

INTRODUCCIÓN

En el transcurso de los últimos años ha ido progresando la tecnología, la industria, la agricultura; exigiéndose a si mismos un cambio, debido a la manera incontrolable en los entes de certificación, viendo la necesidad de adquirir e implementar manuales y métodos analíticos para su posible desarrollo en el campo laboral a nivel nacional e internacional.

Para alcanzar resultados correctos se aplica un método detallado, que describe todos los pasos desde el muestreo hasta el resultado. Si cierto método puede producir resultados correctos o no, implica que tiene que ser validado. La validación de un método incluye ensayos para la exactitud, la precisión, la linealidad, los errores sistemáticos, aleatorios, los límites de detección y límite de cuantificación. Así, la validación de un método demuestra si el instrumento utilizado para este procedimiento satisface o no los requisitos específicos.

La validación vendrá determinada por las posibilidades técnicas al alcance del laboratorio, como disponibilidad de patrones de referencia y así se puede presentar la alternativa de que el laboratorio participe en comparaciones con otros laboratorios. El **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** participa en el programa PICCAP como requisito para el proceso de certificación **ISO 17025**.

Para cumplir con los requisitos establecidos por el **IDEAM** (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales) se realizaron unas técnicas de validación tales como: Conductividad, Dureza Cálcica, Dureza Total, Nitritos, Nitratos, Nitrógeno Total, Turbiedad, Aluminio, Cadmio, Cobre, Cromo Hexavalente, Manganeseo, Níquel, Plomo y Cinc realizados en la matriz agua del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** en la Ciudad de Bogotá, como meta propuesta para su acceso a la acreditación bajo la norma **ISO 17025. REQUISITOS GENERALES DE COMPETENCIA DE LABORATORIOS DE ENSAYO Y CALIBRACIÓN**.

Con lo anterior se prestó especial atención a la verificación de cálculos y transferencia de datos, verificación del funcionamiento y mantenimiento de los equipos utilizados para el almacenamiento, transmisión y procesamiento de datos, establecimiento de procedimientos para garantizar la integridