo unas condiciones de ensayo establecidas [42, 43].

**1.13.6 Incertidumbre** La incertidumbre es un parámetro asociado al resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando. Esta dispersión de los resultados que pueden ser atribuidos al mensurando, se cuantifican con la incertidumbre [42,44].

La incertidumbre de la medición comprende en general muchos componentes. Algunos de ellos pueden evaluarse a partir de la distribución estadística de los resultados de una serie de mediciones y pueden caracterizarse por medio de desviaciones estándar experimentales. Los otros componentes, que también pueden ser caracterizados por desviaciones estándar, son evaluados a partir de distribuciones de probabilidad supuestas basadas en la experiencia u otra información. Se entiende que el resultado de la medición es la mejor estimación del valor del mensurando y que todos los componentes de la incertidumbre, incluyendo aquéllos provenientes de efectos sistemáticos, contribuyen a la dispersión [42].

Dentro de las diferentes fuentes de incertidumbre que puede tener una medida, encontramos la incertidumbre debido a la pesada en una balanza, a la medición de un volumen, a un aforo, a la calibración de un equipo, entre otros.

**1.13.6.1 Clasificación de la incertidumbre** Para poder cuantificar el valor de la incertidumbre, es necesario saber el tipo de incertidumbre que se nos puede presentar, ya sea tipo A o tipo B. La incertidumbre tipo A, es aquella que podemos hallar experimentalmente en el laboratorio, por medio de replicados en el laboratorio y proviene de los errores aleatorios [15].

La incertidumbre tipo B, es aquella que podemos obtener de la información de un certificado bien sea de calibración, de pureza de un reactivo, de la tolerancia del material volumétrico, de manuales de instrumentos, entre otros. Este tipo de incertidumbre está asociada a los errores sistemáticos <sup>[15]</sup>.

Para el cálculo de la incertidumbre, existen diferentes formas, dependiendo de las funciones de distribución de las variables a analizar:

- **Distribución rectangular:** es la encontrada en los certificados de calidad y magnitudes descritas por rangos. Se calcula de la siguiente forma <sup>[45]</sup>:

$$u(x) = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad \text{Ec. 9}$$

- **Distribución triangular:** en este tipo de distribución, la información disponible acerca de x, es menos limitada que la de un rectángulo distribución. Una estimación se hace en forma de un rango máximo ( $\pm a$ ) descrita por una distribución simétrica. En este caso la incertidumbre se calcula <sup>[45]</sup>:

$$u(x) = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad \text{Ec. 10}$$

- **Distribución normal:** se hace una estimación a partir de observaciones repetidas de un proceso variable. Este tipo de incertidumbre se da en forma de una desviación estándar s, desviación estándar relativa s/x, o como un coeficiente de variación CV% <sup>[45]</sup>:

$$u(x) = s ; \quad u(x) = x * (s/\bar{x}); \quad u(x) = \frac{CV\%}{100} * x$$

**1.13.6.2 Incertidumbre estándar (u(xi))** Es la incertidumbre del resultado de una medición expresada como una desviación estándar <sup>[42, 45]</sup>.

**1.13.6.3 Incertidumbre estándar relativa ( $u(x_i)/x_i$ )** Se obtiene dividiendo la incertidumbre estándar  $u(x_i)$ , entre el valor de  $x_i$ . De esta forma la incertidumbre estándar relativa no posee unidades de medida.

**1.13.6.4 Incertidumbre estándar expandida ( $u_c(y)$ )** Es la incertidumbre estándar del resultado de una medición, cuando el resultado se obtiene a partir de los valores de un cierto número de otras magnitudes y es igual a la raíz cuadrada positiva de una suma de términos, siendo éstos, las varianzas o covarianzas de esas otras magnitudes ponderadas, de acuerdo a como varía el resultado de la medición con respecto a esas magnitudes <sup>[42, 45]</sup>.

**1.13.6.5 Incertidumbre expandida ( $U$ )** Magnitud que define un intervalo alrededor del resultado de una medición, del que se espera, cubra una fracción grande de la distribución de los valores, que podrían atribuirse razonablemente al mensurando [5,8]. Para calcular la incertidumbre expandida se procede del siguiente modo:

$$U = k * u_c$$

Siendo  $k$  un factor numérico para expandir la incertidumbre combinada  $u_c$ .

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 PRE-VALIDACIÓN

**2.1.1 Pre-validación del método para la cuantificación de cobre, hierro, mercurio y arsénico por las técnicas de faa y hgaas** La pre-validación es fundamental y pre-requisito en una validación; conformada por una secuencia de verificaciones que permiten adquirir información notable y direccionada en el proceso de la validación propiamente dicha. Previamente antes de iniciar la validación se revisaron aspectos técnicos y operativos relacionados con cada una de las etapas de la metodología; se realizó una lista de reactivos y materiales de referencia certificados (**MCR**) esto involucro el desempeño de la toma de muestras, preparación de reactivos, diluciones, elaboración de la curva de calibración y lectura de los patrones y muestras en el equipo.

Se buscó verificar las condiciones idóneas de trabajo, en cuanto a equipos, materiales y en la metodología propiamente mencionada.

Se reconocieron y ubicaron los reactivos, patrones y material de referencia certificado (CRM) precisos para efectuar la validación; éstos se muestran en las **Tablas 3, 4, 5, 6.**

De los reactivos y estándares utilizados se verificó su ficha técnica, para conocer la fecha de vencimiento, precauciones de manejo, pureza, cantidad y conservación del reactivo puro o en solución (si es el caso).

**Tabla 3. Reactivos, estándares y CMR que se emplearon en la validación del método para cuantificar Cu en aguas residuales por la técnica FAA.**

Cobre total FAA	Casa Comercial	Lote	Procedencia
Ácido Clorhídrico	MERCK	B1139514	Alemania
Ácido Nítrico	MERCK	B1065718	Alemania
Patrón de Cobre (Cu). Certipur (1000mg/L ±2mg/L)	PerkinElmer Pure	19-133CUIY1	Estados Unidos

**Tabla 4. Reactivos, patrones y CMR que se emplearon en la validación del método para cuantificar Fe en aguas residuales por la técnica FAA.**

Hierro total FAA	Casa Comercial	Lote	Procedencia
Ácido Clorhídrico	<b>MERCK</b>	<b>B1139514</b>	<b>Alemania</b>
Ácido Nítrico	MERCK	B1065718	Alemania
Carbonato de Calcio	MERCK	A0532666402	Alemania
Patrón de Hierro (Fe). Certipur (1000mg/L ±2mg/L)	PerkinElmer Pure	19-216FEY1	Estados Unidos

**Tabla 5. Reactivos, patrones y CMR que se emplearon en la validación del método para cuantificar Hg en aguas residuales por la técnica HGAAS.**

Mercurio total HGAAS	Casa Comercial	Lote	Procedencia
Ácido Clorhídrico	<b>MERCK</b>	<b>B1139514</b>	<b>Alemania</b>
Ácido Nítrico	MERCK	B1065718	Alemania
Ácido Sulfúrico	MERCK	K45385816435	Alemania
Cloruro de Estaño Dihidratado	J.T. Baker	3980-01	México
Hidróxido de Sodio	MERCK	B1029598420	Alemania
Persulfato de Potasio	MERCK	0057501	Alemania
Clorhidrato	Carlo Erba	0D305050E	Italia

Mercurio total HGAAS	Casa Comercial	Lote	Procedencia
Hidroxilamina			
Patrón de Mercurio (Hg). Certipur (1000mg/L ±2mg/L)	PerkinElmer Pure	19-23HGX1	Estados Unidos
Permanganato de Potasio	MERCK	K41205882	Alemania

**Tabla 6. Reactivos, patrones y CMR que se emplearon en la validación del método para cuantificar As en aguas residuales por la técnica HGAAS.**

Arsénico total FAA	Casa Comercial	Lote	Procedencia
Ácido Clorhídrico	MERCK	B1139514	Alemania
Ácido Nítrico	MERCK	B1065718	Alemania
Borohidruro de Sodio	Panreac	0000410779	España
Hidróxido de Sodio	MERCK	B1029598420	Alemania
Patrón de Arsénico (As). Certipur (1000mg/L ±2mg/L)	PerkinElmer Pure	18-200ASX1	Estados Unidos
Yoduro de Potasio	MERCK	B0535443	Alemania

**2.1.1.1 Verificación del material volumétrico** Se examinó el material volumétrico necesario para la implementación de las metodologías, se seleccionó el material aforado requerido para las validaciones. Se clasificó el material en dos tipos, volumen *in* y volumen *ex*. Todo el material utilizado en la validación fue material clase A, previamente calibrado por un laboratorio externo, según los protocolos internos del LEA. Es importante mencionar que antes de realizar cualquier ensayo, se siguió el protocolo de lavado y secado del material.

## **Protocolo de lavado y secado**

Para el lavado y secado del material se siguió el siguiente protocolo implementado en el LEA:

- Sumergir completamente el material en una solución de jabón neutro Extran al 2 % por 2 horas.
- Enjuagar el material con abundante agua del grifo hasta descartar completamente la capa jabonosa adherida al material.
- Dejar en sumersión en solución de ácido nítrico al 10% asegurando un  $\text{pH} \leq 2$  por 12 horas.
- Enjuagar con abundante agua de grifo.
- Finalmente purgar el material con agua tipo I.
- Colocar el material después del lavado en el área de secado, este se deja secar por goteo. Asegurando que los balones se deben almacenar boca abajo y las pipetas y buretas se deben almacenar en forma vertical.
- Finalmente secado el material, se debe guardar para protegerlo del polvo.

## **2.2 VERIFICACIÓN DE EQUIPOS**

Se organizaron en un listado de equipos empleados en la validación, a los cuales se les efectuó el mantenimiento preventivo correspondiente y las calibraciones que certificaron condiciones idóneas de su funcionamiento.

**2.2.1 Espectrofotómetro** El Laboratorio de Estudios Ambientales de la Universidad Pontificia Bolivariana cuenta con un espectrofotómetro AA400 verificado por la empresa Perkin Elmer a través de POLCO (Colombia) que por medio de sus servicios posventa efectuó esta labor en el laboratorio

**2.2.2 Equipo de absorción atómica** Todas las medidas de absorbancia de los metales a validar se llevaron a cabo en un ***Espectrofotómetro de Absorción Atómica AANALYST 400 Perkin Elmer*** para los metales analizados por llama, posteriormente las reacciones para generar el mercurio como vapor frío y el hidruro de arsénico, se realizaron en el ***FIAS 100 Flow Injection System Perkin Elmer***. Estos equipos recibieron mantenimiento y calibración por la empresa Perkin Elmer a través de POLCO (Colombia) el 31 de Julio de 2015.

**2.2.3 Equipos menores** En la implementación de las metodologías se empleó un, manta de agitación, sistema de filtración, desecador y un vortex, estos equipos no requieren calibraciones para el uso previsto, sólo se verificó su correcto funcionamiento.

**2.2.3.1 Verificación de la balanza analítica Sartorius BP211D** En el tiempo en el que se usó la balanza analítica, se realizaron las correspondientes verificaciones con una pesa de 2g, 20g y 100g previamente calibradas, se construyó la carta de control analítico para la balanza y se identificaron los errores máximos permitidos. Como control de la calidad analítica de los resultados, la balanza fue sometida a procedimientos de calibración desarrollados por la empresa MetroLabor Ltda. (Bogotá, Colombia) organización autorizada para realizar calibración de balanzas, la cual verificó y calibró la balanza analítica y expidió el correspondiente certificado de calibración **NC MET-LM-CC 9669** Marzo 7 de 2015.

**2.2.3.2 Verificación Microwave** Para las correspondientes digestiones de las muestras y estándares se utilizó este equipo con un rotor 12HVT50 capacidad de 12 tubos de teflón, tipo de aplicación digestión, múltiples vasos que soportan temperaturas y presiones establecidas para cada metal correspondientes al método. Como control de calidad analítica de los resultados, esta digestión asistida por microondas fue sometida a procedimientos de calibración

desarrollados por la empresa POLCO (Colombia) organización autorizada para realizar la verificación, mantenimiento y posterior calibración del correspondiente, el 27 de Julio de 2015.

**2.2.3.3 Verificación Baño Termostatado** Para la digestión de estándares y muestras para Hg se empleó un baño termostatado para este se verifico en el intervalo de tiempo la temperatura con un termómetro de alcohol previamente calibrado. Como control de la calidad analítica de los resultados, el termómetro empleado para la lectura y control de la temperatura en la digestión fue sometido a procedimientos de calibración desarrollados por la empresa **MetroLabor Ltda.** (Bogotá, Colombia) organización autorizada para realizar calibración de termómetros, la cual verificó y calibró el termómetro y expidió el correspondiente certificado de calibración **NC MET-LT-CC 1125**, Julio 7 de 2015.

## **2.3 DETERMINACIÓN DE FIGURAS DE MÉRITO**

Para el desarrollo experimental se establecieron las siguientes figuras de mérito.

- ✓ Límite de detección del método
- ✓ Límite de cuantificación
- ✓ Linealidad
- ✓ Sensibilidad
- ✓ Recuperación
- ✓ Precisión
- ✓ Exactitud
- ✓ Incertidumbre

**2.3.1 Chequeo de procedimientos** En cada una de las metodologías realizadas se verificaron los procedimientos propuestos para validar e implementar sea el caso; para cuantificación de los metales como sus correspondientes digestiones.

## **2.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS**

En este apartado se describe detalladamente los procedimientos implementados para el cálculo de las principales figuras de mérito y la estimación de la incertidumbre de los métodos, como criterio de confianza en las metodologías.

**2.4.1 Optimización de variables instrumentales** Se comprobaron y determinaron las condiciones instrumentales propias para el desarrollo de cada una de las técnicas validadas, buscando así garantizar todos los parámetros exigidos y tener la seguridad que los resultados de las lecturas de los estándares y muestras en el equipo se encaminaran a la confiabilidad y exactitud requerida. El fabricante del equipo recomienda la optimización de ciertas variables, estas se examinaron con base en esa información.

### **a. Optimización del método de llama**

Inicialmente se realizan los ajustes requeridos para la técnica entre los cuales están la posición del haz de luz este debe estar plenamente alineado y centrado, altura del quemador, acondicionamiento nebulizador para que el valor de la señal muestre una mayor absorbancia, se ajustó el cero, para el gas de combustión se empleó una mezcla Aire-Acetileno a una presión de entrada de 60 psi en aire y 60 psi en acetileno y un flujo de 10/1,86 L/min, también se acondiciono la técnica para los metales previstos a analizar, dichos ajustes se resumen en la tabla 7:

**Tabla 7. Acondicionamiento Método de FAA para Cu y Fe**

Metal	Flujo Llama Aire/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (L/min)	Concentración de Chequeo (mg/L)	Abs	λ (nm)
Cu	10/1,86	1	0,176	324,7
Fe	10/1,86	1	0,0573	248,3

En cuanto al metal hierro se requirió una solución no interferente de carbonato de calcio producto de la poca absorción por átomos unidos en combinación molecular de la llama, donde se buscó estabilizarse para obtener una mejor lectura de absorbancia, esta solución se le adicione a los estándares y muestras digeradas para posterior lectura.

**Fotografía 1. Montaje Técnica de Llama para Cu y Fe.**

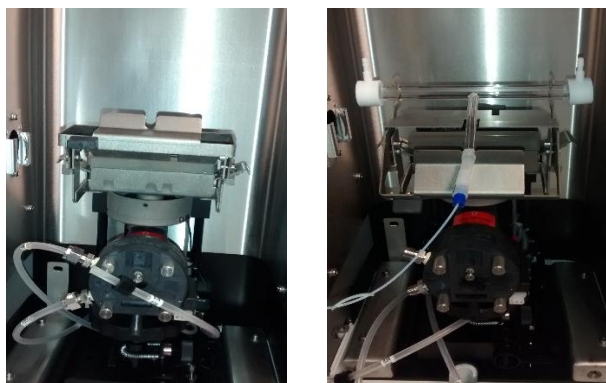


**2.4.1.1 Tiempo de pre-Lectura de la muestra** Este tiempo de pre-Lectura de la muestra (delay time), es el tiempo correspondiente a la toma de la muestra en el quemador el cual es para Cu de 30 s y Fe 30 s, en el generador para As y Hg es de cero segundos. Este tiempo es debido al uso del automuestreador.

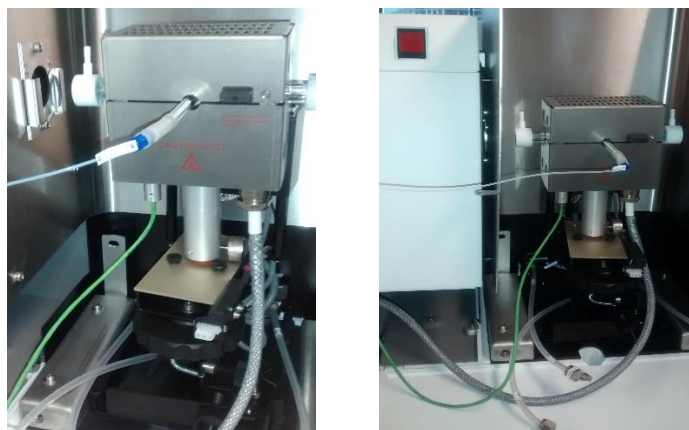
## b. Optimización del método de generación de hidruros

se realizan los ajustes requeridos para la técnica entre los cuales están las lámparas, la posición del haz de luz el cual debe estar plenamente alineado y centrado, altura del quemador, acondicionamiento de la celda de cuarzo en vapor frío como el flujo continuo para la generación del correspondiente hidruro para que el valor de la señal muestre una mayor absorbancia de acuerdo a su correspondiente montaje ver figuras 2 y 3.

**Fotografía 2. Montaje Técnica Generación de Hidruros Vapor Frio para Hg.**



**Fotografía 3. Montaje Técnica Generación de Hidruros Flujo continuo para As.**



Siguiendo el SM; se llevó a cabo un acondicionamiento para los metales de análisis en esta técnica, se sintetiza en la tabla N° 8:

**Tabla 8. Acondicionamiento Método de HGAAS para Hg y As**

Metal	Solución Portadora HCl (%v/v)	Solución Reductante			Concentración de Chequeo (µg/L)	Abs	λ (nm)
		NaBH <sub>4</sub> (%p/v)	SnCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O(%p/v) al 3%HCl	NaOH (%p/v)			
Hg	3	-	1,1	-	10	0,1	253,7
As	10	0,2	-	0,05	10	0,45	193,7

Para el mejoramiento de la eficiencia en la lectura de los metales a determinar por FIAS, se encontró que es necesario revisar periódicamente la membrana portadora en el reactor la cual debe estar completamente seca al momento de realizar la lectura.

**Tabla 9. Condiciones recomendadas por el equipo FIAS 100 de Perkin Elmer para As.**

Elemento As					
Condiciones técnicas del método					
λ (nm)	Ancho de Hendidura (mm)	Temperatura de la celda (°C)	Bomba 1 Velocidad	Flujo del Gas de arrastre (mL/min)	Volumen de muestra loop (µL)
193,7	2,7/2,3	900	120	50-100	500
<b>Chequeo de Sensibilidad con un loop de 500 µL de 10 µg As/L (ABS): 0,45</b>					

**Tabla 10. Condiciones recomendadas por el equipo FIAS 100 de Perkin Elmer para Hg.**

<b>Elemento Hg</b>					
Condiciones técnicas del método					
$\lambda$ (nm)	Ancho de Hendidura (mm)	Temperatura de la celda (°C)	Bomba 1 Velocidad	Flujo del Gas de arrastre (mL/min)	Volumen de muestra loop ( $\mu$ L)
253,7	2,7/1,05	10	120	40-70	500
<b>Chequeo de Sensibilidad con un loop de 500 <math>\mu</math>L de 10 <math>\mu</math>g Hg/L (ABS): 0,10</b>					

**2.4.1.2 Toma y preservación de muestras** Generalmente todas las muestras se recolectan en botellas de plástico con capacidad de 2 L previamente limpias y purgadas con la muestra a recolectar, el Hg por ser un metal de mayor complejidad por su grado de volatización se recolectaron las muestras en recipientes de polipropileno para Hg en borosilicato ámbar, normalmente para todas las muestras se preservaron acidificándolas con ácido nítrico concentrado ( $\text{HNO}_3_{\text{conc}}$ ). Usualmente 1,5 mL de  $\text{HNO}_3_{\text{conc}}$  por Litro de muestra (o 3 mL 1+1  $\text{HNO}_3$ /L muestra) fueron suficiente para la preservación a corto plazo. Para muestras con alta capacidad de tampón, se incrementará la cantidad de ácido (5 mL podría ser requerido para algunas muestras alcalinas o altamente tamponadas).

Después de acidificar las muestras, se almacenaron en un refrigerador a aproximadamente 4°C para prevenir cambio en el volumen debido a la evaporación. Bajo estas condiciones, las muestras con concentración de metal de varios miligramos por litro son estables hasta 6 meses, excepto para mercurio, para el cual el límite es de 28 días (Standard Methods 1060C, 22th Edition 2012). Para niveles de metales de microgramo por litro, analizar las muestras tan pronto como sea posible después de la recolección de la muestra, todas las muestras de agua son provenientes de la quebrada **MENZULY**.

**2.4.1.3 Determinación de cobre y hierro total en aguas** El LEA se rigió estrictamente al procedimiento propuesto por el SM 3111B para el análisis de trazas de metales en aguas residuales, bajo lineamiento de normas vigentes.

### **Principio**

En la espectrometría de absorción atómica por llama, una muestra es aspirada en una llama y atomizada. Un haz de luz es dirigido a través de la llama, a un monocromador y sobre un detector que mide la cantidad de luz absorbida por el elemento atomizado en la llama. Para algunos metales, la absorción atómica exhibe una sensibilidad superior sobre emisión de llama. Debido a que cada metal tiene su propia longitud de onda de absorción característica, se utiliza una lámpara de fuente compuesta para cada elemento; esto hace al método relativamente libre de interferencias espectrales o radiación. La cantidad de energía a la longitud de onda característica que absorbe en la llama es proporcional a la concentración del elemento en la muestra sobre un rango límite de concentración.

El método de absorción atómica por llama generalmente es aplicado a concentraciones moderadas de (0,1 a 10 mg/L) en muestras limpias y matrices complejas.

**2.4.1.3.1 Método de Referencia para Cu y Fe** Para la determinación y cuantificación de Cu y Fe en aguas residuales por la técnica de FAA se siguió la metodología establecida en el Standard Methods for the Examination of Water and Waster, 3111B METALS BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY p. 3-18 a 3-20, 22th Edition 2012 y digestión de las muestras basado en la norma internacional EPA 3015 A (half-scale), de acuerdo con las indicaciones del equipo Multiwave GO.

▪ **Reactivos para la digestión de Cu y Fe**

- I. El ácido nítrico concentrado (HNO<sub>3</sub>); (densidad: 1.37 g/cm<sup>3</sup> (20 °C)): nivel de ensayo libre de trazas de metales no es exceder de 1 g / L por metal. Grado reactivo.
- II. El ácido clorhídrico concentrado (HCl); (densidad: 1.19 g/cm<sup>3</sup> (20 °C)): nivel de ensayo libre de trazas de metales no es exceder de 1 g / L por metal. Grado reactivo.

**a. Digestión para Cu, Fe**

Sólo se digestan las muestras. Los estándares para la curva de calibración en FAAS se preparan con agua acidulada y no se digieren, caso diferente ocurre con los estándares para la curva de calibración de As que si requieren digestión, las muestras y controles de calidad se sometieron a digestión bajo las mismas condiciones según tabla N° 11. Condiciones del Multiwave digestión de muestras y controles de calidad:

**Tabla 11. Condiciones del Multiwave digestión de muestras y controles de calidad para Cu y Fe.**

T-Limite (°C)	Mezcla de Reactivos (mL)	Volumen de muestra (mL)	Volumen total en el recipiente (mL)	Programa
200	2 mL HNO <sub>3</sub> conc. + 0,5 mL HCl conc.	22,5	25	Rampa: 10:00 min
				Temp: 170 °C ± 5°C
				Hold: 10:00 min
				Total: 20 min

En el momento que se retiraron los recipientes de la digestión del equipo se dejaron enfriar en la cabina de gases. Una vez fríos, se destaparon y se vertió el contenido en los tubos falcón para la posterior lectura.

**Nota:** En el caso del Fe se adicionó la solución estabilizante de  $\text{CaCO}_3$  y agitación vigorosa justo en el momento de la aspiración.

En el caso que las muestras digestadas presenten turbiedad o sólidos suspendidos será necesario filtrar para evitar taponamientos en los capilares del equipo.

#### **2.4.1.3.2 Curva de Calibración para Cu y Fe**

##### **a. Curva de calibración para Cu**

Solución estándar de trabajo de 10 mg Cu/L, se toma 1 mL el MRC de 1000 mg Cu/L y se llevó a volumen con agua acidulada al 0,15% v/v  $\text{HNO}_3$  en un balón aforado de 100 mL. Con esta solución estándar de trabajo se prepara la correspondiente curva de calibración. Todos los estándares de la curva de calibración son ajustados a los rangos de trabajo en el LEA se seleccionaron las concentraciones para la curva de calibración.

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

- 0,1 mg Cu/L: tomar 1 mL del estándar de 10 mg Cu/L aforar a 100 mL.
- 0,25 mg Cu/L: Se tomaron 2,5 mL del estándar de 10 mg Cu/L aforar a 100 mL.
- 0,5 mg Cu/L: Se tomaron 5 mL del estándar de 10 mg Cu/L aforar a 100 mL.
- 1,5 mg Cu/L: Se tomaron 15 mL del estándar de 10 mg Cu/L aforar a 100 mL.

**Nota:** La curva de calibración fue leída cada vez que se analizaron las muestras. La preparación de estos estándares debe ser diaria.

#### **b. Curva de calibración para Fe**

Solución estándar de trabajo de 10 mg Fe/L, se toma 1 mL el MRC de 1000 mg Fe/L y se llevó a volumen con agua acidulada al 0,15% v/v HNO<sub>3</sub> en un balón aforado de 100 mL. Con esta solución estándar de trabajo se prepara la correspondiente curva de calibración. Todos los estándares de la curva de calibración son ajustados a los rangos de trabajo en el LEA se seleccionaron las concentraciones para la curva de calibración.

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

- 0,3 mg Fe/L: Se tomaron 3 mL del estándar de 10 mg Fe/L aforar a 100 mL; adicionar 25 mL de solución de CaCO<sub>3</sub> antes de aspirar.
- 0,5 mg Fe/L: Se tomaron 5 mL del estándar de 10 mg Fe/L aforar a 100 mL; adicionar 25 mL de solución de CaCO<sub>3</sub> antes de aspirar.
- 1 mg Fe/L: Se tomaron 10 mL del estándar de 10 mg Fe/L aforar a 100 mL; adicionar 25 mL de solución de CaCO<sub>3</sub> antes de aspirar.
- 1,5 mg Fe/L: Se tomaron 15 mL del estándar de 10 mg Fe/L aforar a 100 mL; adicionar 25 mL de solución de CaCO<sub>3</sub> antes de aspirar.
- 2 mg Fe/L: Se tomaron 20 mL del estándar de 10 mg Fe/L aforar a 100 mL; adicionar 25 mL de solución de CaCO<sub>3</sub> antes de aspirar.

**Nota:** La curva de calibración fue leída cada vez que se analizaron las muestras. La preparación de estos estándares debe ser diaria.

### **2.4.1.3.3 Intervalo de Validación para Cu y Fe**

#### **a. Intervalo de validación para Cu**

De acuerdo con lo establecido en el Standard Methods, SM 3111 B, el rango de aplicabilidad del método está entre 0,2 y 10 mg Cu/L, para el LEA se empleó una rango de trabajo comprendido entre 0,1 a 2 mg Cu/L. El manual del equipo de absorción atómica AAnalyst 400 asegura linealidad dentro de este intervalo en 1,6 mg Cu/L.

#### **b. Intervalo de validación para Fe**

De acuerdo con lo establecido en el Standard Methods, SM 3111 B, el rango de aplicabilidad del método está entre 0,3 y 10 mg Fe/L, para el LEA se empleó una rango de trabajo comprendido entre 0,3 a 2 mg Fe/L. El manual del equipo de absorción atómica AAnalyst 400 asegura linealidad dentro de este intervalo en 3 mg Fe/L.

**2.4.1.4 Determinación de arsénico y mercurio total en agua** De igual forma para As y Hg se siguió el procedimiento establecido por el SM 3114B y 3112B para el análisis de trazas de metales en aguas residuales, bajo lineamiento de normas vigentes.

### **Principio**

Los metales disueltos son llevados a su forma atómica elemental mediante calentamiento por una llama generada por una mezcla de gases combustibles. Las mezclas más empleadas son: aire-acetileno y argón. Las temperaturas de la llama van de 1900 °C a 2800 °C.

Formándose una nube gaseosa, son irradiados por un haz de luz de una longitud de onda específica, de acuerdo con el metal analizado, estos átomos absorben una fracción de la radiación proveniente de la lámpara y la fracción restante es captada por un fotodetector y un dispositivo transductor, que la convierten en una señal eléctrica, que posteriormente es registrada por un software. Este valor de señal registrado es igual a la concentración de los átomos presentes en la nube gaseosa. Finalmente, el hidruro del metal de interés es conducido hacia una celda calentada por la llama o calentamiento eléctrico, mediante un gas de arrastre inerte. Una vez el vapor llega a la celda, el hidruro se descompone por acción de la temperatura liberando el metal en estado atómico; allí los átomos son irradiados por un haz de luz de longitud de onda específica y se produce la absorción.

La técnica de absorción atómica por generación de hidruros alcanza límites de detección del orden de 1ppb o menor a este.

**2.4.1.4.1 Método de Referencia para As y Hg** Para la determinación y cuantificación de Hg y As en aguas residuales por la técnica de HG-AAS se siguió la metodología establecida en el Standard Methods 3112B METALS BY COLD-VAPOR ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY, 22th Edition 2012 p. 3-23 a 3-25 para Hg, y Standard Methods 3114B ARSENIC AND SELENIUM BY HYDRIDE GENERATION/ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY\* p. 3-34 a 3-38 o 3-38 a 3-39, 22th Edition 2012 para As y digestión para As regidos por la norma internacional EPA 3015 A (half-scale), de acuerdo con las indicaciones del equipo Multiwave GO.

▪ **Reactivos para la digestión de As**

- I. El ácido nítrico concentrado ( $\text{HNO}_3$ ); (densidad:  $1.37 \text{ g/cm}^3$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ )): nivel de ensayo libre de trazas de metales no es exceder de  $1 \text{ g / L}$  por metal. Grado reactivo.

- II. El ácido clorhídrico concentrado (HCl); (densidad: 1.19 g/cm<sup>3</sup> (20 °C)): nivel de ensayo libre de trazas de metales no es exceder de 1 g / L por metal. Grado reactivo.
- III. El yoduro de potasio (KI): solución al 5% w / v. Disolver 12,5 g de KI en 250 mL de agua tipo I.

**a. Digestión para As**

Los estándares para la curva de calibración de As si requieren digestión, las muestras y controles de calidad se sometieron a digestión bajo las mismas condiciones según tabla N° 12. Condiciones del Multiwave digestión de muestras y controles de calidad:

**Tabla 12. Condiciones del Multiwave digestión de muestras y controles de calidad para As.**

T-Limite (°C)	Mezcla de Reactivos (mL)	Volumen de muestra (mL)	Volumen total en el recipiente (mL)	Programa
200	2 mL HNO <sub>3</sub> conc. + 0,5 mL HCl conc.	22,5	25	Rampa: 10:00 min
				Temp: 170 °C ± 5°C
				Hold: 10:00 min
				Total: 20 min

En el momento que se retiraron los recipientes de la digestión del equipo se dejaron enfriar en la cabina de gases. Una vez fríos, se destaparon y se vertió el contenido en los tubos falcón para la posterior lectura.

En el caso que las muestras digeradas presenten turbiedad o sólidos suspendidos será necesario filtrar para evitar taponamientos en los capilares del equipo.

▪ **Preparación de los reactivos para Hg:**

- I. El ácido nítrico concentrado ( $\text{HNO}_3$ ); (densidad:  $1.37 \text{ g/cm}^3$  ( $20^\circ\text{C}$ )): nivel de ensayo libre de trazas de metales no es exceder de  $1 \text{ g / L}$  por metal. Grado reactivo.
- II. El ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ); (densidad:  $1.84 \text{ g/cm}^3$  ( $20^\circ\text{C}$ )): nivel de ensayo libre de trazas de metales no es exceder de  $1 \text{ g / L}$  por metal. Grado reactivo.
- III. El permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ): solución al 5%, w / v. Disolver 25 g de permanganato de potasio en 500 ml de agua tipo I.
- IV. Persulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ): solución al 5%, w / v. Añadir 25 g de persulfato de potasio en 500 ml de agua destilada y se calienta a  $40^\circ\text{C}$  durante 20 minutos hasta que se disuelva completamente.

Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) - solución de clorhidrato de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ ): Disolver 60 g de cloruro de sodio y 120 g de clorhidrato de hidroxilamina en agua tipo I y diluir a 500 ml.

**b. Digestión para Hg**

El tipo de digestión para el Hg fue diferente, de la muestra de agua recolectada con el analito según sea el caso, se transfirió 100 mL de muestra y estándares a frascos schott, estos se trataron con 5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. y 2.5 mL de  $\text{HNO}_3$  conc., posterior agitación vigorosa y se dejó en reposo aproximadamente 15 minutos luego se adicionó 15 mL de solución de  $\text{KMnO}_4$  al 5% hasta coloración constante por 15 minutos. Se adiciono 8 mL de solución de  $\text{k}_2\text{S}_2\text{O}_8$  al 5 % y se calentó

durante 2 h en baño de agua en un intervalo de temperatura controlado entre 90 a 95 °C. Se dejó enfriar completamente las muestras y estándares a temperatura ambiente y en cabina de gases, finalmente se agregó suficiente solución de  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  y  $\text{NaCl}$  para reducir el exceso de  $\text{KMnO}_4$  al 5%.

**Nota:** Al llevar a cabo cada adición se aseguró siempre de mezclar completamente la solución, en la solución final no se debe observar algún precipitado si llegado el caso se presenta se debe filtrar para asegurar la solución de interferencias por sólidos en suspensión y para evitar taponamientos en los capilares del equipo.

#### **2.4.1.4.2 Curva de calibración para As y Hg**

##### **a. Curva de calibración para As**

Solución estándar de trabajo de 10 mg As/L, se toma 1 mL el MRC de 1000 mg As/L y se llevó a volumen con agua acidulada del 2 al 5 % v/v  $\text{HNO}_3$  en un balón aforado de 100 mL. Con esta solución estándar de trabajo se prepara soluciones intermedias de 100  $\mu\text{g}$  As/L, se toma 1 mL de la solución estándar de trabajo de 10 mg As/L y se llevó a volumen con agua acidulada del 2 al 5 % v/v  $\text{HNO}_3$  en un balón aforado de 100 mL, seguidamente se prepara una solución de trabajo de 10  $\mu\text{g}$  As/L y se llevó a volumen con agua acidulada del 2 al 5 % v/v  $\text{HNO}_3$  en un balón aforado de 100 mL la correspondiente solución de trabajo preparo los puntos más bajos y de la solución de trabajo de 100  $\mu\text{g}$  As/L los puntos más altos pertenecientes a la curva de calibración. Sin excepción alguna los estándares de la curva de calibración previamente digeridos y fríos a un volumen de 50 mL se les adiciona 5 mL de  $\text{HCl}_{\text{conc}}$  mezclar, seguidamente se adicionan 5 mL de una solución pre-reductante de KI al 5% p / v, finalmente mezclar y dejar en reposo por 30 minutos. Todos los estándares de la curva de calibración son ajustados a los

rangos de trabajo en el LEA se seleccionaron las concentraciones para la curva de calibración.

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

- 2 µg As/L: Se tomaron 20 mL del estándar de 10 µg As/L aforar a 100 mL.
- 5 µg As/L: Se tomaron 50 mL del estándar de 10 µg As/L aforar a 100 mL.
- 10 µg As/L: Se tomaron 10 mL del estándar de 100 µg As/L aforar a 100 mL.
- 15 µg As/L: Se tomaron 15 mL del estándar de 100 µg As/L aforar a 100 mL.
- 20 µg As/L: Se tomaron 20 mL del estándar de 100 µg As/L aforar a 100 mL.

**Nota:** La curva de calibración fue leída cada vez que se analizaron las muestras. La preparación de estos estándares debe ser diaria.

#### **b. Curva de calibración para Hg**

Solución estándar de trabajo de 10 mg Hg/L, se toma 1mL el MRC de 1000 mg Hg/L y se llevó a volumen con agua acidulada al 1 % v / v HNO<sub>3</sub> en un balón aforado de 100 mL. Con esta solución estándar de trabajo se prepara soluciones intermedias de 100 µg Hg/L, se toma 1 mL de la solución estándar de trabajo de 10mg Hg/L y se llevó a volumen con agua acidulada al 1 % v/v HNO<sub>3</sub> en un balón aforado de 100 mL, seguidamente se prepara una solución de trabajo de 10 µg Hg/L y se llevó a volumen con agua acidulada al 1 % v/v HNO<sub>3</sub> en un balón aforado de 100 mL la correspondiente solución de trabajo preparo los puntos más bajos y de la solución de trabajo de 100 µg Hg/L los puntos más altos pertenecientes a la curva de calibración. Todos los estándares de la curva de calibración son ajustados a los rangos de trabajo en el LEA se seleccionaron las concentraciones para la curva de calibración.

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

- 2,5 µg Hg/L: Se tomaron 25 mL del estándar de 10 µg Hg/L aforar a 100 mL.
- 5 µg Hg/L: Se tomaron 50 mL del estándar de 10 µg Hg/L aforar a 100 mL.
- 10 µg Hg/L: Se tomaron 10 mL del estándar de 100 µg Hg/L aforar a 100 mL.
- 15 µg Hg/L: Se tomaron 15 mL del estándar de 100 µg Hg/L aforar a 100 mL.
- 20 µg Hg/L: Se tomaron 20 mL del estándar de 100 µg Hg/L aforar a 100 mL.
- 25 µg Hg/L: Se tomaron 25 mL del estándar de 100 µg Hg/L aforar a 100 mL.

**Nota:** La curva de calibración fue leída cada vez que se analizaron las muestras. La preparación de estos estándares debe ser diaria.

#### **2.4.1.4.3 Intervalo de validación para As y Hg**

##### **a. Intervalo de validación para As**

De acuerdo con lo establecido en el Standard Methods, SM 3114 B, el rango de aplicabilidad del método está entre 5 y 100 µg As/L, para el LEA se empleó un rango de trabajo comprendido entre 2 a 20 µg As/L. El manual del equipo de absorción atómica FIAS 100 asegura linealidad dentro de este intervalo en 20 µg As/L.

##### **b. Intervalo de validación para Hg**

De acuerdo con lo establecido en el Standard Methods, SM 3114 B, el rango de aplicabilidad del método está entre 1 y 5 µg Hg/L, para el LEA se empleó un rango de trabajo comprendido entre 2,5 a 25 µg Hg/L.

## 2.5 LINEALIDAD

En el caso de Cu, Fe, As y Hg se realizó la prueba t de student a la curva de calibración, para corroborar la linealidad de la misma. Para esto se utilizó la ecuación 11:

$$t_{CAL} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{Ec. 11}$$

Donde **r** es coeficiente de correlación y **n** el número de pares utilizados para calcular **r**. El valor calculado de **t** es comparado con las tablas de distribución t, usando la prueba t de dos colas y (n-2) grados de libertad y un 95% de confianza. En este caso la hipótesis nula es que no existe correlación entre los datos de concentración y absorbancia, por lo que si el  $t_{CAL}$  es mayor que la t tabulada, se rechaza la hipótesis nula y si existe entonces, correlación significativa entre la concentración y la absorbancia de los patrones.

**2.5.1 Diseño Experimental** Se mantuvieron los lineamientos de validación establecidos por el LEA de la UPB para los metales de interés, para la validación de métodos analíticos. Se analizaron en orden aleatorio las muestras citadas a continuación por un período de siete días (7 días) que pudieron ser consecutivos o no.

- Blancos
- Soluciones estándar (MCR) para la evaluación de la exactitud.
- Soluciones para la evaluación de la precisión.

## Descripción de soluciones y patrones

- **Blancos:** Se prepararon blancos con agua tipo I fresca al 0, 15 % v/v de HNO<sub>3</sub> para Cu y Fe, agua tipo I fresca del 1% v/v de HNO<sub>3</sub> para As y Hg. Estos blancos fueron preparados diariamente de acuerdo a la necesidad del análisis y sometidos al mismo procedimiento analítico de cada metal.
- **Muestras ambientales:** Las muestras ambientales se obtuvieron muestras de agua residual procedente de la planta de tratamiento de la U.P.B (efluente) y corresponden a una muestra (**M**) para cada metal, se recolecto por cada metal un volumen total de muestra recolectado de 2 litros como volumen mínimo estas se preservan con ácido nítrico asegurando un pH < 2. Las muestras recolectadas de mantuvieron refrigeradas a una temperatura promedio de 4 + 0,1 °C para el período de validación, se tomaron diariamente las alícuotas requeridas para cada uno de los análisis.
- **Estándares preparados en el laboratorio:** Los estándares empleados en el curso de las correspondientes validaciones fueron preparados en el LEA a partir de las soluciones estándares se resume en la tabla N° 13:

**Tabla 13: Soluciones estándares de trabajo en rango bajo y alto**

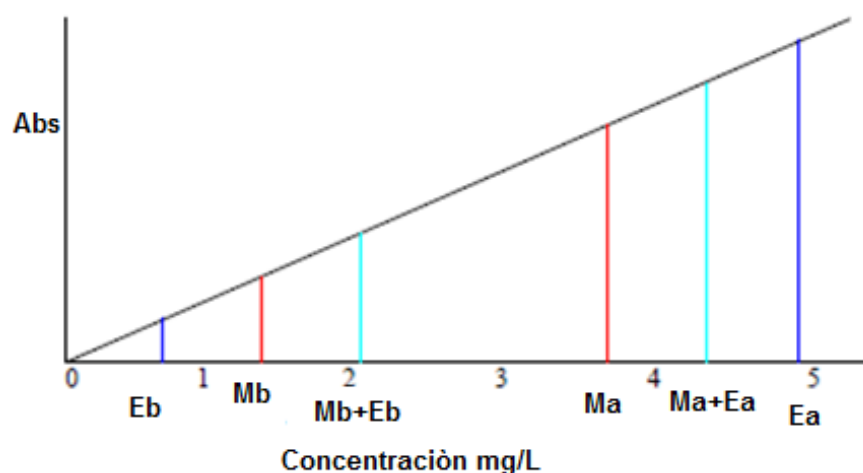
<b>Metal</b>	<b>Estándar de rango bajo (E<sub>b</sub>)</b>	<b>Estándar de rango alto (E<sub>a</sub>)</b>
Cu	0,5 mg Cu/L	1,5 mg Cu/L
Fe	0,5 mg Fe/L	1,5 mg Fe/L
As	1 µg As/L	10 µg As/L
Hg	1 µg Hg/L	10 µg Hg/L

- **2 Muestras adicionadas:** En el LEA se prepararon las muestras adicionadas alta (**MAA**) a partir de 100 mL de Ma + E<sub>a</sub> y las muestras adicionadas bajas (**MAB**) Mb + E<sub>b</sub>, donde el estándar alto de concentración es aproximadamente

al 90% del rango de trabajo del método, para muestras adicionadas el volumen límite de adición no debe exceder al 5% del volumen final de preparación. Para muestras adicionadas con Hg, al no estar especificados sus criterios de recuperación este porcentaje está entre el 70 y 130 de recuperación SM 3020 QUALITY ASSURANCE/QUALITY CONTROL.

Finalmente el diseño experimental busca monitorear durante un intervalo de tiempo el comportamiento de las diferentes soluciones, que idealmente se deben encontrar en rangos definidos. La figura 4 exhibe la región en donde se deben ubicar las soluciones.

**Figura 10. Diagrama de la ubicación de soluciones de trabajo en la curva de calibración para la validación.**



## 2.6 DETERMINACIÓN DE FIGURAS DE MÉRITO

Para todos los métodos se realizará el cálculo de cada una de las figuras de mérito, según como se describe a continuación:

**2.6.1 El límite de detección** Con los datos de los blancos se determinó el límite de detección calculando la desviación estándar y empleando la ecuación 12:

$$LD = \bar{X} + 3S \quad \text{Ec. 12}$$

Donde;  $\bar{X}$  es el valor medio de las determinaciones y S es la desviación estándar de las medidas.

**2.6.2 El límite de cuantificación** Teniendo el valor medio y la desviación estándar de las medidas empleadas en el cálculo del límite de detección se calculó el límite de cuantificación de la siguiente forma:

$$LC = \bar{X} + 10S \quad \text{Ec. 13}$$

Donde;  $\bar{X}$  es el valor medio de las determinaciones y S es la desviación estándar de las medidas.

**2.6.3 Precisión** Se estimó mediante el cálculo del coeficiente de variación obtenido de las soluciones estándares preparadas según el metal para Cu 1 mg/L, Fe 1 mg/L, As 2 µg/L y el Hg 2.5 µg/L, según la ecuación 14:

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Ec. 14}$$

Donde;  $\bar{X}$  es el valor medio de las determinaciones y S es la desviación estándar de las medidas.

**2.6.4 Exactitud** Se calculó el porcentaje de recuperación los estándares de 1 mg Cu/L, 1 mg Fe/L, 2 µg As/L y 2.5 µg Hg/L.

$$\% \text{ Error} = \frac{|Valor \text{ Experimental} - Valor \text{ Teórico}|}{Valor \text{ Teórico}} \times 100 \quad \text{Ec. 15}$$

En el caso de una curva de calibración el error relativo porcentual de cada uno de los patrones se halla mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Error} = \frac{|\hat{X}_i - X_i|}{X_i} \quad \text{Ec. 16}$$

Donde  $X_i$  son los valores teóricos y  $\hat{X}_i$  los valores experimentales estimados por aplicación de la ecuación que define la curva de calibración.

**2.6.5 Sensibilidad del método** La sensibilidad del método se estableció por medio del cálculo de la pendiente de la recta de los mínimos cuadrados, construida en el rango lineal de trabajo establecido con anterioridad.

## 2.7 ELABORACIÓN CARTAS CONTROL

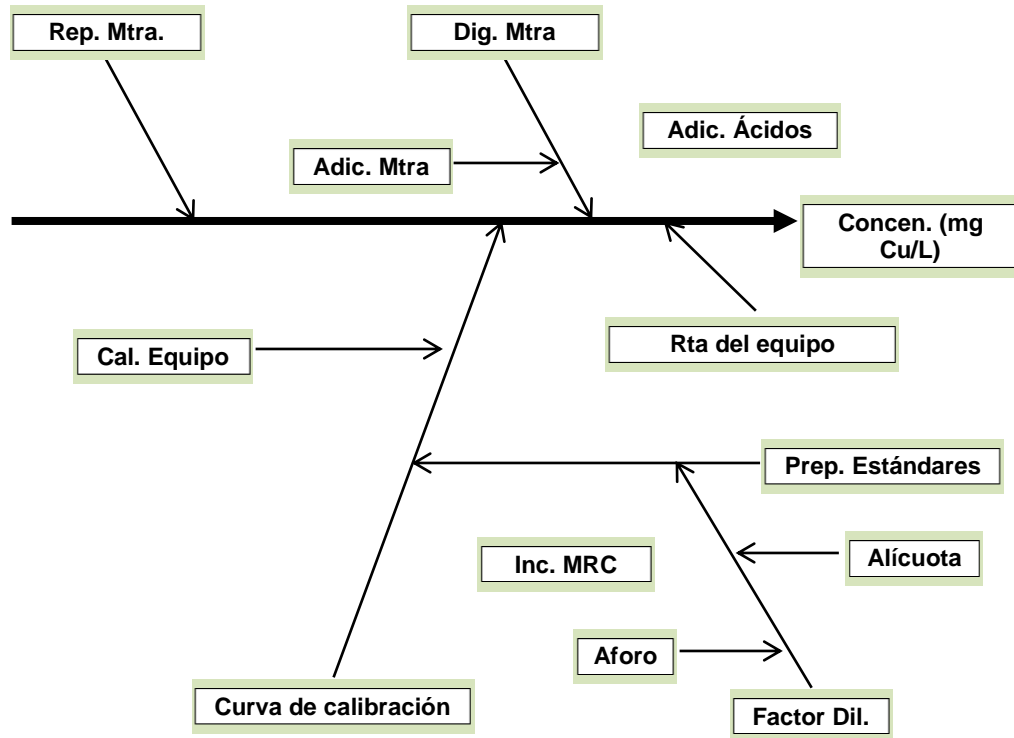
Se elaboraron cartas control con los datos obtenidos para los estándares, con el fin de llevar a cabo el control de la calidad de cada método. Los límites de control se calcularon de la siguiente forma, como criterio en la exactitud el comportamiento de los estándares de verificación en cuanto a los métodos independiente de la concentración, y el criterio de carta control en función de la recuperación en las muestras adicionadas baja y alta.

## 2.8 CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE

Se identificaron las fuentes individuales de incertidumbre, en cada uno de los pasos para la determinación de Cu, Fe, As y Hg, tales como, preparación de

reactivos, dilución de patrones, cuantificación entre otros. Para esto se realizó un diagrama de causa y efecto para cada uno de los métodos:

**Figura 11. Diagrama de causa y efecto para la determinación de incertidumbre para el metal Cu**

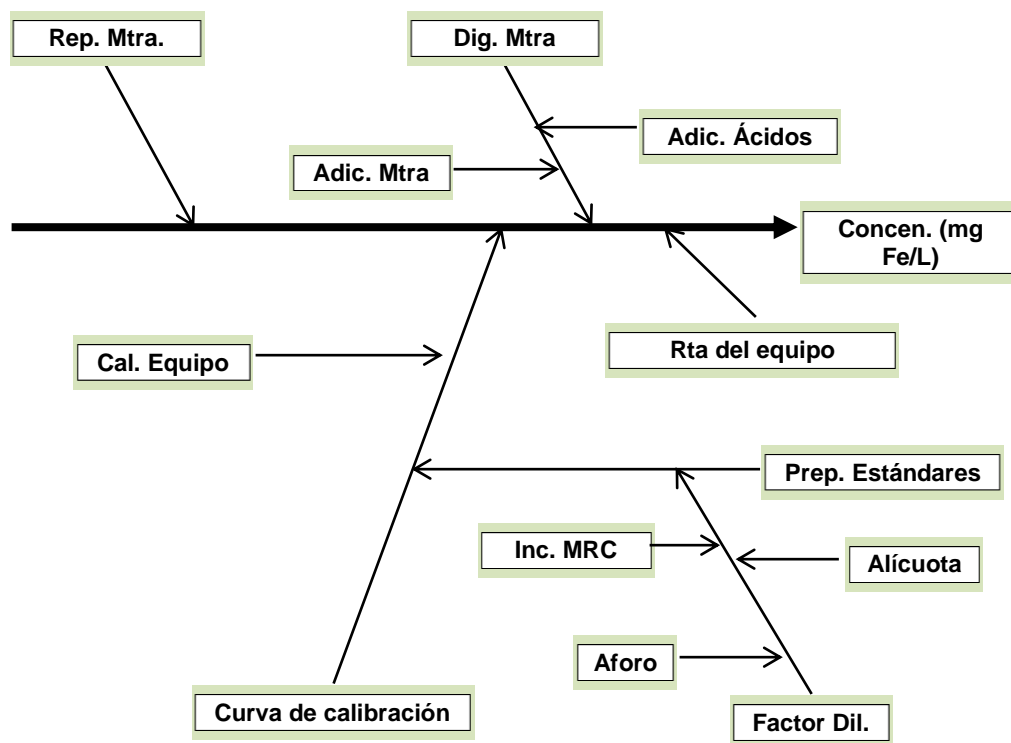


**Descripción del diagrama**

<b>Rep. Mtra:</b> Repetibilidad de la muestra
Precisión de análisis de muestra
<b>Dig. Mtra:</b> Digestión de la muestra
Ácido nítrico (Pipeta de 2 mL Aforada)
Ácido clorhídrico (Pipeta de 1 mL Aforada)
Alícuota de la muestra sin digerir (Pipeta de 20 mL Aforada)
Alícuota de la muestra sin digerir (Pipeta de 2.5 mL Aforada)
Tolerancia de las pipetas

<b>Curva de Calibración</b>
– <b>Cal. Equipo:</b> Calibración del AANALYST400
– <b>Inc. MCR:</b> Incertidumbre asociada al material de referencia certificado de Cu de PerkinElmer
– <b>Prep. Solución Estándar:</b> Incertidumbre debida a la preparación del estándar de trabajo de 10 mg Cu/L
– <b>Prep. Estándares:</b> Preparación de patrones para la curva
+ <b>Factor Dil.:</b> Factor de dilución a partir del patrón de 1000 ppm
<b>Aforo:</b> Aforo de estándares en Balón Aforado de 100 mL.
<b>Alícuota:</b> Medición de alícuotas de patrón de 1000ppm con pipetas aforadas: Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y ambiental, tolerancia y repetibilidad del material volumétrico.
<b>Rta del equipo:</b> Respuesta del equipo
Incertidumbre debida a la lectura del equipo

**Figura 12: Diagrama de causa y efecto para la determinación de incertidumbre para el metal Fe**

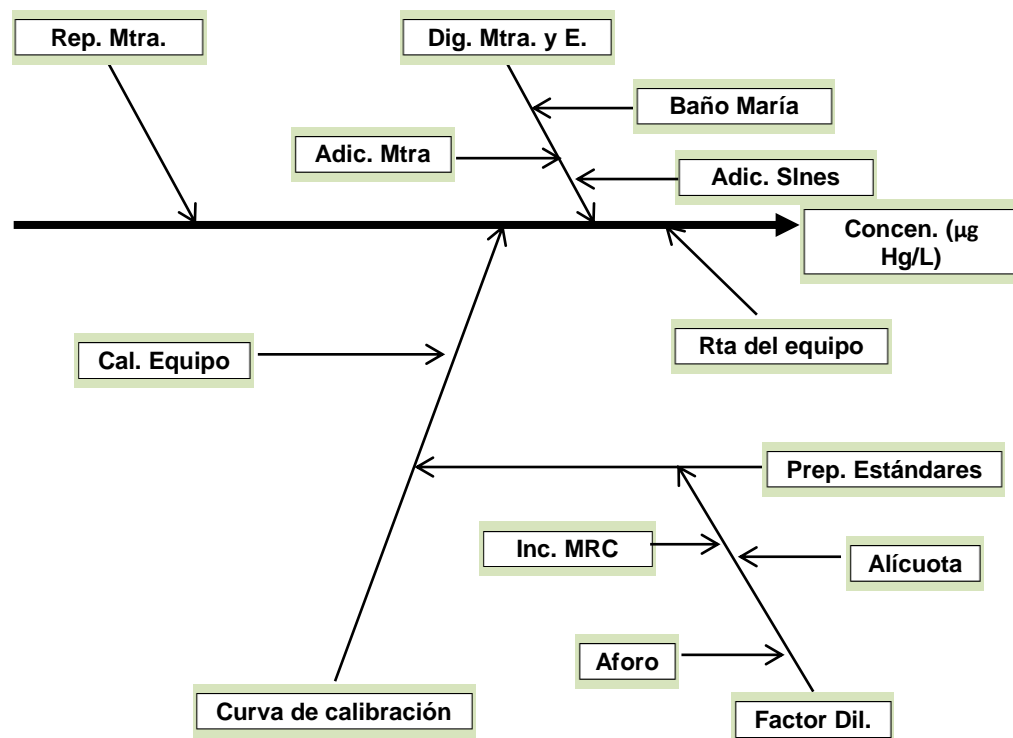


**Descripción del diagrama**

<b>Rep. Mtra:</b> Repetibilidad de la muestra
Precisión de análisis de muestra
<b>Dig. Mtra:</b> Digestión de la muestra
Ácido nítrico (Pipeta de 2 mL Aforada)
Ácido clorhídrico (Pipeta de 1 mL Aforada)
Alícuota de la muestra sin digerir (Pipeta de 20 mL Aforada)
Alícuota de la muestra sin digerir (Pipeta de 2.5 mL Aforada)
Tolerancia de las pipetas
<b>Curva de Calibración</b>
– <b>Cal. Equipo:</b> Calibración del AANALYST400
– <b>Inc. MCR:</b> Incertidumbre asociada al material de referencia certificado

de Fe de PerkinElmer
– <b>Prep. Solución Estándar:</b> Incertidumbre debida a la preparación del estándar de trabajo de 10 mg Fe/L
– <b>Prep. Estándares:</b> Preparación de patrones para la curva
+ <b>Factor Dil.:</b> Factor de dilución a partir del patrón de 1000 ppm
<b>Aforo:</b> Aforo de estándares en Balón Aforado de 100 mL.
<b>Alícuota:</b> Medición de alícuotas de patrón de 1000ppm con pipetas aforadas: Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y ambiental, tolerancia y repetibilidad del material volumétrico.
<b>Rta del equipo:</b> Respuesta del equipo
Incertidumbre debida a la lectura del equipo

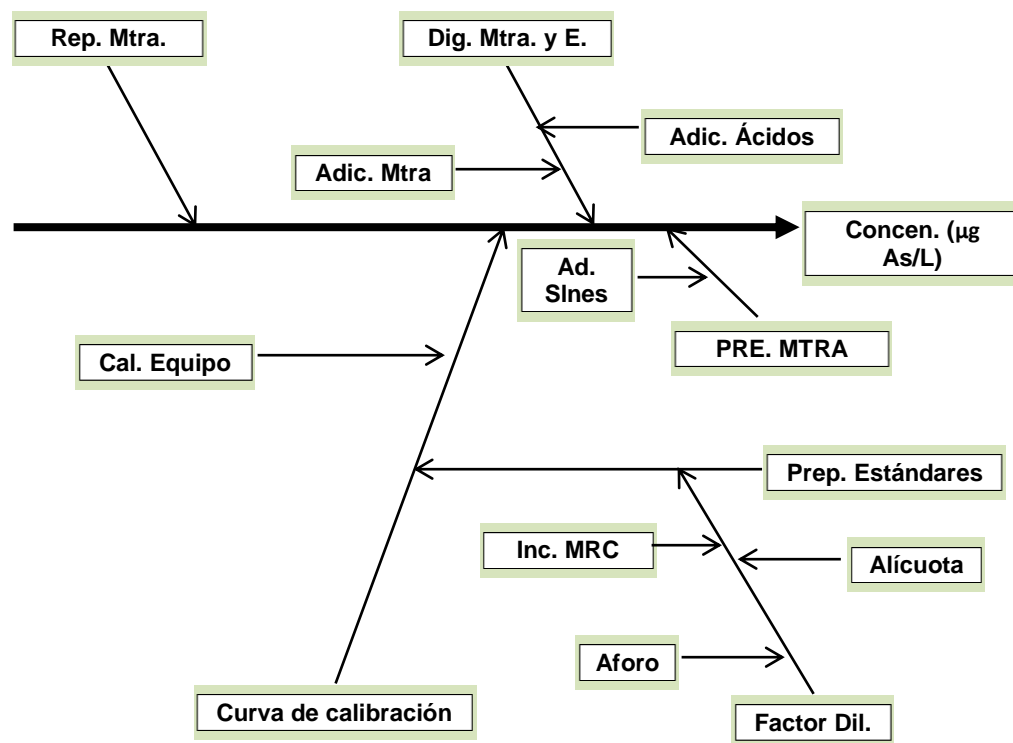
**Figura 13** Diagrama de causa y efecto para la determinación de incertidumbre para el metal Hg



## Descripción del diagrama

<b>Rep. Mtra:</b> Repetibilidad de la muestra
Precisión de análisis de muestra
<b>Dig. Mtra y E:</b> Digestión de la muestra y Estándares
<b>Ad. Slnes:</b> Adición de Soluciones
Ácido Sulfúrico (Pipeta de 5 mL Aforada )
Ácido nítrico (Pipeta de 2,5 mL Aforada)
Solución de permanganato de potasio al 5% (Pipeta 10 mL y 5 mL Aforada)
Solución de Persulfato de potasio al 5% (Pipeta de 5 mL Aforada)
Baño María: control de temperatura del baño y la temperatura del líquido dentro y fuera del baño.
Solución de Clorhidrato de Hidroxilamina (Pipeta 2 mL Aforada)
Tolerancia de las pipetas
<b>Curva de Calibración</b>
– <b>Cal. Equipo:</b> Calibración del AANALYST400
– <b>Inc. MCR:</b> Incertidumbre asociada al material de referencia certificado As de PerkinElmer
– <b>Prep. Solución Estándar:</b> Incertidumbre debida a la preparación del estándar de trabajo de 10 mg Hg/L
– <b>Prep. Estándares:</b> Preparación de patrones para la curva
+ <b>Factor Dil.:</b> Factor de dilución a partir del patrón de 1000 ppm
<b>Aforo:</b> Aforo de estándares en Balón Aforado de 100 mL.
<b>Alícuota:</b> Medición de alícuotas de patrón de 1000ppm con pipetas aforadas: Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y ambiental, tolerancia y repetibilidad del material volumétrico.
<b>Rta del equipo:</b> Respuesta del equipo
Incertidumbre debida a la lectura del equipo

**Figura 14: Diagrama de causa y efecto para la determinación de incertidumbre para el metal As**



**Descripción del diagrama**

<b>Rep. Mtra:</b> Repetibilidad de la muestra
Precisión de análisis de muestra
<b>Dig. Mtra y E:</b> Digestión de la muestra y Estándares
Ácido nítrico (Pipeta de 2 mL Aforada)
Ácido clorhídrico (Pipeta de 1 mL Aforada)
Alícuota de la muestra sin digerir (Pipeta de 20 mL Aforada)
Alícuota de la muestra sin digerir (Pipeta de 2.5 mL Aforada)
Tolerancia de las pipetas
<b>Curva de Calibración</b>
– <b>Cal. Equipo:</b> Calibración del AANALYST400

– <b>Inc. MCR:</b> Incertidumbre asociada al material de referencia certificado As de PerkinElmer
– <b>Prep. Solución Estándar:</b> Incertidumbre debida a la preparación del estándar de trabajo de 10 mg As/L
– <b>Prep. Estándares:</b> Preparación de patrones para la curva
+ <b>Factor Dil.:</b> Factor de dilución a partir del patrón de 1000 ppm
<b>Aforo:</b> Aforo de estándares en Balón Aforado de 100 mL.
<b>Alícuota:</b> Medición de alícuotas de patrón de 1000ppm con pipetas aforadas: Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y ambiental, tolerancia y repetibilidad del material volumétrico.
<b>PREPARACIÓN DE MUESTRAS:</b> Respuesta del equipo
Ad. Slnes: Adición de soluciones estabilizante en la lectura
– Ácido clorhídrico (Pipeta de 5 mL Aforada)
– Solución de KI al 5% (Pipeta de 5 mL Aforada)
Incertidumbre debida a la lectura del equipo

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 PREVALIDACIÓN

##### 3.1.1 Verificación de patrones

**Estándar certificado de 1000 mg Cu/L (Cobre):** se utilizó un patrón de cobre certificado Certipur de  $1000 \pm 2$ mg Cu/L, marca PerkinElmer Pure No: 19-133CUIY1 trazable en agua acidulada al 2% de HNO<sub>3</sub>.

**Estándar certificado de 1000 mg Fe/L (Hierro):** se utilizó un patrón de hierro certificado Certipur de  $1000 \pm 2$ mg Fe/L, marca PerkinElmer Pure No: 19-216FEY1 trazable en agua acidulada al 1% de HNO<sub>3</sub>.

**Estándar certificado de 1000 mg Hg/L (Mercurio):** se usó un patrón de mercurio certificado Certipur de  $1000 \pm 2$ mg Hg/L, marca Perkin Elmer Pure No: 19-23HGX1 trazable en agua acidulada al 10% HNO<sub>3</sub>.

**Estándar certificado de 1000 mg As/L (Arsénico):** se utilizó un patrón de arsénico certificado Certipur de  $1000 \pm 2$ mg As/L, marca PerkinElmer Pure No: 18-200ASX1 trazable en agua acidulada al 2% de HNO<sub>3</sub>.

##### 3.1.2 Verificación de equipos

**Espectrofotómetro AAAnalyst 400,** calibrado y verificado por la empresa POLCO, certificó las condiciones idóneas para su correcto funcionamiento.

**Equipo de absorción atómica**, calibrado y verificado por la empresa POLCO, certificando las condiciones idóneas para su correcto funcionamiento en cuanto a la atomización por llama y la generación de hidruros.

**Baño Termostato**, verificado por medio de un termómetro calibrado por la empresa MetroLabor certificando las condiciones idóneas para su correcto funcionamiento por lo relacionado con la generación de hidruros.

**Balanza analítica SARTORIUS BP211D**, calibrada y verificada por la empresa METROLABOR Ltda, certificó las condiciones idóneas para su correcto funcionamiento.

**Microwave**, calibrado y verificado por la empresa POLCO, certificó las condiciones idóneas para su correcto funcionamiento.

### **3.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANALISIS PARA METALES**

**3.2.1 Cobre** Se efectuó el análisis y determinación de cobre en las soluciones de trabajo seleccionadas para lo crítico del método analítico normalizado por un tiempo siete días, obteniéndose los siguientes resultados reportados como mg Cu/L registrados en la tabla N° 14:

**Tabla 14. Análisis de muestras y estándares para Cu**

<b>SM 3111B Cobre</b>						
<b>Muestras y estándares con digestión</b>						
<b>No. de datos</b>	<b>Bk</b>	<b>Estándar de 0,1 ppm</b>	<b>Estándar de 1 ppm</b>	<b>M1</b>	<b>MAB</b>	<b>MAA</b>
<b>1</b>	0,007	0,102	1,090	0,400	0,477	0,992
<b>2</b>	0,003	0,113	1,055	0,407	0,481	1,012
<b>3</b>	0,004	0,108	1,028	0,380	0,460	0,971
<b>4</b>	0,009	0,113	1,055	0,400	0,477	1,006
<b>5</b>	0,010	0,119	1,072	0,402	0,481	0,999
<b>6</b>	-0,002	0,103	1,060	0,373	0,447	0,955
<b>7</b>	0,006	0,110	1,037	0,372	0,442	0,953
<b>Promedio</b>	<b>0,005</b>	<b>0,110</b>	<b>1,057</b>	<b>0,390</b>	<b>0,467</b>	<b>0,984</b>
<b>DESVEST</b>	<b>0,004</b>	<b>0,006</b>	<b>0,021</b>	<b>0,015</b>	<b>0,017</b>	<b>0,024</b>
<b>CV%</b>	<b>0,006</b>	<b>0,004</b>	<b>0,015</b>	<b>3,808</b>	<b>3,571</b>	<b>2,483</b>
<b>Valor mínimo</b>	<b>-0,002</b>	<b>0,102</b>	<b>1,028</b>	<b>0,372</b>	<b>0,442</b>	<b>0,953</b>
<b>Valor máximo</b>	<b>0,010</b>	<b>0,119</b>	<b>1,090</b>	<b>0,407</b>	<b>0,481</b>	<b>1,012</b>
<b>Intervalo</b>	<b>0,013</b>	<b>0,017</b>	<b>0,062</b>	<b>0,035</b>	<b>0,039</b>	<b>0,059</b>
<b>Número de datos</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
<b>Criterio T</b>						
<b>Talto</b>	-	<b>1,517</b>	<b>1,613</b>	<b>1,093</b>	<b>0,896</b>	<b>1,149</b>
<b>Tbajo</b>	-	<b>1,316</b>	<b>1,378</b>	<b>1,253</b>	<b>1,452</b>	<b>1,270</b>
<b>T teórico 95%</b>	-	<b>1,940</b>	<b>1,940</b>	<b>1,940</b>	<b>1,940</b>	<b>1,940</b>
<b>% Error</b>	-	<b>9,67</b>	<b>5,68</b>	-	-	-
<b>Exactitud</b>	-	<b>90,3</b>	<b>94,3</b>	-	-	-
<b>Porcentaje de recuperación</b>	-	-	-	-	<b>109</b>	<b>105</b>

**\*DATOS RECHAZADOS**

Los estándares y las muestras ambientales fueron analizados según la metodología propuesta.

En el desarrollo del análisis estadístico de los datos, se empleó la prueba t para el rechazo de datos que no se ajustaban al comportamiento regular de los ensayos se determinó que son datos dispersos, este análisis se basó en calcular un valor t experimental, para el máximo valor de las mediciones llamado  $T_{\text{alto}}$  y un valor mínimo de las mediciones llamado  $T_{\text{bajo}}$ . El valor t experimental se calculó de acuerdo con la expresión matemática ecuación N° 17.

$$T_{exp} = \frac{\text{Valor max/min-Promedio}}{\text{Desviacion estandar}} \quad \text{Ec. 17}$$

Como resultado de la prueba t, no hubo rechazo de datos en las mediciones realizados. Adicional a esto, se empleó como segundo criterio para el rechazo de datos, la verificación con el %CV establecido internamente en el LEA, siendo este del 10%. De acuerdo con este criterio, no se vio la necesidad de rechazar datos de las mediciones realizadas.

**3.2.1.1 Intervalo de validación para Cu** En relación a los resultados obtenidos en las curvas de calibración de las mediciones en desarrollo, para la validación de esta técnica, el rango de aplicabilidad del método fue de 0,1 a 2 mg Cu/L de acuerdo a lo reportado a las curvas de calibración.

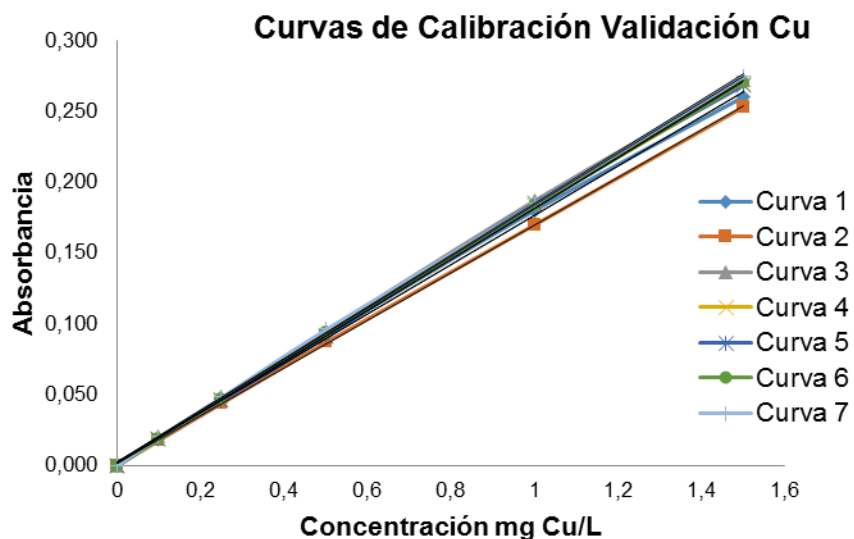
**3.2.1.2 Curvas de calibración para Cu** De acuerdo a las indicaciones del método se requiere preparar y leer diariamente una curva de calibración; por lo cual durante este proceso se obtuvo un total de siete curvas. A continuación se registran estos valores en la tabla N° 15:

**Tabla 15. Datos curvas de calibración para la determinación de Cu**

Día	E 0,1 ppm	E 0,25ppm	E 0,5ppm	E 1ppm	E 1,5ppm	r	m	b
1	0,019	0,047	0,092	0,180	0,260	0,999358	0,176200	0,0000
2	0,018	0,044	0,087	0,170	0,253	0,999860	0,169520	0,0000
3	0,020	0,048	0,095	0,187	0,272	0,999614	0,183860	0,0000
4	0,019	0,047	0,092	0,183	0,269	0,999764	0,180690	0,0000
5	0,019	0,046	0,091	0,185	0,268	0,999709	0,180980	0,0000
6	0,019	0,047	0,094	0,183	0,270	0,999744	0,181580	0,0000
7	0,020	0,048	0,096	0,185	0,275	0,999730	0,184510	0,0000

Con los resultados obtenidos de absorbancia se construyeron las curvas de calibración para la determinación de Cu cada día (figura N° 15).

**Figura 15. Curvas de Calibración Cobre**



**3.2.1.3 Linealidad para Cu** De acuerdo a lo establecido por el SM para la aceptación de las curvas de calibración, estas cumplieron con el criterio de los coeficientes de correlación  $r > 0.995$ . Se confirmó este comportamiento en los resultados obtenidos para cada una de las curvas, anexo a esto como criterio de confirmación se realizó la prueba t a las curvas de calibración, y se corroboró la linealidad de estas para un 95% de confianza en siete datos, se concluye la existencia de correlación entre los valores de concentración y absorbancia de la curva, a su vez también se determinó que el CV% para las curvas en cada uno de los estándares preparados fue menor al 5%, reafirmando claramente la linealidad, tabla N° 16:

**Tabla 16: Controles Validación Cu**

<b>Controles curvas de calibración Cu</b>			
<b>Estándar (ppm)</b>	<b>desviación</b>	<b>promedio</b>	<b>coeficiente de variación</b>
Bk	0,0000	0,0000	-
0,1	0,0007	0,0191	3,6048
0,25	0,0014	0,0467	2,9544
0,5	0,0030	0,0924	3,2372
1	0,0057	0,1819	3,1175
1,5	0,0076	0,2667	2,8531

**3.2.1.4 Sensibilidad del método para la determinación de Cu** Se tomó la pendiente promedio de las curvas de mínimos cuadrados como el parámetro para determinar la sensibilidad del método, dando como resultado 0,1796 ABS/mg Cu/L y CV% 2,8531% menor al 5%. Se representa esta sensibilidad como el cambio de la absorbancia debido al cambio de la concentración.

**3.2.1.5 Límite de detección (LDM) para Cu** El límite de detección para este método analítico, se estimó con la ecuación N° 12, y se obtuvo un LDM de:

$$\text{LDM} = 0,005 + (3 * 0,004); \text{LDM} = 0,018 \text{ mg Cu/L}$$

**3.2.1.6 Límite de cuantificación para Cu** El límite de cuantificación del método, se computó en el rango correspondiente al análisis de cobre sin dilución de reactivos llamado (LDC). Estos valores se obtuvieron a partir del análisis estadístico de resultados adquiridos en la tabla N° 14 para el estándar de menor concentración de 0,1 mg Cu/L (sin dilución), empleando la expresión matemática deducida en la ecuación 13 un valor de t para n-1 grados de libertad y un nivel de confianza del 99% se obtuvo un resultado de:

$$\text{LDC} = 0,1 + 3,14 * 0,006 ; \text{LDC} = 0,119 \text{ mg Cu/L}$$

**3.2.1.7 Precisión Cu** La precisión del método analítico se evaluó en términos de CV%, en relación a la ecuación 14, para cada una de las muestras ambientales y estándares preparados y analizados durante el período de la validación el cual fue de siete días. En la tabla 14 citan los resultados obtenidos para cada uno de los mencionados.

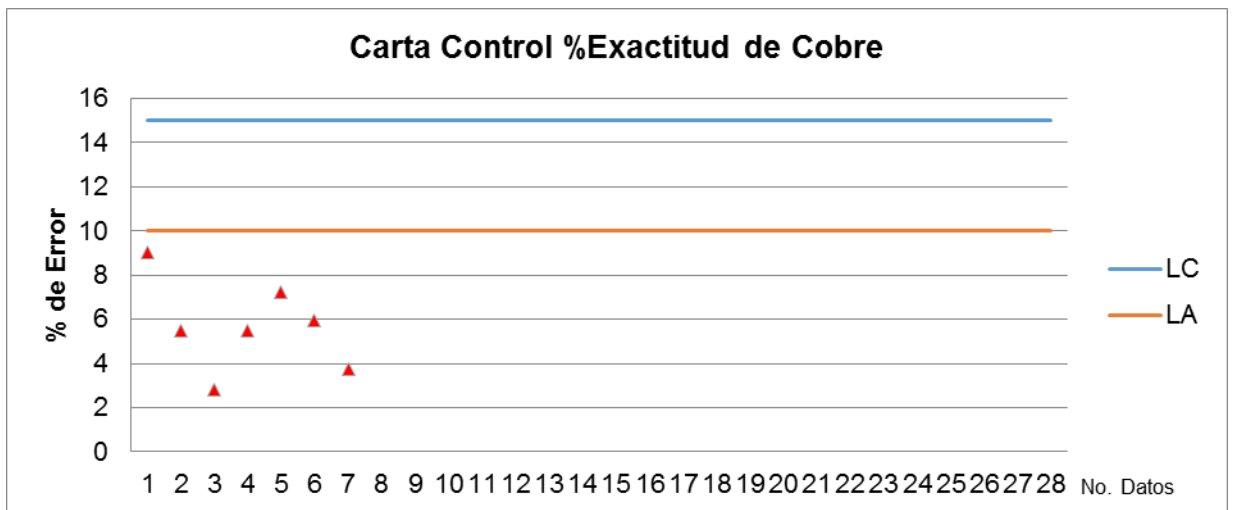
Como respuesta de las mediciones, se identifican que los valores de CV% para los estándares de 0,1 y 1ppm, M, MAB y MAA, son menores al 5%. Lo anterior indica que para muestras ambientales tanto de adiciones altas, bajas y estándares preparados, el método analítico indica una alta precisión en las mediciones obtenidas. Los análisis de precisión para los estándares y muestras ambientales, son conformes a lo establecido por el sistema de calidad, donde se admite un CV% menor al 10%.

**3.2.1.8 Exactitud Cu** Los resultados de exactitud de los estándares preparados se muestran en la parte inferior de la tabla N° 14. La exactitud de los estándares evaluados, se estimó de acuerdo con lo señalado en la metodología y requerimientos planteados por el SM 3020 QUALITY ASSURANCE/QUALITY CONTROL controles de calidad del método, observándose una alta exactitud en todo el rango de medida, con valores superiores al 85%.

**3.2.1.9 Recuperación del método para determinación de Cu** Para las muestras ambientales adicionadas, se calculó porcentaje de recuperación %R, de acuerdo a la expresión matemática, ecuación N°. 8. Para la MAA 105%, para la MAB fue del 109%. Estos valores se aceptan, ya que para el laboratorio y según los criterios dados por el SM 3020 QUALITY ASSURANCE/QUALITY CONTROL él %R debe oscilar entre el 80 y el 115%.

**3.2.1.10 Cartas control determinación de Cu** Se construyeron las cartas de control con los datos obtenidos en la tabla N° 14, para el estándar 1 ppm de cobre. Se visualizan en la figura N° 16 y figura 17:

**Figura 16. Carta control E 1 ppm Cu**



**Figura 17** Carta control Recuperación para Cu



Como se evidencia en las cartas control de exactitud y recuperación del método, no se presentan tendencias de alarma frente a los análisis realizados, este demuestra que la metodología no se encuentra a errores sistemáticos. En la carta control de exactitud para el estándar de 1ppm Cu estos resultados están por debajo del límite de alarma del método, para la carta control de recuperación en las muestras baja y alta son resultados esperados que están muy cercanos al promedio del ensayo esperado, es claro señalar el buen trabajo en el laboratorio.

**3.2.1.11 Incertidumbre para Cu** A continuación, se detalla cada uno de los cálculos realizados, para estimar la incertidumbre para el método de determinación de cobre (SM 3111B), de acuerdo con las fuentes de incertidumbres escogidas en la metodología.

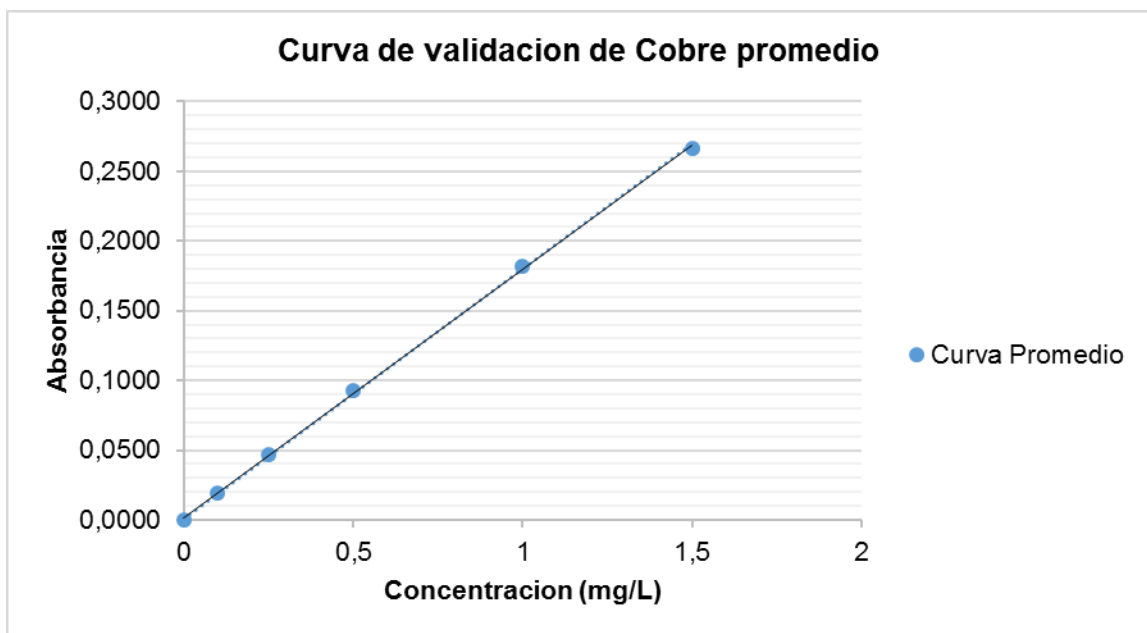
**a. Incertidumbre Curva de Calibración para Cu**

Esta incertidumbre es debida a cada uno de los estándares de preparación que constituyen la curva de calibración, se estimó el cálculo de la incertidumbre según

lo planteado por la guía **Eurachem**. De esta forma se asumen implícitas o despreciables las incertidumbres, debidas a la preparación de los estándares, teniendo en cuenta solo la desviación de la señal del equipo.

De acuerdo con la curva de calibración analizada en el numeral 3.2.1.1, se obtuvo la curva de calibración promedio:

**Figura 18. Curva de Calibración promedio para Cobre**



$m= 0,1796$  y  $b=0,0$ , donde  $m$  es la pendiente y  $b$  el intercepto con el origen. Con estos datos, se procedió a calcular la incertidumbre estándar debida a la curva de calibración, aplicando la siguiente ecuación:

$$u(Co) = \frac{s}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(Co-\bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad \text{Ec. 18}$$

Siendo:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (mC_o + b)]^2}{n-2}} \quad \text{Ec. 19}; \quad S_{xx} = \sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2 \quad \text{Ec. 20}$$

Dónde:

$u(C_o)$ : incertidumbre de la medida  $C_o$ , por la curva de calibración

$S$ : desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal

$A_j$ : las  $j$  lecturas observadas

$C_i$ : las  $i$  concentraciones usadas para la calibración

$p$ : número de veces que se elaboró la curva de calibración

$n$ : número de medidas para la calibración

$C_o$ : concentración en estudio

$\bar{C}$ : Valor medio de las concentraciones utilizadas para la calibración

$S_{xx}$ : suma de los cuadrados de los residuales de las concentraciones

Con esta curva de calibración promedio y los datos de los días validados se consolida cada uno de estos datos en las siguientes tablas:

**Tabla 17. Datos de Absorbancia de los días de Validación para Cu**

DATOS EN ABSORBANCIA							
concentración	1	2	3	4	5	6	7
0,1	0,019	0,018	0,020	0,019	0,019	0,019	0,020
0,25	0,047	0,044	0,048	0,047	0,046	0,047	0,048
0,5	0,092	0,087	0,095	0,092	0,091	0,094	0,096
1	0,180	0,170	0,187	0,183	0,185	0,183	0,185
1,5	0,260	0,253	0,272	0,269	0,268	0,270	0,275

**Tabla 18. Diferencias al cuadrado de cada día con la concentración para Cu**

X	Diferencias al cuadrado						
0,1	1,07744E-06	1,444E-09	4,15344E-06	1,07744E-06	1,07744E-06	1,07744E-06	4,15344E-06
0,25	4,38903E-06	8,19025E-07	9,57903E-06	4,38903E-06	1,19903E-06	4,38903E-06	9,57903E-06
0,5	4,7961E-06	7,8961E-06	2,69361E-05	4,7961E-06	1,4161E-06	1,75561E-05	3,83161E-05
1	1,444E-07	9,25444E-05	5,44644E-05	1,14244E-05	2,89444E-05	1,14244E-05	2,89444E-05
1,5	8,89249E-05	0,000269945	6,6049E-06	1,849E-07	2,0449E-06	3,249E-07	3,10249E-05
Día	1	2	3	4	5	6	7

**Tabla 19: Sumas de cuadrados para Cu**

<b>Suma de cuadrados</b>	0,000775619
<b>suma/n-2</b>	2,35036E-05
<b>s</b>	<b>0,00485</b>
<b>0,1</b>	0,4
<b>0,25</b>	0,25
<b>0,5</b>	0
<b>1</b>	-0,5
<b>1,5</b>	-1
<b>sxx</b>	<b>1,4725</b>
<b>m-B1</b>	0,17962
<b>b-B0</b>	0
<b>n</b>	35
<b>p</b>	7
<b>con. Media</b>	0,5
<b>Co. De mayor desv</b>	1,5

<b>uest.cc</b>	0,01144	<b>MTRA</b>
<b>Uest.rel.CC</b>	<b>0,02933</b>	
<b>U3r</b>		

Con una incertidumbre estándar relativa de **0,02933**.

**b. Incertidumbre de la digestión para Cu**

Se determinó la incertidumbre aportada por la adición de los ácidos participes en la digestión, hasta completar un volumen final de estándares y muestras de 25 mL, tomando en cuenta tolerancia del material volumétrico y distribución, se consignó esta información en la siguiente tabla:

**Tabla 20: Digestión de estándares y muestras por MULTIWAVE para Cu**  
Parámetros para la digestión:

VOL MEDIDO (mL)	TOLERANCIA	TIPO	DISTRIBUCIÓN
2,5	0,01	B	RECTANGULAR
20	0,03	B	RECTANGULAR
2	0,006	B	RECTANGULAR
1	0,01	B	RECTANGULAR

**Resultados para la digestión:**

VOL MEDIDO (mL)	u ESTANDAR	u RELATIVA	u COMBINADA	u COMBINADA TOTAL
2,5	0,005773503	0,002309401	0,002466441	0,011933845
20	0,017320508	0,000866025		
2	0,003464102	0,001732051	0,011676187	
1	0,005773503	0,011547005		

### c. Incertidumbre de la repetibilidad para Cu

Se estimó en esta parte por medio del cálculo de la desviación estándar relativa, debida a la repetibilidad de la muestra de cobre, se consigna esta información en la siguiente tabla:

**Tabla 21: Cálculo de incertidumbre para la repetibilidad de la muestra de Cu**

REPETIBILIDAD MTRA						
CODIGO MTRA	X	DESVIACIÓN	TIPO	DISTRIBUCIÓN	u ESTANDAR	u ESTANDAR RELATIVA
MTRA Cu	0,39	0,015	A	NORMAL	0,0150	0,03846

Finalmente la incertidumbre aportada por la repetibilidad con incertidumbre estándar relativa es **0,03846**.

### d. Incertidumbre combinada del método para Cu

Finalmente se estimó el cálculo de la incertidumbre combinada para el método de cobre, teniendo en cuenta las consideraciones del método y muestras, consignadas en la siguiente tabla:

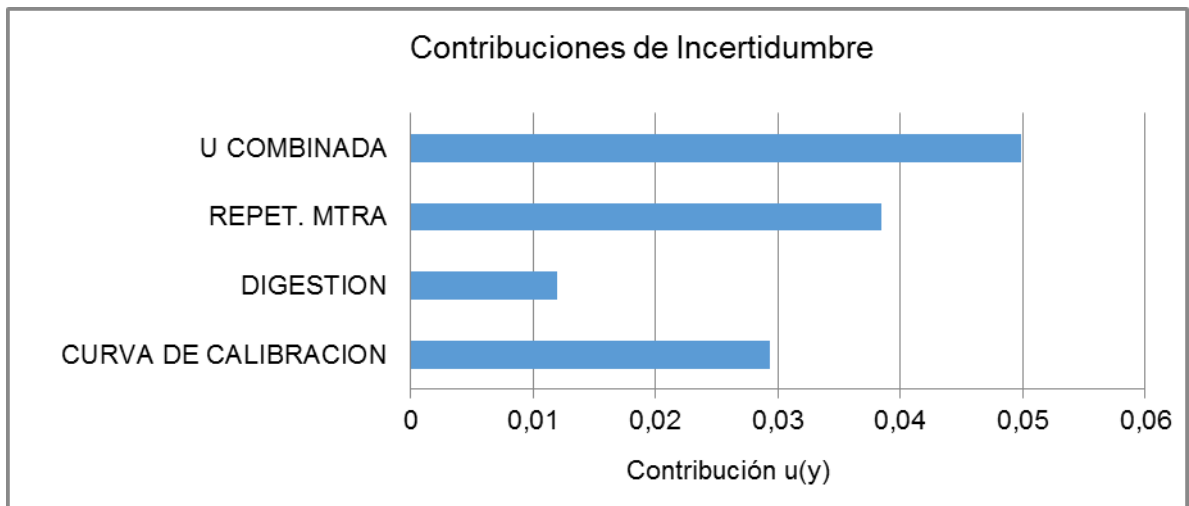
**Tabla 22. Contribuciones de las fuentes de Incertidumbres para la determinación de Cu**

FUENTE	u COMBINADA	U COMBINADA TOTAL	U EXPANDIDA	EXPRESIÓN DE INCERTIDUMBRE
CURVA DE CALIBRACION	0,029333009	0,049821	0,099642	VALOR OBTENIDO +/- (VALOR OBTENIDO*Uexpandida)
DIGESTION	0,011933845			

FUENTE	u COMBINADA	U COMBINADA TOTAL	U EXPANDIDA	EXPRESIÓN DE INCERTIDUMBRE
REPET. MTRA	0,038461538			
U COMBINADA	0,049821			

Posterior a esto, se requiere un análisis donde se permita visualizar estas contribuciones en la figura N° 19:

**Figura 19: Contribuciones de Incertidumbre para la determinación de Cu**



Como se observa en la figura 19 la mayor contribución a la incertidumbre de la medida de cobre, es debida a la repetibilidad de la muestra y a la curva de calibración.

Incertidumbre expandida del método, se obtuvo multiplicando la incertidumbre combinada del método por un factor  $K=2$ , obteniéndose una incertidumbre expandida del método para cobre de **0,099642**, aceptándose para las condiciones de calidad del LEA. **Expresión del resultado final:**  $X \pm U$  mg Cu/L

**3.2.2 Hierro** Se efectuó el análisis y determinación de hierro en las soluciones de trabajo seleccionadas para lo crítico del método analítico normalizado por un tiempo siete días, obteniéndose los siguientes resultados reportados como mg Fe/L registrados en la tabla N° 23:

**Tabla 23. Análisis de muestras y estándares para Fe**

<b>SM 3111B Hierro</b>						
<b>Muestras con digestión y estándares</b>						
<b>No. de datos</b>	<b>Bk</b>	<b>Estándar de 0,3 ppm</b>	<b>Estándar de 1 ppm</b>	<b>M1</b>	<b>MAB</b>	<b>MAA</b>
1	0,036	0,342	1,065	0,911	0,765	1,223
2	0,082	0,397*	1,124	1,016	0,857*	1,314
3	0,053	0,354	1,096	0,989	0,779	1,280
4	0,028	0,335	1,058	0,957	0,739	1,250
5	0,038	0,344	1,078	0,983	0,756	1,274
6	0,039	0,346	1,067	0,994	0,761	1,291
7	0,017	0,331	1,068	0,935	0,741	1,243
8	0,033	0,366	-	0,886	0,720	-
<b>Promedio</b>	<b>0,041</b>	<b>0,345</b>	<b>1,080</b>	<b>0,959</b>	<b>0,751</b>	<b>1,268</b>
<b>DESVEST</b>	<b>0,020</b>	<b>0,012</b>	<b>0,023</b>	<b>0,045</b>	<b>0,020</b>	<b>0,031</b>
<b>CV%</b>	<b>-</b>	<b>3,407</b>	<b>2,151</b>	<b>4,666</b>	<b>2,615</b>	<b>2,453</b>
<b>Valor mínimo</b>	<b>0,017</b>	<b>0,331</b>	<b>1,058</b>	<b>0,886</b>	<b>0,720</b>	<b>1,223</b>
<b>Valor máximo</b>	<b>0,082</b>	<b>0,366</b>	<b>1,124</b>	<b>1,016</b>	<b>0,779</b>	<b>1,314</b>
<b>Intervalo</b>	<b>0,065</b>	<b>0,035</b>	<b>0,067</b>	<b>0,129</b>	<b>0,059</b>	<b>0,091</b>
<b>Número de datos</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
<b>Criterio T</b>						
<b>T<sub>alto</sub></b>	<b>-</b>	<b>1,761</b>	<b>1,934</b>	<b>1,267</b>	<b>1,378</b>	<b>1,490</b>
<b>T<sub>bajo</sub></b>	<b>-</b>	<b>1,214</b>	<b>0,932</b>	<b>1,622</b>	<b>1,624</b>	<b>1,439</b>
<b>T teórico 95%</b>	<b>-</b>	<b>1,940</b>	<b>1,940</b>	<b>2,110</b>	<b>2,030</b>	<b>1,940</b>
<b>% Error</b>	<b>-</b>	<b>15,1</b>	<b>8,0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Exactitud</b>	<b>-</b>	<b>84,9</b>	<b>92,0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Porcentaje de recuperación</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>109</b>	<b>105</b>

**\*DATOS RECHAZADOS**

Los estándares y las muestras ambientales fueron analizados según la metodología propuesta.

En el desarrollo del análisis estadístico de los datos, se empleó la prueba t para el rechazo de datos que no se ajustaban al comportamiento regular de los ensayos se determinó que son datos dispersos, este análisis se basó en calcular un valor t experimental, para el máximo valor de las mediciones llamado  $T_{\text{alto}}$  y un valor mínimo de las mediciones llamado  $T_{\text{bajo}}$ . El valor t experimental se calculó de acuerdo con la expresión matemática ecuación N° 17.

Como resultado de la prueba t, no hubo rechazo de datos en las mediciones realizados. Adicional a esto, se empleó como segundo criterio para el rechazo de datos, la verificación con el %CV establecido internamente en el LEA, siendo este del 10%. De acuerdo con estos criterios, se vio la necesidad de rechazar dos datos para el estándar de 0,3 ppm y un dato para la MAB para asegurar la trazabilidad de la validación.

**3.2.2.2 Intervalo de validación para Fe** En relación a los resultados obtenidos en las curvas de calibración de las mediciones en desarrollo, para la validación de esta técnica, el rango de aplicabilidad del método fue de 0,3 a 2 mg Fe/L de acuerdo a lo reportado a las curvas de calibración.

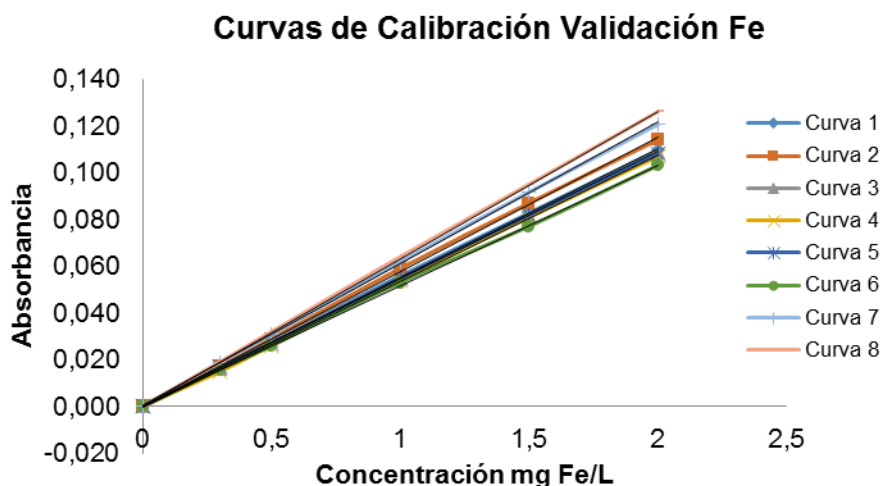
**3.2.2.3 Curva de calibración para Fe** De acuerdo a las indicaciones del método se requiere preparar y leer diariamente una curva de calibración; por lo cual durante este proceso se obtuvo un total de siete curvas. A continuación se registran estos valores en la tabla N°. 24:

**Tabla 24: Datos curvas de calibración para la determinación de Fe**

Día	E 0,3 ppm	E 0,5ppm	E 1ppm	E 1,5ppm	E 2ppm	r	m	b
1	0,017	0,028	0,056	0,083	0,110	0,999925	0,05523	0,000
2	0,017	0,029	0,059	0,087	0,114	0,999762	0,05761	0,000
3	0,016	0,028	0,055	0,082	0,109	0,999907	0,05463	0,000
4	0,015	0,026	0,054	0,081	0,107	0,999824	0,05348	0,000
5	0,017	0,027	0,055	0,082	0,108	0,999877	0,0544	0,000
6	0,016	0,026	0,053	0,077	0,103	0,999831	0,05185	0,000
7	0,019	0,031	0,062	0,092	0,121	0,999781	0,06105	0,000
8	0,019	0,032	0,064	0,095	0,126	0,999947	0,06325	0,000

Con los resultados obtenidos de absorbancia se construyeron las curvas de calibración para la determinación de Fe cada día (figura N° 20).

**Figura 20: Curvas de Calibración Hierro**



**3.2.2.4 Linealidad para Fe** De acuerdo a lo establecido por el SM para la aceptación de las curvas de calibración, estas cumplieron con el criterio de los coeficientes de correlación  $r > 0.995$ . Se confirmó este comportamiento en los

resultados obtenidos para cada una de las curvas, anexo a esto como criterio de confirmación se realizó la prueba t a las curvas de calibración, y se corroboró la linealidad de estas para un 95% de confianza en siete datos, se concluye la existencia de correlación entre los valores de concentración y absorbancia de la curva, a su vez también se determinó que el CV% para las curvas en cada uno de los estándares preparados fue menor al 10% ajustándose a los lineamientos internos del LEA, reafirmando claramente la linealidad, tabla N° 25:

**Tabla 25 Controles Validación Fe**

<b>Controles curvas de calibración Fe</b>			
<b>Estándar (ppm)</b>	<b>desviación</b>	<b>promedio</b>	<b>coeficiente de variación</b>
Bk	0,0000	0,0000	-
0,1	0,0014	0,0170	8,3189
0,25	0,0022	0,0284	7,7527
0,5	0,0040	0,0573	6,9713
1	0,0060	0,0849	7,1094
1,5	0,0077	0,1123	6,8636

**3.2.2.5 Sensibilidad del método para la determinación de Fe** Se tomó la pendiente promedio de las curvas de mínimos cuadrados como el parámetro para determinar la sensibilidad del método, dando como resultado 0,0564 ABS/mg Fe/L y CV% 6,9510% menor al 10%. Se representa esta sensibilidad como el cambio de la absorbancia debido al cambio de la concentración.

**3.2.2.6 Límite de detección (LDM) para Fe** El límite de detección para este método analítico, se estimó con la ecuación 12, y se obtuvo un LDM de:

$$\text{LDM} = 0,041 + (3 * 0,020); \text{LDM} = 0,099 \text{ mg Fe/L}$$

**3.2.2.7 Límite de cuantificación para Fe** El límite de cuantificación del método, se computó en el rango correspondiente al análisis de hierro sin dilución de reactivos llamado (LDC). Estos valores se obtuvieron a partir del análisis estadístico de resultados adquiridos en la tabla N° 23 para el estándar de menor concentración de 0,3 mg Fe/L (sin dilución), empleando la expresión matemática deducida en la ecuación 13 un valor de t para n-1 grados de libertad y un nivel de confianza del 99% se obtuvo un resultado de :

$$\text{LDC} = 0,1 + 3,14 * 0,006 ; \text{LDC} = 0,337 \text{ mg Fe/L}$$

**3.2.2.8 Precisión Fe** La precisión del método analítico se evaluó en términos de CV%, en relación a la ecuación 14, para cada una de las muestras ambientales y estándares preparados y analizados durante el periodo de la validación el cual fue de siete días. En la tabla 23 citan los resultados obtenidos para cada uno de los mencionados.

Como respuesta de las mediciones, se identifican que los valores de CV% para los estándares de 0,3 y 1ppm, M, MAB y MAA, son menores al 5%. Lo anterior indica que para muestras ambientales tanto de adiciones altas, bajas y estándares preparados, el método analítico indica una alta precisión en las mediciones obtenidas. Los análisis de precisión para los estándares y muestras ambientales, son conformes a lo establecido por el sistema de calidad, donde se admite un CV% menor al 10%.

**3.2.2.9 Exactitud Fe** Los resultados de exactitud de los estándares preparados se muestran en la parte inferior de la tabla N°23. La exactitud de los estándares evaluados, se estimó de acuerdo con lo señalado en la metodología y requerimientos planteados por el SM 3020 QUALITY ASSURANCE/QUALITY

CONTROL controles de calidad del método, observándose una alta exactitud en todo el rango de medida, con valores superiores al 85%.

**3.2.2.10 Recuperación del método para determinación de Fe** Para las muestras ambientales adicionadas, se calculó porcentaje de recuperación %R, de acuerdo a la expresión matemática, ecuación N°. 8. Para la MAA 105%, para la MAB fue del 109%. Estos valores se aceptan, ya que para el laboratorio y según los criterios dados por el SM 3020 QUALITY ASSURANCE/QUALITY CONTROL él %R debe oscilar entre el 80 y el 115%.

**3.2.2.11 Cartas control determinación de Fe** Se construyeron las cartas de control con los datos obtenidos en la tabla N° 23, para el estándar de 1 ppm de hierro. Estas se visualizan en las figura N° 21 y figura 22:

**Figura 21. Carta control E 1 ppm Fe**

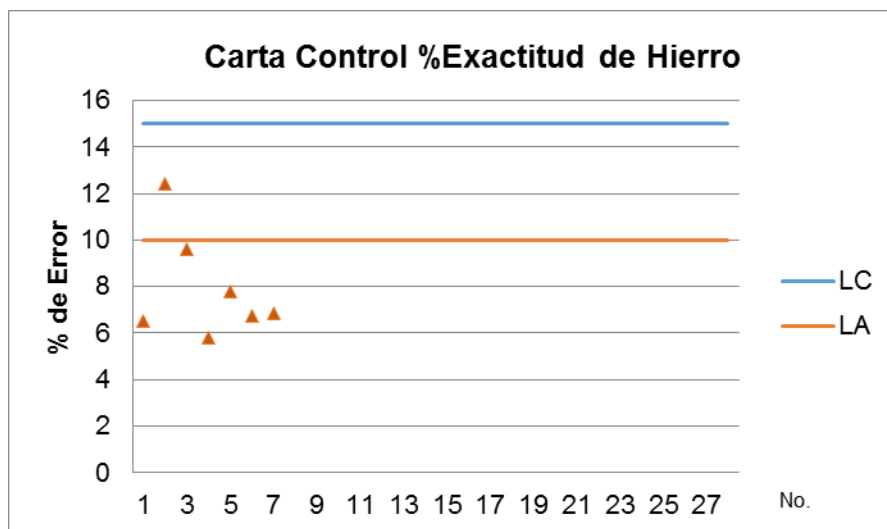
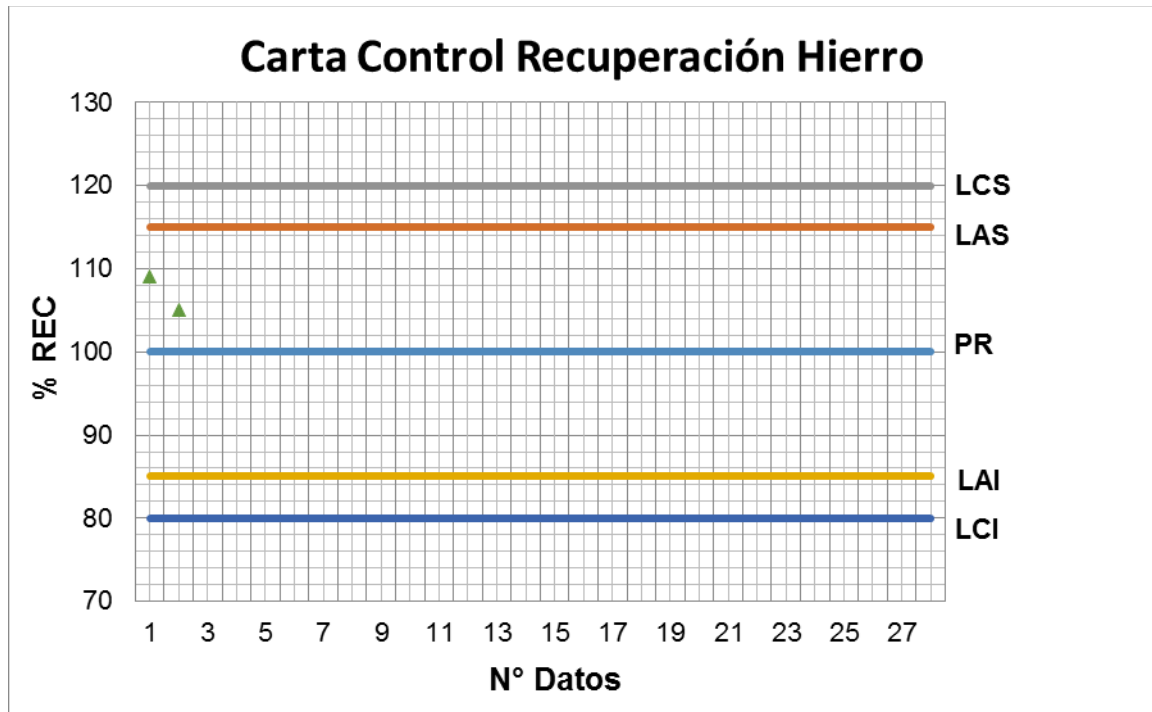


Figura 22. Carta control Recuperación para Fe



Como se evidencia en las cartas control de exactitud y recuperación del método, no se presentan tendencias de alarma frente a los análisis realizados, este demuestra que la metodología no se encuentra a errores sistemáticos. En la carta control de exactitud para el estándar de 1ppm Fe estos resultados la mayoría están por debajo del límite de alarma del método, para la carta control de recuperación en las muestras baja y alta son resultados esperados que están muy cercanos al promedio del ensayo esperado, es claro señalar el buen trabajo en el laboratorio.

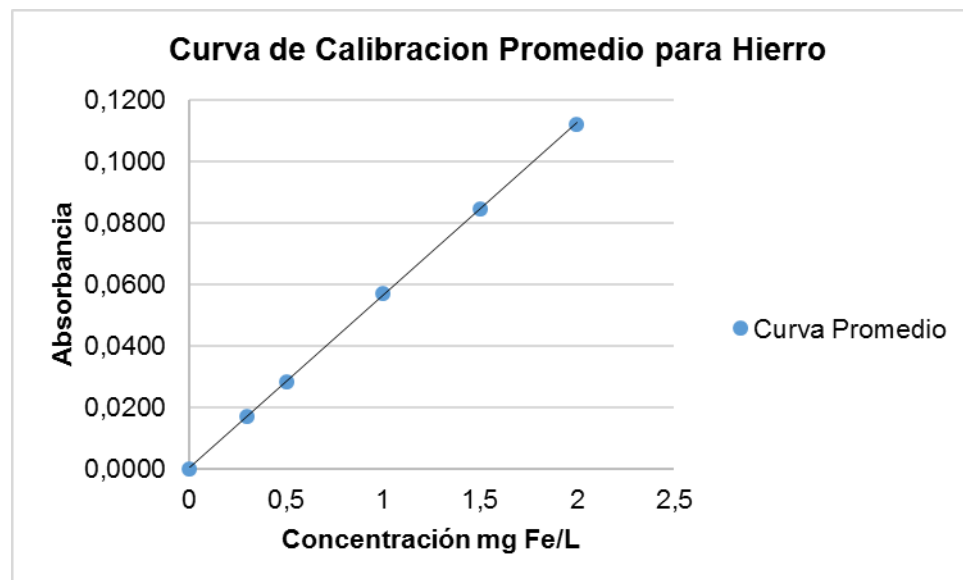
**3.2.2.12 Incertidumbre para Fe** A continuación, se detalla cada uno de los cálculos realizados, para estimar la incertidumbre para el método de determinación de hierro (SM 3111B), de acuerdo con las fuentes de incertidumbres escogidas en la metodología.

### a. Incertidumbre Curva de Calibración para Fe

Esta incertidumbre es debida a cada uno de los estándares de preparación que constituyen la curva de calibración, se estimó el cálculo de la incertidumbre según lo planteado por la guía **Eurachem**. De esta forma se asumen implícitas o despreciables las incertidumbres, debidas a la preparación de los estándares, teniendo en cuenta solo la desviación de la señal del equipo.

De acuerdo con la curva de calibración analizada en el numeral 3.2.2.1, se obtuvo la curva de calibración promedio:

**Figura 23. Curva de Calibración promedio para Hierro**



$m = 0,0564$  y  $b = 0$ , donde  $m$  es la pendiente y  $b$  el intercepto con el origen. Con estos datos, se procedió a calcular la incertidumbre estándar debida a la curva de calibración, aplicando la siguiente ecuación:

$$u(Co) = \frac{s}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(Co - \bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad \text{Ec. 18}$$

Siendo:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (mC_o + b)]^2}{n-2}} \quad \text{Ec. 19}; \quad S_{xx} = \sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2 \quad \text{Ec. 20}$$

Dónde:

$u(C_o)$ : incertidumbre de la medida  $C_o$ , por la curva de calibración

$S$ : desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal

$A_j$ : las  $j$  lecturas observadas

$C_i$ : las  $i$  concentraciones usadas para la calibración

$p$ : número de veces que se elaboró la curva de calibración

$n$ : número de medidas para la calibración

$C_o$ : concentración en estudio

$\bar{C}$ : Valor medio de las concentraciones utilizadas para la calibración

$S_{xx}$ : suma de los cuadrados de los residuales de las concentraciones

Con esta curva de calibración promedio y los datos de los días validados se consolida cada uno de estos datos en las siguientes tablas:

**Tabla 26. Datos de Absorbancia de los días de Validación para Fe**

DATOS EN ABSORBANCIA								
Concentración	1	2	3	4	5	6	7	8
0,3	0,017	0,017	0,016	0,015	0,017	0,016	0,019	0,019
0,5	0,028	0,029	0,028	0,026	0,027	0,026	0,031	0,032
1	0,056	0,059	0,055	0,054	0,055	0,053	0,062	0,064
1,5	0,083	0,087	0,082	0,081	0,082	0,077	0,092	0,095
2	0,110	0,114	0,109	0,107	0,108	0,103	0,121	0,126

**Tabla 27. Diferencias al cuadrado de cada día con la concentración para Fe**

X	Diferencias al cuadrado							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0,3	6,4E-09	6,4E-09	8,464E-07	3,6864E-06	6,4E-09	8,464E-07	4,3264E-06	4,3264E-06
0,5	4E-08	6,4E-07	4E-08	0,00000484	0,00000144	0,00000484	0,00000784	0,00001444
1	1,6E-07	6,76E-06	0,00000196	0,00000576	0,00000196	0,00001156	0,00003136	0,00005776
1,5	2,56E-06	0,00000576	6,76E-06	1,296E-05	6,76E-06	5,776E-05	5,476E-05	0,00010816
2	7,84E-06	1,44E-06	0,00001444	0,00003364	0,00002304	9,604E-05	0,00006724	0,00017424
Día	1	2	3	4	5	6	7	8

**Tabla 28: Sumas de cuadrados para Fe**

<b>suma de cuadrados</b>	0,000838851
<b>suma/n-2</b>	2,2075E-05
<b>s</b>	<b>0,00470</b>
0,3	0,7
0,5	0,5
1	0
1,5	-0,5
2	-1
<b>sxx</b>	<b>1,99</b>

<b>m-B1</b>	0,0564	
<b>b-B0</b>	0	
<b>n</b>	40	
<b>p</b>	8	
<b>con. Media</b>	1	
<b>Co. De mayor desv</b>	2	
<b>uest.cc</b>	0,03238	MTRA
<b>Uest.rel.CC</b>	<b>0,03394</b>	
<b>U4r</b>		

Con una incertidumbre estándar relativa de **0,03394**.

**b. Incertidumbre de la digestión para Fe**

Se determinó la incertidumbre aportada por la adición de los ácidos participes en la digestión, hasta completar un volumen final de estándares y muestras de 25 mL, tomando en cuenta tolerancia del material volumétrico y distribución, se consignó esta información en la siguiente tabla:

**Tabla 29: Digestión de estándares y muestras por MULTIWAVE para Fe**  
**Parámetros para la digestión:**

<b>VOL MEDIDO (mL)</b>	<b>TOLERANCIA</b>	<b>TIPO</b>	<b>DISTRIBUCIÓN</b>
2,5	0,01	B	RECTANGULAR
20	0,03	B	RECTANGULAR
2	0,006	B	RECTANGULAR
1	0,01	B	RECTANGULAR

**Resultados para la digestión:**

<b>VOL MEDIDO (mL)</b>	<b>u ESTANDAR</b>	<b>u RELATIVA</b>	<b>u COMBINADA</b>	<b>u COMBINADA TOTAL</b>
2,5	0,005773503	0,002309401	0,002466441	0,011933845
20	0,017320508	0,000866025		
2	0,003464102	0,001732051	0,011676187	
1	0,005773503	0,011547005		

### c. Incertidumbre de la repetibilidad para Fe

Se estimó en esta parte por medio del cálculo de la desviación estándar relativa, debida a la repetibilidad de la muestra de cobre, se consigna esta información en la siguiente tabla:

**Tabla 30. Cálculo de incertidumbre para la repetibilidad de la muestra de Fe**

REPETIBILIDAD MTRA						
CODIGO MTRA	X	DESVIACIÓN	TIPO	DISTRIBUCIÓN	u ESTANDAR	u ESTANDAR RELATIVA
MTRA Fe	0,95	0,044	A	NORMAL	0,0440	0,04612

Finalmente la incertidumbre aportada por la repetibilidad con incertidumbre estándar relativa es **0,04612**.

### d. Incertidumbre combinada del método para Fe

Finalmente se estimó el cálculo de la incertidumbre combinada para el método de hierro, teniendo en cuenta las consideraciones del método y muestras, consignadas en la siguiente tabla:

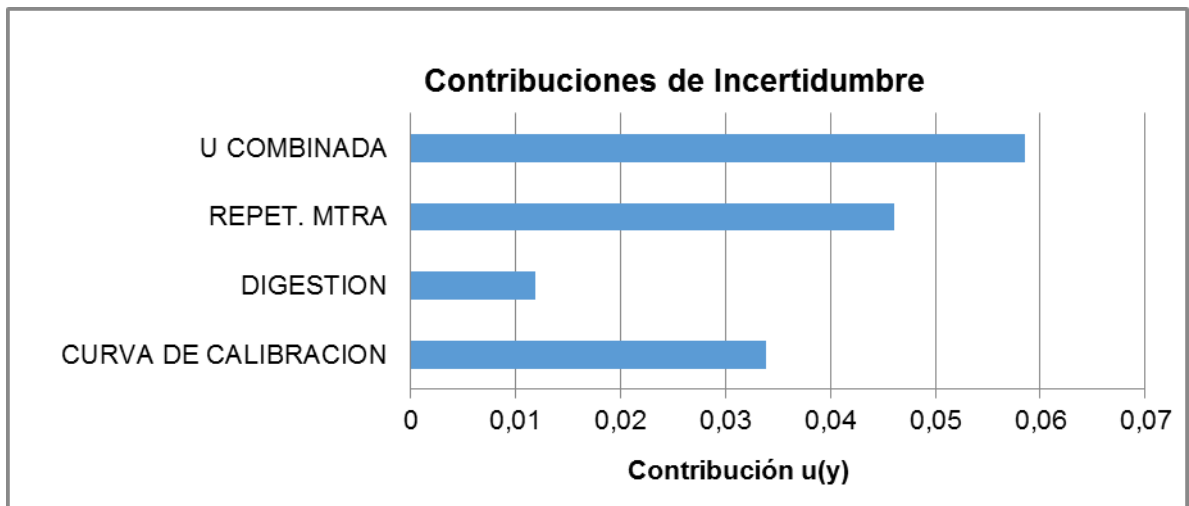
**Tabla 31: Contribuciones de las fuentes de Incertidumbres para la determinación de Fe**

FUENTE	u COMBINADA	U COMBINADA TOTAL	U EXPANDIDA	EXPRESIÓN DE INCERTIDUMBRE
CURVA DE CALIBRACION	0,033939286	0,058493531	0,116987061	VALOR OBTENIDO +/- (VALOR OBTENIDO*Uexpandida)
DIGESTION	0,011933845			

FUENTE	u COMBINADA	U COMBINADA TOTAL	U EXPANDIDA	EXPRESIÓN DE INCERTIDUMBRE
REPET. MTRA	0,046121593			
U COMBINADA	0,058493531			

Posterior a esto, se requiere un análisis donde se permita visualizar estas contribuciones en la figura N° 24:

**Figura 24. Contribuciones de Incertidumbre para la determinación de Fe**



Como se observa en la figura 24 la mayor contribución a la incertidumbre de la medida de hierro, es debida a la repetibilidad de la muestra y a la curva de calibración.

Incertidumbre expandida del método, se obtuvo multiplicando la incertidumbre combinada del método por un factor  $K=2$ , obteniéndose una incertidumbre expandida del método para cobre de **0,116987061**, aceptándose para las condiciones de calidad del LEA.

**Expresión del resultado final:**  $X \pm U$  mg Fe/L

**3.2.3 Mercurio** Se efectuó el análisis y determinación de mercurio en las soluciones de trabajo seleccionadas para lo crítico del método analítico normalizado por un tiempo siete días, obteniéndose los siguientes resultados reportados como  $\mu\text{g Hg/L}$  registrados en la tabla N° 32:

**Tabla 32. Análisis de muestras y estándares para Hg**

<b>SM 3112B Vapor Frio Hg</b>						
<b>Muestras con Digestión</b>						
<b>No. de datos</b>	<b>Bk</b>	<b>Estándar de 2.5 ppb</b>	<b>Estándar de 10 ppb</b>	<b>M1</b>	<b>MAB</b>	<b>MAA</b>
1	0	2,533	9,903	3,210	4,548	13,960
2	0	2,510	9,789	3,572	4,509	13,720
3	0	2,506	10,000	2,769	3,720	12,200
4	0	2,495	9,764	3,482	4,411	13,870
5	0	2,526	10,030	3,053	3,879	12,850
6	0	2,417	9,990	2,976	4,131	13,970
7	0	2,400	9,911	2,846	3,580	11,058
<b>Promedio</b>	-	<b>2,484</b>	<b>9,912</b>	<b>3,130</b>	<b>4,111</b>	<b>13,090</b>
<b>DESVEST</b>	-	<b>0,053</b>	<b>0,104</b>	<b>0,307</b>	<b>0,393</b>	<b>1,119</b>
<b>CV%</b>	-	<b>2,142</b>	<b>1,049</b>	<b>9,816</b>	<b>9,568</b>	<b>8,550</b>
<b>Valor mínimo</b>	-	<b>2,400</b>	<b>9,764</b>	<b>2,769</b>	<b>3,380</b>	<b>11,058</b>
<b>Valor máximo</b>	-	<b>2,533</b>	<b>10,030</b>	<b>3,572</b>	<b>4,548</b>	<b>13,970</b>
<b>Intervalo</b>	-	<b>0,133</b>	<b>0,266</b>	<b>0,803</b>	<b>0,968</b>	<b>2,912</b>
<b>Número de datos</b>	-	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
<b>Criterio T</b>						
<b>Talto</b>	-	<b>0,923</b>	<b>1,131</b>	<b>1,440</b>	<b>1,111</b>	<b>0,787</b>
<b>Tbajo</b>	-	<b>1,576</b>	<b>1,428</b>	<b>1,174</b>	<b>1,350</b>	<b>1,815</b>
<b>T teórico</b>	-	<b>1,940</b>	<b>1,940</b>	<b>1,940</b>	<b>1,940</b>	<b>1,940</b>

<b>SM 3112B Vapor Frio Hg</b>						
<b>Muestras con Digestión</b>						
<b>No. de datos</b>	<b>Bk</b>	<b>Estándar de 2.5 ppb</b>	<b>Estándar de 10 ppb</b>	<b>M1</b>	<b>MAB</b>	<b>MAA</b>
<b>95%</b>						
<b>% Error (15%)</b>	-	<b>0,65</b>	<b>0,88</b>	-	-	-
<b>Exactitud (85%)</b>	-	<b>99,4</b>	<b>99,1</b>	-	-	-
<b>Porcentaje de recuperación (70% - 130%)</b>	-	-	-	-	<b>100,397</b>	<b>99,913</b>

**\*DATOS RECHAZADOS**

Los estándares y las muestras ambientales fueron analizados según la metodología propuesta.

En el desarrollo del análisis estadístico de los datos, se empleó la prueba t para el rechazo de datos que no se ajustaban al comportamiento regular de los ensayos se determinó que son datos dispersos, este análisis se basó en calcular un valor t experimental, para el máximo valor de las mediciones llamado  $T_{\text{alto}}$  y un valor mínimo de las mediciones llamado  $T_{\text{bajo}}$ . El valor t experimental se calculó de acuerdo con la expresión matemática ecuación N° 17.

Como resultado de la prueba t, no hubo rechazo de datos en las mediciones realizados. Adicional a esto, se empleó como segundo criterio para el rechazo de datos, la verificación con el %CV establecido internamente en el LEA, siendo este menor del 10%. De acuerdo con este criterio, no se vio la necesidad de rechazar datos de las mediciones realizadas.

**3.2.3.1 Intervalo de validación para Hg** En relación a los resultados obtenidos en las curvas de calibración de las mediciones en desarrollo, para la validación de esta técnica, el rango de aplicabilidad del método fue de 2,5 a 25 µg Hg/L de acuerdo a lo reportado a las curvas de calibración.

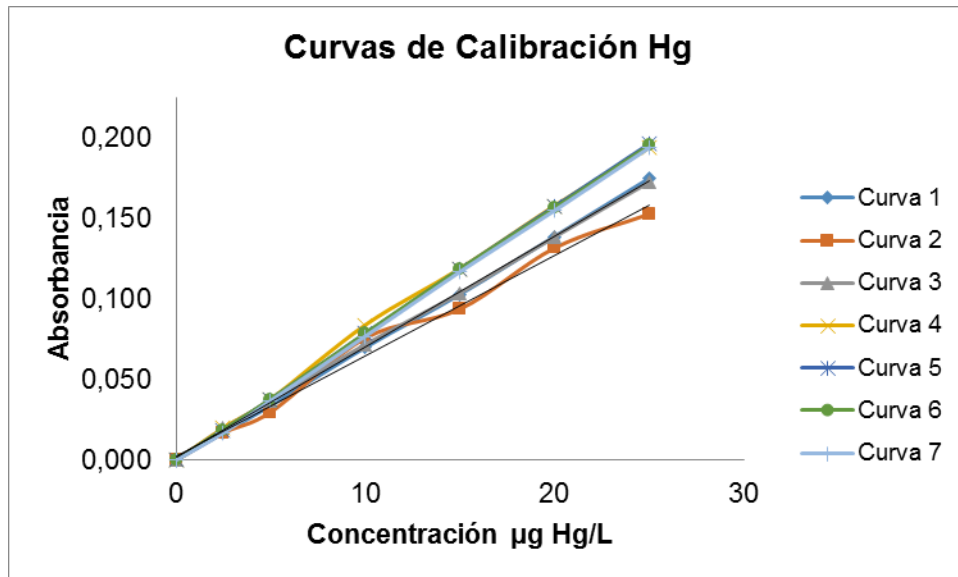
**3.2.3.2 Curva de calibración para Hg** De acuerdo a las indicaciones del método se requiere preparar y leer diariamente una curva de calibración; por lo cual durante este proceso se obtuvo un total de siete curvas donde se trabajó para obtener un total de siete datos por estándar. A continuación se registran estos valores en la tabla N°. 33:

**Tabla 33. Datos curvas de calibración para la determinación de Hg**

Día	E 2,5 ppb	E 5 ppb	E 10 ppb	E 15 ppb	E 20 ppb	E 25 ppb	r	m	b
1	0,017	0,034	0,070	0,103	0,139	0,175	0,999938	0,006980	0,000
2	0,015	0,030	0,060	0,094	0,122	0,153	0,999745	0,006120	0,000
3	0,020	0,037	0,072	0,104	0,139	0,173	0,999437	0,006960	0,000
4	0,024	0,044	0,084	0,119	0,158	0,194	0,998458	0,007910	0,000
5	0,019	0,038	0,079	0,119	0,158	0,197	0,999944	0,007890	0,000
6	0,019	0,038	0,079	0,119	0,157	0,196	0,999938	0,007850	0,000
7	0,017	0,037	0,077	0,117	0,155	0,194	0,999854	0,007770	0,000

Con los resultados obtenidos de absorbancia se construyeron las curvas de calibración para la determinación de Hg cada día (figura N° 25).

**Figura 25: Curvas de Calibración Mercurio**



Para el caso de esta validación, se reportarán todos los resultados en µg Hg/L, pero por efecto del estándar con el cual se prepararon los estándares pertenecientes de la curva calibración, este es de 1000 mg Hg/L.

**3.2.3.3 Linealidad para Hg** De acuerdo a lo establecido por el SM para la aceptación de las curvas de calibración, estas cumplieron con el criterio de los coeficientes de correlación  $r > 0.995$ . Se confirmó este comportamiento en los resultados obtenidos para cada una de las curvas, anexo a esto como criterio de confirmación se realizó la prueba t de student a las curvas de calibración, y se corroboró la linealidad de estas para un 95% de confianza en siete datos seleccionados, se concluye la existencia de correlación entre los valores de concentración y absorbancia de la curva, a su vez también se determinó que el CV% para las curvas en cada uno de los estándares preparados fue menor al 10% ajustándose a los lineamientos internos del LEA, reafirmando claramente la linealidad, tabla N° 34:

**Tabla 34. Controles Validación Hg**

<b>Controles curvas de calibración Hg</b>			
<b>Estándar (ppb)</b>	<b>desviación</b>	<b>promedio</b>	<b>coeficiente de variación</b>
Bk	0,0000	0,0000	-
2,5	0,0017	0,0184	9,3987
5	0,0039	0,0360	9,9833
10	0,0062	0,0767	8,0707
15	0,0104	0,1107	9,3576
20	0,0112	0,1483	7,5297
25	0,0168	0,1831	9,1516

**3.2.3.4 Sensibilidad del método para la determinación de Hg** Se tomó la pendiente promedio de las curvas de mínimos cuadrados como el parámetro para determinar la sensibilidad del método, dando como resultado 0,0074 ABS/ $\mu$ g Hg/L y CV% 9,3441% menor al 10%. Se representa esta sensibilidad como el cambio de la absorbancia debido al cambio de la concentración.

**3.2.3.5 Límite de detección (LDM) para Hg** Para el cálculo del límite de detección se tomó como criterio el comportamiento de los blanco a estos se les siguió la misma metodología que a los estándares y muestras, se buscó encontrar el analito en el blanco, pero como en cualquier otra situación, este proceso de comparación implica errores experimentales (en la medida del blanco y en la de la muestra analizada). Dando como resultado cero.

**3.2.3.6 Límite de cuantificación para Hg** El límite de cuantificación del método, se computó en el rango correspondiente al análisis de mercurio sin dilución de reactivos llamado (LDC). Estos valores se obtuvieron a partir del análisis estadístico de resultados adquiridos en la tabla N° 20 para el estándar de menor

concentración de 2,5 µg Hg/L (sin dilución), empleando la expresión matemática deducida en la ecuación 14 un valor de t para n-1 grados de libertad y un nivel de confianza del 99% se obtuvo un resultado de :

$$\text{LDC} = 2,5 + (3,14 * 0,053) ; \text{LDC} = 2,667 \mu\text{g Hg/L}$$

**3.2.3.7 Precisión Hg** La precisión del método analítico se evaluó en términos de CV%, en relación a la ecuación 14, para cada una de las muestras ambientales y estándares preparados y analizados durante el periodo de la validación el cual fue de siete días pero para la validación. En la tabla N° 32 citan los resultados obtenidos para cada uno de los mencionados.

Como respuesta de las mediciones, se identifican que los valores de CV% para los estándares de 2,5 y 10 ppb, M, MAB y MAA, son menores al 5%. Lo anterior indica que para muestras ambientales tanto de adiciones altas, bajas y estándares preparados, el método analítico indica una alta precisión en las mediciones obtenidas. Los análisis de precisión para los estándares y muestras ambientales, son conformes a lo establecido por el sistema de calidad, donde se admite un CV% menor al 10%.

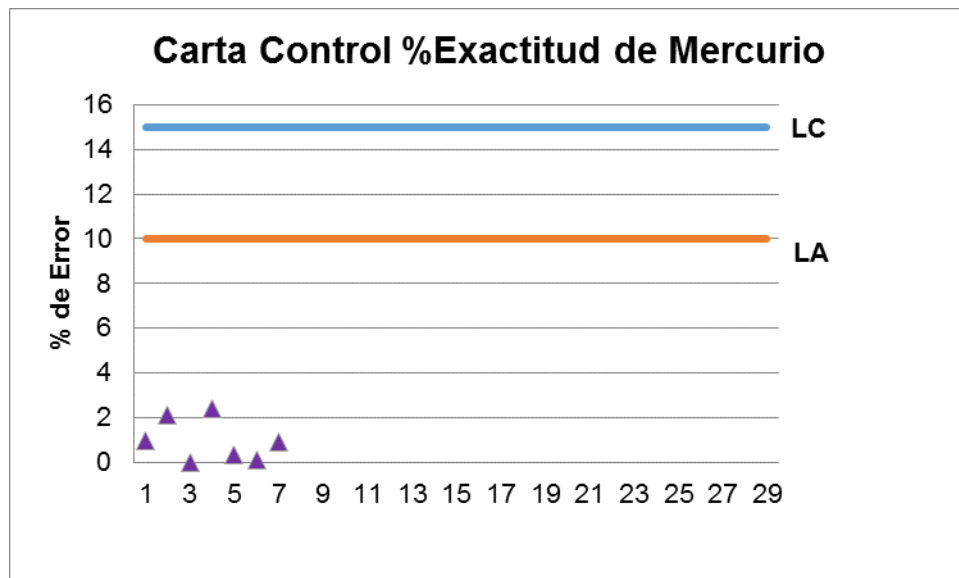
**3.2.3.8 Exactitud Hg** Los resultados de exactitud de los estándares preparados se muestran en la parte inferior de la tabla N° 32. La exactitud de los estándares evaluados, se estimó de acuerdo con lo señalado en la metodología y requerimientos planteados por el SM 3020 QUALITY ASSURANCE/QUALITY CONTROL, controles de calidad del método, observándose una alta exactitud en todo el rango de medida, con valores superiores al 85%.

**3.2.3.9 Recuperación del método para determinación de Hg** Para las muestras ambientales adicionadas, se calculó porcentaje de recuperación %R, de acuerdo a la expresión matemática, ecuación N°. 9. Para la MAA 99,91 %, para la MAB fue

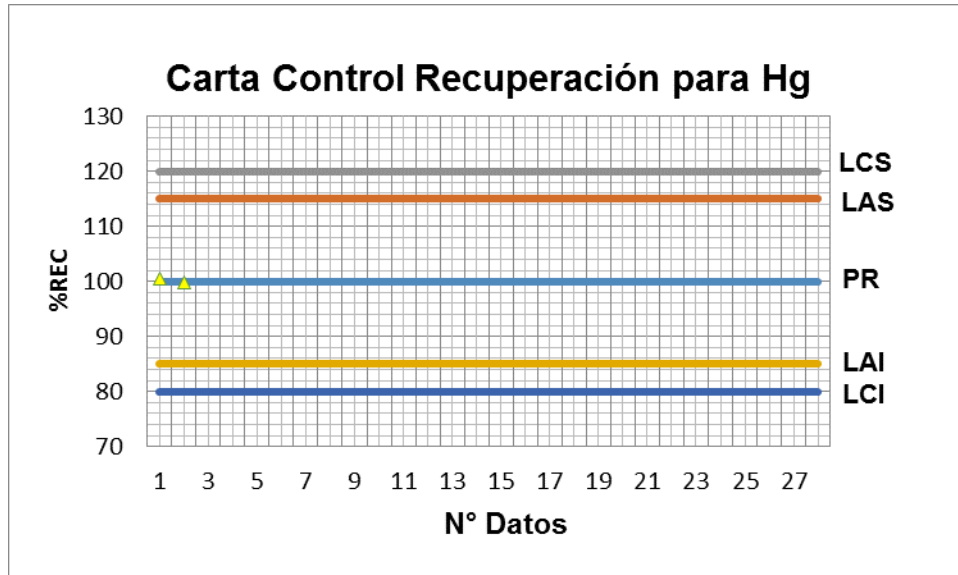
del 100,4 %. Estos valores se aceptan, ya que para el laboratorio y según los criterios dados por el SM 3020 QUALITY ASSURANCE/QUALITY CONTROL el %R debe oscilar entre el 70 y el 130%, característico para este metal.

**3.2.3.10 Cartas control determinación de Hg** Se construyeron las cartas de control con los datos obtenidos en la tabla N° 32, para los estándares de 10 ppb de mercurio. Estas se visualizan en las figura N° 26 y figura 27:

**Figura 26: Carta control E 10 ppb Hg**



**Figura 27: Carta control Recuperación para Hg**



Como se evidencia en las cartas control de exactitud y recuperación del método, no se presentan tendencias de alarma frente a los análisis realizados, este demuestra que la metodología no se encuentra a errores sistemáticos. En la carta control de exactitud para el estándar de 10ppb Hg estos resultados están por debajo del límite de alarma del método cercanos al cero, para la carta control de recuperación en las muestras baja y alta son resultados esperados que están sobre al promedio del ensayo esperado, es claro señalar el buen trabajo en el laboratorio.

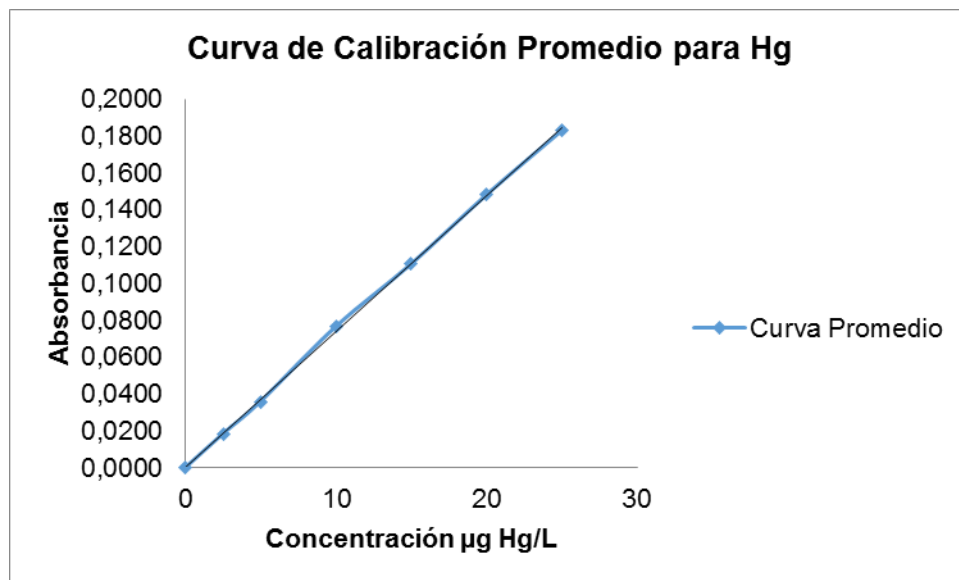
**3.2.3.11 Incertidumbre para Hg** A continuación, se detalla cada uno de los cálculos realizados, para estimar la incertidumbre para el método de determinación de hierro (SM 3111B), de acuerdo con las fuentes de incertidumbres escogidas en la metodología.

### a. Incertidumbre Curva de Calibración para Hg

Esta incertidumbre es debida a cada uno de los estándares de preparación que constituyen la curva de calibración, se estimó el cálculo de la incertidumbre según lo planteado por la guía **Eurachem**. De esta forma se asumen implícitas o despreciables las incertidumbres, debidas a la preparación de los estándares, teniendo en cuenta solo la desviación de la señal del equipo.

De acuerdo con la curva de calibración analizada en el numeral 3.2.3.1, se obtuvo la curva de calibración promedio:

**Figura 28. Curva de Calibración promedio para Mercurio**



$m= 0,0074$  y  $b=0$ , donde  $m$  es la pendiente y  $b$  el intercepto con el origen. Con estos datos, se procedió a calcular la incertidumbre estándar debida a la curva de calibración, aplicando la siguiente ecuación:

$$u(Co) = \frac{s}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(Co-\bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad \text{Ec. 18}$$

Siendo:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (mC_o + b)]^2}{n-2}} \quad \text{Ec. 19}; \quad S_{xx} = \sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2 \quad \text{Ec. 20}$$

Dónde:

$u(C_o)$ : incertidumbre de la medida  $C_o$ , por la curva de calibración

$S$ : desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal

$A_j$ : las  $j$  lecturas observadas

$C_i$ : las  $i$  concentraciones usadas para la calibración

$p$ : número de veces que se elaboró la curva de calibración

$n$ : número de medidas para la calibración

$C_o$ : concentración en estudio

$\bar{C}$ : Valor medio de las concentraciones utilizadas para la calibración

$S_{xx}$ : suma de los cuadrados de los residuales de las concentraciones

Con esta curva de calibración promedio y los datos de los días validados se consolida cada uno de estos datos en las siguientes tablas:

**Tabla 35: Datos de Absorbancia de los días de Validación para Hg**

DATOS EN ABSORBANCIA							
Concentración	1	2	3	4	5	6	7
2,5	0,017	0,017	0,020	0,020	0,019	0,019	0,017
5	0,034	0,030	0,037	0,038	0,038	0,038	0,037
10	0,070	0,076	0,072	0,084	0,079	0,079	0,077
15	0,103	0,094	0,104	0,119	0,119	0,119	0,117
20	0,139	0,132	0,139	0,158	0,158	0,157	0,155
25	0,175	0,153	0,173	0,194	0,197	0,196	0,194

**Tabla 36: Diferencias al cuadrado de cada día con la concentración para Hg**

X	Diferencias al cuadrado						
	1	2	3	4	5	6	7
2,5	0,00000225	0,00000225	2,25E-06	2,25E-06	2,5E-07	2,5E-07	0,00000225
5	9E-06	4,9E-05	4,81482E-35	1E-06	1E-06	1E-06	4,8148E-35
10	0,000016	4E-06	4E-06	1E-04	2,5E-05	2,5E-05	9E-06
15	6,4E-05	0,000289	4,9E-05	6,4E-05	6,4E-05	6,4E-05	3,6E-05
20	8,1E-05	0,000256	8,1E-05	1E-04	1E-04	8,1E-05	4,9E-05
25	0,0001	0,001024	0,000144	8,1E-05	0,000144	0,000121	8,1E-05
Día	1	2	3	4	5	6	7

**Tabla 37. Sumas de cuadrados para Hg**

<b>suma de cuadrados</b>	0,00332875
<b>suma/n-2</b>	8,32188E-05
<b>s</b>	<b>0,00912</b>
2,5	8,75
5	6,25
10	1,25
15	-3,75
20	-8,75
25	-13,75
<b>sxx</b>	<b>396,875</b>

<b>m-B1</b>	0,0074	MTRA
<b>b-B0</b>	0	
<b>n</b>	42	
<b>p</b>	7	
<b>con. Media</b>	11,25	
<b>Co. De mayor desv</b>	25	
<b>uest.cc</b>	0,51599	
<b>Uest.rel.CC U4r</b>	<b>0,03942</b>	

Con una incertidumbre estándar relativa de **0,03942**.

### b. Incertidumbre de la digestión para Hg

Se determinó la incertidumbre aportada por la adición de los ácidos participes en la digestión, hasta completar un volumen final de estándares y muestras de 25 mL, tomando en cuenta tolerancia del material volumétrico y distribución, se consignó esta información en la siguiente tabla:

**Tabla 38 Digestión de estándares y muestras por baño termostático para Hg**  
Parámetros para la digestión:

MATERIAL VOLUMETRICO	VOL MEDIDO (mL)	TOLERANCIA	TIPO	DISTRIBUCIÓN
Termómetro	93 (°C)	0,1	B	RECTANGULAR
Pipeta 5 mL	5	0,003	B	RECTANGULAR
Pipeta 2,5 mL	2,5	0,01	B	RECTANGULAR
Pipeta 20 mL graduada	20	0,03	B	RECTANGULAR
Pipeta 2 mL	2	0,0019	B	RECTANGULAR
opcional pipeta de 10 mL	10	0,004	B	RECTANGULAR

### Resultados para la digestión:

VOL MEDIDO (mL)	u ESTANDAR	u RELATIVA	u COMBINADA	u COMBINADA TOTAL
93 (°C)	0,057735027	0,000620807	0,002634939	0,002634939
5	0,001732051	0,00034641		
2,5	0,005773503	0,002309401		
20	0,017320508	0,000866025		

VOL MEDIDO (mL)	u ESTANDAR	u RELATIVA	u COMBINADA	u COMBINADA TOTAL
2	0,001096966	0,000548483		
10	0,002309401	0,00023094		

### c. Incertidumbre de la repetibilidad para Hg

Se estimó en esta parte por medio del cálculo de la desviación estándar relativa, debida a la repetibilidad de la muestra de cobre, se consigna esta información en la siguiente tabla:

**Tabla 39. Cálculo de incertidumbre para la repetibilidad de la muestra de Hg**

REPETIBILIDAD MTRA						
CODIGO MTRA	X	DESVIACIÓN	TIPO	DISTRIBUCIÓN	u ESTANDAR	u ESTANDAR RELATIVA
MTRA Hg	3,13	0,044	A	NORMAL	0,0440	0,01406

Finalmente la incertidumbre aportada por la repetibilidad con incertidumbre estándar relativa es **0,01406**.

### d. Incertidumbre combinada del método para Hg

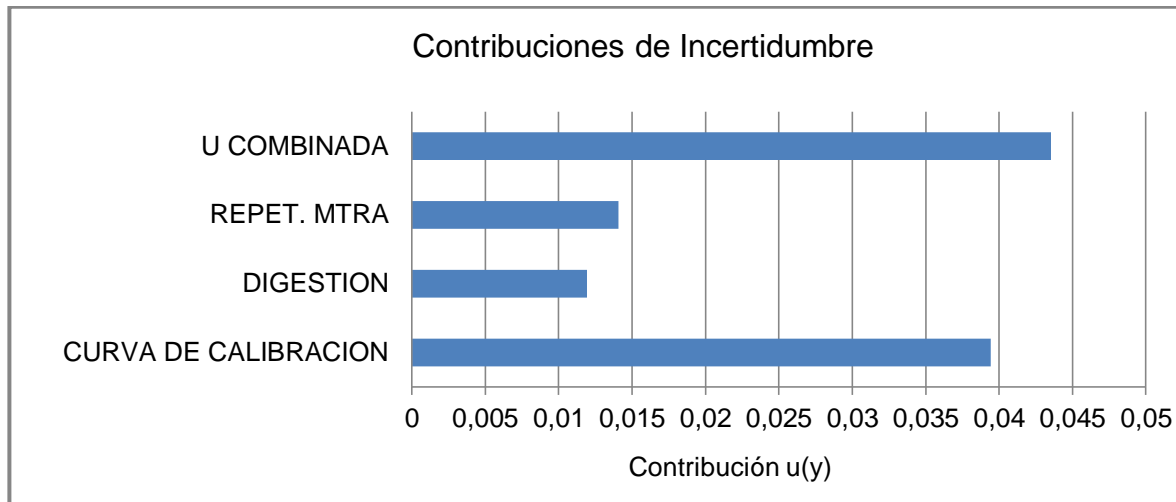
Finalmente se estimó el cálculo de la incertidumbre combinada para el método de hierro, teniendo en cuenta las consideraciones del método y muestras, consignadas en la siguiente tabla:

**Tabla 40. Contribuciones de las fuentes de Incertidumbres para la determinación de Hg**

FUENTE	u COMBINADA	U COMBINADA TOTAL	U EXPANDIDA	EXPRESIÓN DE INCERTIDUMBRE
CURVA DE CALIBRACION	0,039418759	0,041933221	0,08386644 1	<b>VALOR OBTENIDO +/- (VALOR OBTENIDO *Uexpandida)</b>
DIGESTION	0,002634939			
REPET. MTRA	0,014057508			
<b>U COMBINADA</b>	0,041933221			

Posterior a esto, se requiere un análisis donde se permita visualizar estas contribuciones en la figura N° 29:

**Figura 29. Contribuciones de Incertidumbre para la determinación de Hg**



Como se observa en la figura 29 la mayor contribución a la incertidumbre de la medida de mercurio, es debida a la curva de calibración en mayor proporción.

Incertidumbre expandida del método, se obtuvo multiplicando la incertidumbre combinada del método por un factor  $K=2$ , obteniéndose una incertidumbre expandida del método para cobre de **0,083866441**, aceptándose para las condiciones de calidad del LEA.

**Expresión del resultado final:**  $X \pm U \mu\text{g Hg/L}$

**3.2.4 Arsénico** Finalmente se efectuó el análisis y determinación de arsénico en las soluciones de trabajo seleccionadas para lo crítico de este método analítico normalizado por un intervalo de siete días, obteniéndose los siguientes resultados reportados como  $\mu\text{g As/L}$  registrados en la tabla N° 41:

**Tabla 41. Análisis de muestras y estándares para As**

<b>SM 3114 B Determinación As</b>						
<b>Muestras con Digestión</b>						
<b>No. de datos</b>	<b>Bk</b>	<b>Estándar de 2 ppb</b>	<b>Estándar de 20 ppb</b>	<b>M1</b>	<b>MAB</b>	<b>MAA</b>
1	0	2,120	19,842	7,864	7,512	12,200
2	0	1,903	19,684	7,506	7,385	12,198
3	0	1,945	19,358	7,649	7,483	12,186
4	0	1,895	20,064	7,268	7,400	12,215
5	0	2,045	20,106	7,554	7,508	12,204
6	0	2,102	19,888	7,661	7,398	12,178
7	0	1,888	20,186	7,843	7,564	12,204
<b>Promedio</b>	<b>0</b>	<b>1,99</b>	<b>19,88</b>	<b>7,62</b>	<b>7,46</b>	<b>12,20</b>
<b>DESVEST</b>	-	<b>0,10</b>	<b>0,29</b>	<b>0,21</b>	<b>0,07</b>	<b>0,01</b>
<b>CV%</b>	-	<b>5,09</b>	<b>1,44</b>	<b>2,69</b>	<b>0,94</b>	<b>0,10</b>
<b>Valor mínimo</b>	-	<b>1,888</b>	<b>19,358</b>	<b>7,268</b>	<b>7,385</b>	<b>12,178</b>
<b>Valor máximo</b>	-	<b>2,120</b>	<b>20,186</b>	<b>7,864</b>	<b>7,564</b>	<b>12,215</b>
<b>Intervalo</b>	-	<b>0,232</b>	<b>0,828</b>	<b>0,596</b>	<b>0,179</b>	<b>0,037</b>
<b>Número de</b>	-	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>

SM 3114 B Determinación As						
Muestras con Digestión						
No. de datos	Bk	Estándar de 2 ppb	Estándar de 20 ppb	M1	MAB	MAA
datos						
Criterio T						
Talto	-	1,33	1,09	1,18	1,43	1,39
Tbajo	-	0,96	1,81	1,72	1,13	1,61
T teórico 95%	-	1,94	1,94	1,94	1,94	1,94
% Error (15%)	-	0,73	0,62		-	-
Exactitud (85%)	-	99,27	99,38	-	89,84	99,16
Porcentaje de recuperación (70% - 130%)	-	-	-	-	-	-

**\*DATOS RECHAZADOS**

Los estándares y las muestras ambientales fueron analizados según la metodología propuesta.

En el desarrollo del análisis estadístico de los datos, se empleó la prueba t para el rechazo de datos que no se ajustaban al comportamiento regular de los ensayos se determinó que son datos dispersos, este análisis se basó en calcular un valor t experimental, para el máximo valor de las mediciones llamado  $T_{\text{alto}}$  y un valor mínimo de las mediciones llamado  $T_{\text{bajo}}$ . El valor t experimental se calculó de acuerdo con la expresión matemática ecuación N° 17.

Como resultado de la prueba t de student, no hubo rechazo de datos en las mediciones realizados. Adicional a esto, se empleó como segundo criterio para el rechazo de datos, la verificación con el %CV establecido internamente en el LEA,

siendo este del 10%. De acuerdo con este criterio, no se vio la necesidad de rechazar datos de las mediciones realizadas.

**3.2.4.1 Intervalo de validación para As** En relación a los resultados obtenidos en las curvas de calibración de las mediciones en desarrollo, para la validación de esta técnica, el rango de aplicabilidad del método fue de 2 a 20 µg As/L de acuerdo a lo reportado a las curvas de calibración.

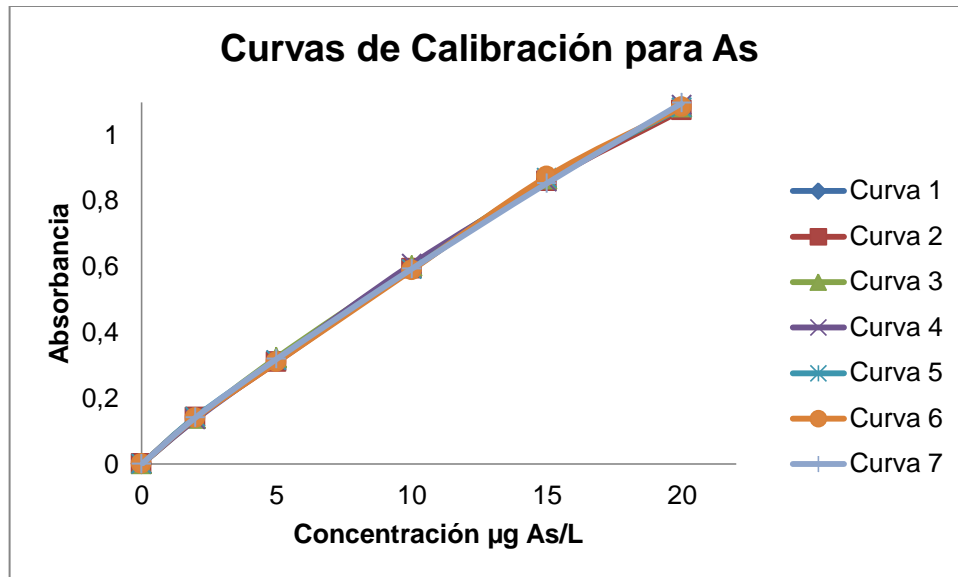
**3.2.4.2 Curva de calibración para As** De acuerdo a las indicaciones del método se requiere preparar y leer diariamente una curva de calibración; por lo cual durante este proceso se obtuvo un total de siete curvas y siete datos por estándar. A continuación se registran estos valores en la tabla N°. 42:

**Tabla 42. Datos curvas de calibración para la determinación de As**

Día	E 2 ppb	E 5 ppb	E 10 ppb	E 15 ppb	E 20 ppb	r	m	b
1	0,140	0,312	0,592	0,866	1,080	0,99716481	0,05278612	0,00
2	0,142	0,310	0,594	0,860	1,076	0,99724997	0,05244465	0,00
3	0,138	0,324	0,602	0,866	1,085	0,99676395	0,05276735	0,00
4	0,136	0,315	0,608	0,859	1,092	0,99721020	0,05322702	0,00
5	0,144	0,316	0,592	0,870	1,084	0,99734658	0,05279362	0,00
6	0,140	0,310	0,590	0,874	1,086	0,99707829	0,05328330	0,00
7	0,142	0,320	0,594	0,854	1,098	0,99893357	0,05305253	0,00

Con los resultados obtenidos de absorbancia se construyeron las curvas de calibración para la determinación de As cada día (figura N° 30).

**Figura 30: Curvas de Calibración Arsénico**



Para el caso de esta validación, se reportarán todos los resultados en µg As/L, pero por efecto del estándar con el cual se prepararon los estándares pertenecientes de la curva calibración, este es de 1000 mg As/L.

**3.2.4.3 Linealidad para As** De acuerdo a lo establecido por el SM para la aceptación de las curvas de calibración, estas cumplieron con el criterio de los coeficientes de correlación  $r > 0.995$ . Se confirmó este comportamiento en los resultados obtenidos para cada una de las curvas, anexo a esto como criterio de confirmación se realizó la prueba t de student a las curvas de calibración, y se corroboró la linealidad de estas para un 95% de confianza en siete datos seleccionados de los once iniciales, se concluye la existencia de correlación entre los valores de concentración y absorbancia de la curva, a su vez también se determinó que el CV% para las curvas en cada uno de los estándares preparados fue menor al 10% ajustándose a los lineamientos internos del LEA, reafirmando claramente la linealidad, tabla N° 43:

**Tabla 43. Controles Validación As**

Controles curvas de calibración As			
Estándar (ppb)	desviación	Promedio	coeficiente de variación
Bk	0,0000	0,0000	-
2	0,00269037	0,140	1,91777962
5	0,00525085	0,315	1,665426
10	0,00653197	0,596	1,09596857
15	0,0068903	0,864	0,79735622
20	0,00731274	1,086	0,67345338

**3.2.4.4 Sensibilidad del método para la determinación de As** Se tomó la pendiente promedio de las curvas de mínimos cuadrados como el parámetro para determinar la sensibilidad del método, dando como resultado 0,00029606 ABS/ $\mu$ g As/L y CV% 0,55958445% menor al 5%. Se representa esta sensibilidad como el cambio de la absorbancia debido al cambio de la concentración.

**3.2.4.5 Límite de detección (LDM) para As** Para el cálculo del límite de detección se tomó como criterio el comportamiento de los blanco a estos se les siguió la misma metodología que a los estándares y muestras, se buscó encontrar el analito en el blanco, pero como en cualquier otra situación, este proceso de comparación implica errores experimentales (en la medida del blanco y en la de la muestra analizada). Dando como resultado cero.

**3.2.4.6 Límite de cuantificación para As** El límite de cuantificación del método, se computó en el rango correspondiente al análisis de arsénico sin dilución de reactivos llamado (LDC). Estos valores se obtuvieron a partir del análisis estadístico de resultados adquiridos en la tabla N° 41 para el estándar de menor concentración de 2  $\mu$ g As/L (sin dilución), empleando la expresión matemática

deducida en la ecuación N° 13 un valor de t para n-1 grados de libertad y un nivel de confianza del 99% se obtuvo un resultado de:

$$\text{LDC} = 2 + (3,14 * 0,10) ; \text{LDC} = 2,32 \mu\text{g As/L}$$

**3.2.4.7 Precisión As** La precisión del método analítico se evaluó en términos de CV%, en relación a la ecuación 14, para cada una de las muestras ambientales y estándares preparados y analizados durante el periodo de la validación el cual fue de siete días para la validación. En la tabla N° 41 citan los resultados obtenidos para cada uno de los mencionados.

Como respuesta de las mediciones, se identifican que los valores de CV% para los estándares de 2 y 20 ppb, M, MAB y MAA, son menores al 5%. Lo anterior indica que para muestras ambientales tanto de adiciones altas, bajas y estándares preparados, el método analítico indica una alta precisión en las mediciones obtenidas. Los análisis de precisión para los estándares y muestras ambientales, son conformes a lo establecido por el sistema de calidad, donde se admite un CV% menor al 10%.

**3.2.4.8 Exactitud As** Los resultados de exactitud de los estándares preparados se muestran en la parte inferior de la tabla N° 41. La exactitud de los estándares evaluados, se estimó de acuerdo con lo señalado en la metodología y requerimientos planteados por el SM 3020 QUALITY ASSURANCE/QUALITY CONTROL, controles de calidad del método, observándose una alta exactitud en todo el rango de medida, con valores superiores al 85%.

**3.2.4.9 Recuperación del método para determinación de As** Para las muestras ambientales adicionadas, se calculó porcentaje de recuperación %R, de acuerdo a la expresión matemática, ecuación N°. 8. Para la MAA 89,84%, para la MAB fue del 99,16 %. Estos valores se aceptan, ya que para el laboratorio y según los

criterios dados por el SM 3020 QUALITY ASSURANCE/QUALITY CONTROL el %R debe oscilar entre el 70 y el 130%, característico para este metal.

**3.2.4.10 Cartas control determinación de As** Se construyeron las cartas de control con los datos obtenidos en la tabla N° 41, para el estándar de 20 ppb de As. Estas se visualizan en las figuras N° 31 y 32:

**Figura 31. Carta control E 20 ppb As**

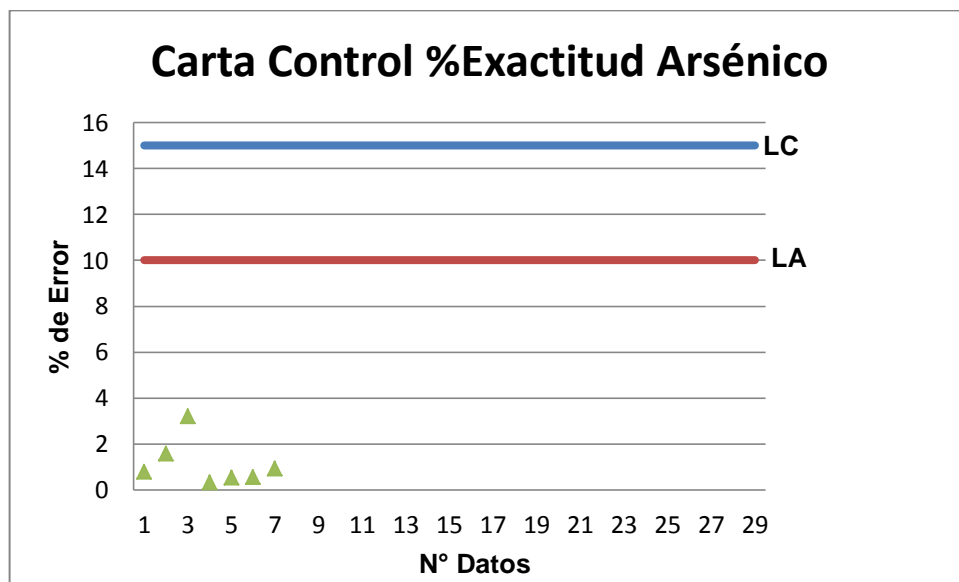
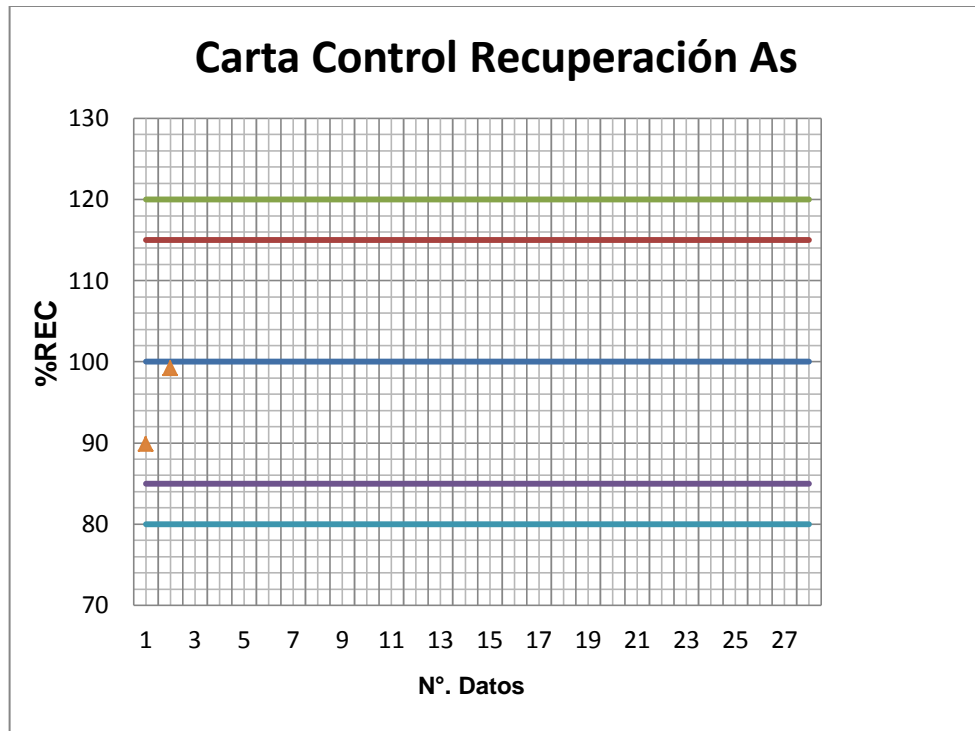


Figura 32. Carta Control Recuperación para As



Como se evidencia en las cartas control de exactitud y recuperación del método, no se presentan tendencias de alarma frente a los análisis realizados, este demuestra que la metodología no se encuentra a errores sistemáticos. En la carta control de exactitud para el estándar de 20 ppb As estos resultados están por debajo del límite de alarma del método, para la carta control de recuperación en las muestras baja y alta son resultados esperados, la MAB está un tanto más lejana del promedio a diferencia de la MAA está más cercana al promedio del ensayo esperado, es claro señalar el buen trabajo en el laboratorio.

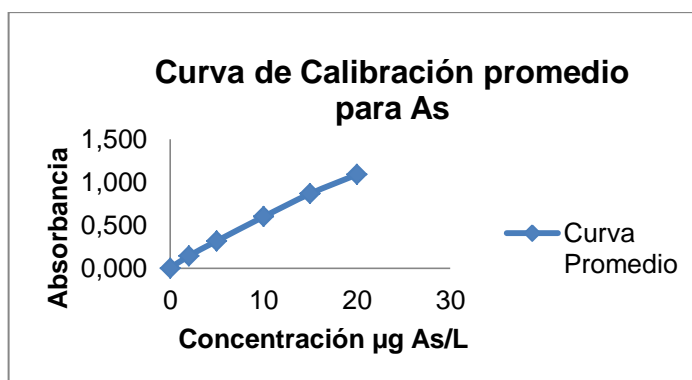
**3.2.4.11 Incertidumbre para As** A continuación, se detalla cada uno de los cálculos realizados, para estimar la incertidumbre para el método de determinación de arsénico (SM 3114B), de acuerdo con las fuentes de incertidumbres escogidas en la metodología.

### a. Incertidumbre Curva de Calibración para As

Esta incertidumbre es debida a cada uno de los estándares de preparación que constituyen la curva de calibración, se estimó el cálculo de la incertidumbre según lo planteado por la guía **Eurachem**. De esta forma se asumen implícitas o despreciables las incertidumbres, debidas a la preparación de los estándares, teniendo en cuenta solo la desviación de la señal del equipo.

De acuerdo con la curva de calibración analizada en el numeral 3.2.4.1, se obtuvo la curva de calibración promedio:

**Figura 33. Curva de Calibración promedio para Arsénico**



$m = 0,0529078$  y  $b = 0,0500732$ , donde  $m$  es la pendiente y  $b$  el intercepto con el origen. Con estos datos, se procedió a calcular la incertidumbre estándar debida a la curva de calibración, aplicando la siguiente ecuación:

$$u(Co) = \frac{S}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(Co - \bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad \text{Ec. 18}$$

Siendo:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (mC_o + b)]^2}{n-2}} \quad \text{Ec. 19}; \quad S_{xx} = \sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2 \quad \text{Ec. 20}$$

Dónde:

$u(C_o)$ : incertidumbre de la medida  $C_o$ , por la curva de calibración

$S$ : desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal

$A_j$ : las  $j$  lecturas observadas

$C_i$ : las  $i$  concentraciones usadas para la calibración

$p$ : número de veces que se elaboró la curva de calibración

$n$ : número de medidas para la calibración

$C_o$ : concentración en estudio

$\bar{C}$ : valor medio de las concentraciones utilizadas para la calibración

$S_{xx}$ : suma de los cuadrados de los residuales de las concentraciones

Con esta curva de calibración promedio y los datos de los días validados se consolida cada uno de estos datos en la siguiente tabla:

**Tabla 44 Datos de Absorbancia de los días de Validación para As**

DATOS EN ABSORBANCIA							
Concentración ppb	1	2	3	4	5	6	7
2	0,14	0,142	0,138	0,136	0,144	0,14	0,142
5	0,312	0,31	0,324	0,315	0,316	0,31	0,32
10	0,592	0,594	0,602	0,608	0,592	0,59	0,594
15	0,866	0,86	0,866	0,859	0,87	0,874	0,854
20	1,08	1,076	1,085	1,092	1,084	1,086	1,098

**Tabla 45: Diferencias al cuadrado de cada día con la concentración para As**

X	Diferencias al cuadrado						
2	0,00118527	0,00132698	0,00105156	0,00092585	0,00147669	0,00118527	0,00132698
5	0,00231067	0,00212239	0,00360833	0,00260808	0,00271122	0,00212239	0,00314378
10	0,00411379	0,00437434	0,00549656	0,00642223	0,00411379	0,00386123	0,00437434
15	0,00550686	0,00465236	0,00550686	0,00451694	0,00611652	0,00675819	0,00386986
20	0,0005894	0,00041118	0,00085718	0,00131606	0,00079962	0,00091673	0,0017874
Día	1	2	3	4	5	6	7

**Tabla 46. Sumas de cuadrados para As**

<b>suma de cuadrados</b>	0,1034669	
<b>suma/n-2</b>	0,00313536	
<b>s</b>	<b>0,05599</b>	
2	8	
5	5	
10	0	
15	-5	
20	-10	
<b>sxx</b>	<b>214</b>	
<b>m-B1</b>	0,0528	
<b>b-B0</b>	0	
<b>n</b>	35	
<b>p</b>	7	
<b>con. Media</b>	10	
<b>Co. De mayor desv</b>	20	
<b>uest.cc</b>	0,47189	MTRA
<b>Uest.rel.CC U4r</b>	<b>0,06193</b>	

Con una incertidumbre estándar relativa de **0,006193**.

**b. Incertidumbre de la digestión para As**

Se determinó la incertidumbre aportada por la adición de los ácidos participes en la digestión, hasta completar un volumen final de estándares y muestras de 25 mL, tomando en cuenta tolerancia del material volumétrico y distribución, se consignó esta información en la siguiente tabla:

**Tabla 47: Digestión de estándares y muestras por MULTIWAVE para As**  
Parámetros para la digestión:

VOL MEDIDO (mL)	TOLERANCIA	TIPO	DISTRIBUCIÓN
2,5	0,01	B	RECTANGULAR
20	0,03	B	RECTANGULAR
2	0,006	B	RECTANGULAR
1	0,01	B	RECTANGULAR

**Resultados para la digestión:**

VOL MEDIDO (mL)	u ESTANDAR	u RELATIVA	u COMBINADA	u COMBINADA TOTAL
2,5	0,005773503	0,002309401	0,002466441	0,011933845
20	0,017320508	0,000866025		
2	0,003464102	0,001732051	0,011676187	
1	0,005773503	0,011547005		

### c. Incertidumbre de la repetibilidad para As

Se estimó en esta parte por medio del cálculo de la desviación estándar relativa, debida a la repetibilidad de la muestra de arsénico, se consigna esta información en la siguiente tabla:

**Tabla 48. Cálculo de incertidumbre para la repetibilidad de la muestra de As**

REPETIBILIDAD MTRA						
CODIGO MTRA	X	DESVIACIÓN	TIPO	DISTRIBUCIÓN	u ESTANDAR	u ESTANDAR RELATIVA
MTRA As	7,62	0,210	A	NORMAL	0,2100	0,02756

Finalmente la incertidumbre aportada por la repetibilidad con incertidumbre estándar relativa es **0,02756**.

### d. Incertidumbre combinada del método para As

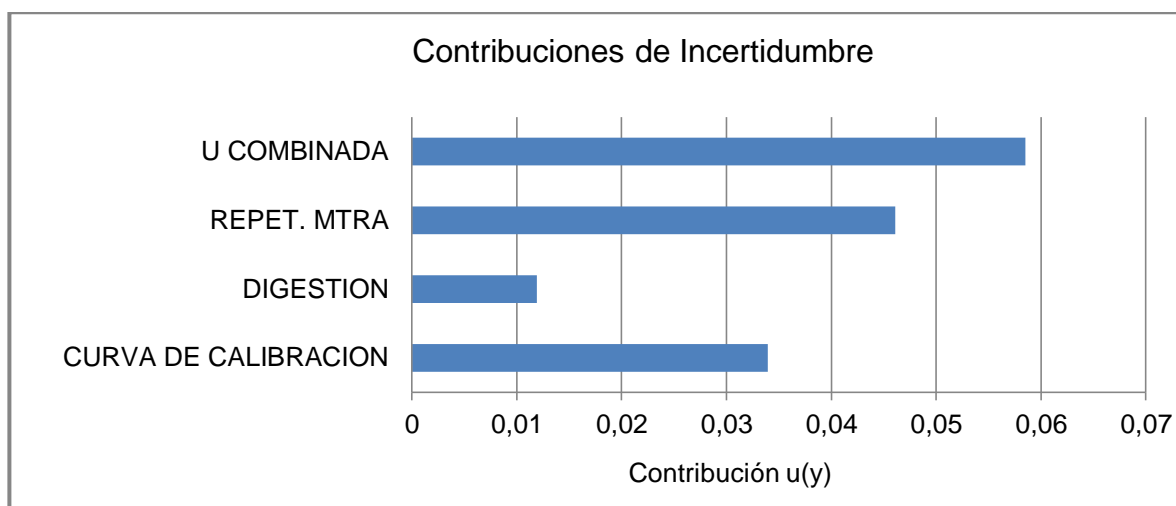
Finalmente se estimó el cálculo de la incertidumbre combinada para el método de arsénico, teniendo en cuenta las consideraciones del método y muestras, consignadas en la siguiente tabla:

**Tabla 49. Contribuciones de las fuentes de Incertidumbres para la determinación de As**

FUENTE	u COMBINAD A	U COMBINAD A TOTAL	U EXPANDID A	EXPRESIÓN DE INCERTIDUMBRE
CURVA DE CALIBRACIÓ N	0,06192834 1	0,06882614 1	0,13765228 2	<b>VALOR OBTENIDO +/- (VALOR OBTENIDO*Uexpandid a)</b>
DIGESTIÓN	0,011934			
REPET. MTRA	0,02755905 5			
<b>U COMBINADA</b>	0,06882614 1			

Posterior a esto, se requiere un análisis donde se permita visualizar estas contribuciones en la figura N° 34:

**Figura 34. Contribuciones de Incertidumbre para la determinación de As**



Como se observa en la figura 34 la mayor contribución a la incertidumbre de la medida de arsénico, es debida a la repetibilidad de la muestra y a la curva de calibración.

Incertidumbre expandida del método, se obtuvo multiplicando la incertidumbre combinada del método por un factor  $K=2$ , obteniéndose una incertidumbre expandida del método para arsénico de **0,137652282**, aceptándose para las condiciones de calidad del LEA.

**Expresión del resultado final:**  $X \pm U \mu\text{g As/L}$

#### 4. CONCLUSIONES

- La validación de los métodos de análisis de absorción atómica por llama y generación de hidruros, permitió evaluar y cuantificar experimentalmente las diferentes figuras de mérito, tales como: límite de detección, linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad e incertidumbre, además de las cartas control para la revisión de la calidad de los resultados, estas permiten demostrar que las metodologías aplicadas pueden ser usadas por el LEA.
- Las metodologías validadas presentan porcentajes de coeficiente de variación apropiados logrando clasificar a las técnicas como precisas para fines previstos.
- Los límites de cuantificación de los métodos evaluados, se consideran aceptables, teniendo en cuenta los límites mínimos de contaminación permitidos por la legislación.
- La evaluación de la linealidad en los métodos fotométricos, demostró correlación entra la señal dada por equipo y las concentraciones de las muestras, permitiendo estar dentro del intervalo de trabajo establecido de concentración.
- La precisión de los métodos, primada como CV%, fueron inferiores al 10%, cumpliendo con el límite establecido y con la política de calidad del LEA, para la aprobación de la validación de métodos.
- La exactitud de los métodos se estimó en porcentaje de exactitud para estándares, y para muestras adicionadas en términos de porcentaje de

recuperación. En el caso de los estándares, se lograron %exactitud cercanos al 100%. En las muestras adicionadas se alcanzaron %recuperación entre el 80-120% para cobre, hierro y arsénico, caso diferente ocurrió para mercurio debido a la complejidad de este metal su %recuperación mostró un mayor alcance entre 70-130%. Estos valores cumplen con los criterios de exactitud definidos para la implementación de métodos analíticos en el laboratorio.

- Se estimó la incertidumbre de las dos técnicas analíticas validadas en esta investigación suministrando un grado de confianza en las mediciones realizadas.
- La incertidumbre de los métodos, muestra que la mayor fuente de incertidumbre es la asociada a la repetibilidad y reproducibilidad. En el caso de los métodos analíticos, la curva de calibración también influye considerablemente en la estimación de la incertidumbre.
- Al calcular los resultados de incertidumbre, se observó que los valores obtenidos están dentro lo establecido por el LEA, siendo este atributo esencial y decisivo para la aceptación de los métodos.
- De acuerdo con los resultados obtenidos en la validación de los métodos, se puede concluir que los métodos de determinación para Cu 3111B, Fe 3111B, Hg 3112B y As 3114B regidos estrictamente por el SM, estos pueden ser aplicados por el Laboratorio de Estudios Ambientales de la Universidad Pontificia Bolivariana seccional Bucaramanga para la prestación de servicios.
- La implementación de los métodos 3111B para Cu y Fe cumplieron con los requerimientos pertinentes y se logró la acreditación de estos dos metales frente un organismo nacional IDEAM.

- Se elaboró la documentación adecuada en el LEA donde se evidencia procedimiento y validación de las técnicas.

## 5. RECOMENDACIONES

Durante todo procedimiento es importante tener en cuenta:

- Seguir trabajando con MCR de alta calidad, ácidos ultrapuros evitando la contaminación de los estándares y muestras.
- Seguir controlando adecuadamente la energía de cada una de las lámparas de Cu, Fe, As y Hg.
- Aumentar el volumen de adición (spike) a los blanco de Hg y As para el calcular el límite de detección de cada uno de estos métodos.

Próximamente se mostrarán las validaciones de Hg y As, buscado así la ampliación de más variables analíticas en el LEA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Protocolo Estandarización de métodos analíticos. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. IDEAM. Noviembre de 1999.
2. GUEVARA, ARDILA: Luis Enrique. VALIDACIÓN INTERNA DE LAS METODOLOGIAS PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL Y DISUELTO EN AGUAS Y MERCURIO TOTAL EN SUELOS, POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERACIÓN DE HIDRUROS. Universidad Industrial de Santander. Proyecto de grado para obtener el título de Magister en Química Ambiental. Bucaramanga, 2013.
3. DUGARTE R. LUIS A. Determinación de Talio mediante la generación de Hidruros por Espectroscopia de Absorción Atómica. 2007. Trabajo especial de Grado optar por el título de Licenciado. Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Laboratorio de Espectroscopía Molecular.
4. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Requisitos Generales Para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración. Geneva: ISO, 2005, 29 p. (NTC/ISO/IEC 17025:2005).
5. LONDOÑO POSSO, DIANA MARÍA. Validación de métodos para la determinación en aguas superficiales de metales alcalinos (sodio y potasio) por absorción atómica a la llama y alcalinotérreos (calcio y magnesio) por volumetría con EDTA. Consultada 16 de Enero de 2016.
6. CENTRO DE INFORMACIÓN Y COMUNICACIÓN AMBIENTAL DE NORTE AMÉRICA. CICEANA, A.C. Disponible en:

[http://www.ciceana.org.mx/recursos/Contaminacion\\_del\\_agua.pdf](http://www.ciceana.org.mx/recursos/Contaminacion_del_agua.pdf).

Consultada el 16 de Enero de 2016.

7. CONTAMINACIÓN DEL AGUA. Disponible en: <http://gua30.wordpress.com/2007/11/20/441/>. Consultada el 16 de Enero de 2016.
8. Guía Eurachem Relacionados, T. (2005). Métodos y Temas Relacionados. (A laboratory guide for the validation of methods and related topics.
9. Maroto, A. Estrategias para el cálculo de la incertidumbre. 2001. España, Universitat Rovira i Virgili Tarragona.
10. BEDOYA, Paula Andrea y SANCHEZ, María Victoria. Documentación del sistema de calidad para el laboratorio de análisis de alimentos de la universidad tecnológica de Pereira (según ntc-iso-iec 17025). 2004. 44p.
11. CAMACHO, Andrés Mauricio, Aplicación de una metodología para estandarizar y validar los ensayos de As, Cr, Hg y Na por espectrometría de Absorción atómica en el laboratorio de química ambiental. UTP. 2008. 130p.
12. Eisler, R. Cap. 3. Copper en Handbook of chemical risk assessment. Health hazards to humans, plants and animals. Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, 2000.
13. VEGA, Ángela; VÉLEZ, Paulina. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE COBRE Y ZINC POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA EN AGUA CRUDA Y TRATADA PARA EL LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUAS Y ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA. Proyecto de Trabajo de Grado para optar (Tecnólogo Químico). Corporación autónoma regional de Risaralda

- Carder. Universidad tecnológica de Pereira. Facultad de tecnologías. Escuela de tecnología química.2011.
14. MORENO C, GARCIA M. (2008). Nuevas alternativas para la simplificación y mejora de la metodología de análisis de metales pesados en muestras ambientales:<http://minerva.uca.es/publicaciones/asp/docs/tesis/JJPintoGanforna.pdf>.
15. ARDILA QUINTERO, JORGE ARMANDO. Validación interna de los métodos analíticos para la cuantificación de hierro total, hierro no hemo e implementación del método para la determinación de hierro hemo en alimentos. Bucaramanga, 2009. Trabajo de Grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Laboratorio Químico de Consultas Industriales. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
16. WATER TREATMENT SOLUTIONS. Disponible en: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/fe.htm#ixzz3VLEo4DfA>. Consultada el 16 de Diciembre de 2015.
17. WATER TREATMENT SOLUTIONS. Disponible en: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/fe.htm#ixzz3zL46IkAZ>. Consultada el 10 de Enero de 2016.
18. Chapple, G., The determination of arsenic, selenium and mercury levels in U.S. EPA quality control samples using the GBC HG3000 continuous-flow hydride generator, GBC AA Applications, N° 17, 1990, Australia.
19. DOADRIO VILLAREJO, A.L. Ecoltoxicología y Acción Toxicológica del Mercurio. Anal. Real Academia Nacional de Farmacia. Vol. 70, 2004. p. 933-959.

20. WATER TREATMENT SOLUTIONS. Disponible en:  
<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/hg.htm#ixzz3RLrAVViM>.  
Consultada el 16 de Diciembre de 2015.
21. [http://www.state.nj.us/health/eoh/hhazweb/mercury\\_sp.pdf](http://www.state.nj.us/health/eoh/hhazweb/mercury_sp.pdf) consultada el 12 de Enero de 2016.
22. Kumaresan, M., Riyazuddin, P.: Overview of speciation chemistry of arsenic, *Current Sci.* 80 (2001), págs. 837-846.
23. RODRIGUEZ DELGADO, SERGIO AGUSTÍN. 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).. Bucaramanga, 2013. Trabajo de Grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Laboratorio Químico de Consultas Industriales. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
24. WATER TREATMENT SOLUTIONS. Disponible en:  
<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/as.htm#ixzz3zKzf2tow>.  
Consultada 7 de Diciembre de 2015.
25. Shuman, K.; Elsenhans, B. The impact of food contaminants on the bioavailability of trace metals. *Trace Elem. Med. Bio.* 2002, 16, 139-144.
26. Sebahat, T.; Polat.; A.; Murat. Interaction between anemia and blood levels of iron, zinc, copper, cadmium and lead in foods. *J. Agric. food chem.* 2008, 56 (23), 11262-11269.
27. Green Facts, Hechos sobre la salud y el medio ambiente [en línea]. Consultada el 18 de enero de 2016.

<http://www.greenfacts.org/es/mercurio/mercurio-1.htm#2>.

28. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters. review Kerstin Leopold, Michael Foulkes, Paul Worsfold. University of Plymouth, Plymouth PL4 8AA, United Kingdom.
29. Smedley, P., Kinniburgh, D.: A review of the source, behavior and distribution of arsenic In Natural waters. Appl. Geochem. 17 (2002), págs. 517-568.
30. TORTAJADA, L. Soluciones Quimiométricas para Optimizar el Análisis de Parámetros Químicos en Aguas. Valencia. 2002, Tesis Doctoral Europea (Química). Universidad de Valencia. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Analítica.
31. SKOOG, Douglas A, et al Química Analítica. 7 ed. México: Mc GRAW-HILL 2007. P. 147-148.
32. BEATY, Richard D y KERBER, Jack D. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. 2 ed. Estados Unidos: THE PERKIN-ELMER CORPORATION 1993. p. 4-3—4-5.
33. Howard A.G.: (Boro)Hydride Techniques in Trace element Speciation. J. Anal. At. Spectrom 12 (1997), págs. 267-272.
34. Gong H., Lu X., Ma M., Watt C., Le X.C.: Arsenic speciation analysis. Talanta 58 (2002), págs. 77-96.
35. Nielsen S., Hansen E.H.: Determination of As(III) and As(V) by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry via on-line reduction of As(V) by KI. Analytica Chimica Acta 343 (1997), págs. 5-17.

36. Akter K.F., Chen Z., Smith L., Davey D., Naidu R.: Speciation of arsenic in ground water samples: A comparative study of CE-UV, HG-AAS and LC-ICP-MS. *Talanta* 68 (2005), págs. 406-415.
37. INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES, IDEAM. Determinación de antimonio (total y biodisponible), arsénico y selenio en aguas y sedimentos por espectrofotometría atómica generador de hidruros espectrofotometría atómica horno de grafito y emisión por plasma. Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial – república de Colombia subdirección de estudios ambientales - grupo de acreditación. Versión 1. 31/01/2009.
38. MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL, MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Resolución 2115. Características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano, 22 de Junio de 2007.
39. INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES, IDEAM. Determinación de Metales Pseudototales (Antimonio, Arsénico y Selenio) en Suelos y Bioabonos y Metales Totales (Antimonio, Arsénico y Selenio) en forrajes, por Espectrofotometría Atómica – Generación de Hidruros, Espectrofotometría Atómica – Horno de Grafito y Emisión por Plasma. Versión 01, 2008.
40. International Laboratory Accreditation Cooperation (I.L.A.C.). *Razones por las cuales debería emplearse un laboratorio acreditado?*. Australia. Website: [www.ilac.org](http://www.ilac.org) Copyright ILAC 2010.

41. Aguilera I., Rodríguez S., Pérez R., Buzón J., Camacho M., Validación de la Determinación de la DQO en la Unidad Analítica del CEBI. Revista Cubana de Química. Vol. XV, Nº 2, 2003.
42. CENAM. "Método analíticos adecuados a su propósito: Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados." Segunda edición, PUBLICACIÓN TÉCNICA CNM-MRD-PT-030, México, 2005.
43. SKOOG, Douglas, et al. Principios de Análisis Instrumental. Ed 5. España: Mc Graw-Hill. 2001.
44. Perruchet C., Priel M., "Estimación de la incertidumbre. Medidas y Ensayos". España: AENOR ediciones. 2001.
45. EUROCHEM/CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Chemistry. 3ed. S.L.R. ELLISON (LGC, UK) 2001.

## BIBLIOGRAFÍA

AGUILERA I., RODRÍGUEZ S., PÉREZ R., BUZÓN J., CAMACHO M., Validación de la Determinación de la DQO en la Unidad Analítica del CEBI. Revista Cubana de Química. Vol. XV, Nº 2, 2003.

AKTER K.F., CHEN Z., SMITH L., DAVEY D., NAIDU R.: Speciation of arsenic in ground water samples: A comparative study of CE-UV, HG-AAS and LC-ICP-MS. Talanta 68 (2005), págs. 406-415.

ARDILA QUINTERO, JORGE ARMANDO. Validación interna de los métodos analíticos para la cuantificación de hierro total, hierro no hemo e implementación del método para la determinación de hierro hemo en alimentos. Bucaramanga, 2009. Trabajo de Grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Laboratorio Químico de Consultas Industriales. Facultad de ciencias. Escuela de Química.

BEATY, Richard D y KERBER, Jack D. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. 2 ed. Estados Unidos: THE PERKIN-ELMER CORPORATION 1993. p. 4-3—4-5.

BEDOYA, Paula Andrea y SANCHEZ, María Victoria. Documentación del sistema de calidad para el laboratorio de análisis de alimentos de la universidad tecnológica de Pereira (según ntc-iso-iec 17025). 2004. 44p.

CAMACHO, Andrés Mauricio, Aplicación de una metodología para estandarizar y validar los ensayos de As, Cr, Hg y Na por espectrometría de Absorción atómica en el laboratorio de química ambiental. UTP. 2008. 130p.

CENAM. "Método analíticos adecuados a su propósito: Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados." Segunda edición, PUBLICACIÓN TÉCNICA CNM-MRD-PT-030, México, 2005.

CHAPPLE, G., The determination of arsenic, selenium and mercury levels in U.S. EPA quality control samples using the GBC HG3000 continuous-flow hydride generator, GBC AA Applications, N° 17, 1990, Australia.

DIRECCIÓN WEB: CENTRO DE INFORMACIÓN Y COMUNICACIÓN AMBIENTAL DE NORTE AMÉRICA. CICEANA, A.C. Disponible en:

Dirección web: CONTAMINACIÓN DEL AGUA. Disponible en: <http://gua30.wordpress.com/2007/11/20/441/>. Consultada el 16 de Enero de 2016.

DIRECCIÓN WEB: GREEN FACTS, Hechos sobre la salud y el medio ambiente [en línea]. Consultada el 18 de enero de 2016. <http://www.greenfacts.org/es/mercurio/mercurio-1.htm#2>.

DIRECCIÓN WEB: [http://www.ciceana.org.mx/recursos/Contaminacion\\_del\\_agua.pdf](http://www.ciceana.org.mx/recursos/Contaminacion_del_agua.pdf). Consultada el 16 de Enero de 2016.

DIRECCIÓN WEB: WATER TREATMENT SOLUTIONS <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/as.htm#ixzz3zKzf2tow>. Consultada 7 de Diciembre de 2015.

DIRECCIÓN WEB: WATER TREATMENT SOLUTIONS. Disponible en: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/fe.htm#ixzz3zL46IkAZ>. Consultada el 10 de Enero de 2016.

DIRECCIÓN WEB: WATER TREATMENT SOLUTIONS. Disponible en: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/fe.htm#ixzz3VLEo4DfA>. Consultada el 16 de Diciembre de 2015.

DIRECCIÓN WEB: WATER TREATMENT SOLUTIONS. Disponible en: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/hg.htm#ixzz3RLrAVViM>. Consultada el 16 de Diciembre de 2015.

DOADRIO VILLAREJO, A.L. Ecoltoxicología y Acción Toxicológica del Mercurio. Anal. Real Academia Nacional de Farmacia. Vol. 70, 2004. p. 933-959.

DUGARTE R. LUIS A. Determinación de Talio mediante la generación de Hidruros por Espectroscopia de Absorción Atómica. 2007. Trabajo especial de Grado optar por el título de Licenciado. Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Laboratorio de Espectroscopia Molecular.

Eisler, R. Cap. 3. Copper en Handbook of chemical risk assessment. Health hazards to humans, plants and animals. Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, 2000.

EUROCHEM/CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Chemistry. 3ed. S.L.R. ELLISON (LGC, UK) 2001.

Gong H., Lu X., Ma M., Watt C., Le X.C.: Arsenic speciation analysis. Talanta 58 (2002), págs. 77-96.

GUEVARA, ARDILA: Luis Enrique. VALIDACIÓN INTERNA DE LAS METODOLOGIAS PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL Y DISUELTO EN AGUAS Y MERCURIO TOTAL EN SUELOS, POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERACIÓN DE HIDRUROS. Universidad Industrial de Santander. Proyecto de grado para obtener el título de Magister en Química Ambiental. Bucaramanga, 2013.

Guía Eurachem Relacionados, T. (2005). Métodos y Temas Relacionados. (A laboratory guide for the validation of methods and related topics.

Howard A.G.: (Boro)Hydride Techniques in Trace element Speciation. J. Anal. At. Spectrom 12 (1997), págs. 267-272.

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES, IDEAM. Determinación de antimonio (total y biodisponible), arsénico y selenio en aguas y sedimentos por espectrofotometría atómica generador de hidruros espectrofotometría atómica horno de grafito y emisión por plasma. Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial – república de Colombia subdirección de estudios ambientales - grupo de acreditación. Versión 1. 31/01/2009.

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES, IDEAM. Determinación de Metales Pseudototales (Antimonio, Arsénico y Selenio) en Suelos y Bioabonos y Metales Totales (Antimonio, Arsénico y Selenio) en forrajes, por Espectrofotometría Atómica – Generación de Hidruros, Espectrofotometría Atómica – Horno de Grafito y Emisión por Plasma. Versión 01, 2008.

International Laboratory Accreditation Cooperation (I.L.A.C.). *Razones por las cuales debería emplearse un laboratorio acreditado?*. Australia. Website: [www.ilac.org](http://www.ilac.org) Copyright ILAC 2010.

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

Kumaresan, M., Riyazuddin, P.: Overview of speciation chemistry of arsenic, *Current Sci.* 80 (2001), págs. 837-846.

MAROTO, A. Estrategias para el cálculo de la incertidumbre. 2001. España, Universitat Rovira i Virgili Tarragona.

Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters. review Kerstin Leopold, Michael Foulkes, Paul Worsfold. University of Plymouth, Plymouth PL4 8AA, United Kingdom.

MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL, MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Resolución 2115. Características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano, 22 de Junio de 2007.

MORENO C, GARCIA M. (2008). Nuevas alternativas para la simplificación y mejora de la metodología de análisis de metales pesados en muestras ambientales:<http://minerva.uca.es/publicaciones/asp/docs/tesis/JJPintoGanforina.pdf>.

Perruchet C., Priel M., “Estimación de la incertidumbre. Medidas y Ensayos”. España: AENOR ediciones. 2001.

Protocolo Estandarización de métodos analíticos. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. IDEAM. Noviembre de 1999.

SEBAHAT, T.; POLAT.; A.; Murat. Interaction between anemia and blood levels of iron, zinc, copper, cadmium and lead in foods. J. Agric. food chem. 2008, 56 (23), 11262-11269.

SKOOG, Douglas, et al. Principios de Análisis Instrumental. Ed 5. España: Mc Graw-Hill. 2001.

Smedley, P., Kinniburgh, D.: A review of the source, behavior and distribution of arsenic In Natural waters. Appl. Geochem. 17 (2002), págs. 517-568.

TORTAJADA, L. Soluciones Quimiométricas para Optimizar el Análisis de Parámetros Químicos en Aguas. Valencia. 2002, Tesis Doctoral Europea (Química). Universidad de Valencia. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Analítica.

VEGA, Angela; VÉLEZ, Paulina. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE COBRE Y ZINC POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA EN AGUA CRUDA Y TRATADA PARA EL LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUAS Y ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA. Proyecto de Trabajo de Grado para optar (Tecnólogo Químico). Corporación autónoma regional de Risaralda Carder. Universidad tecnológica de Pereira. Facultad de tecnologías. Escuela de tecnología química.2011.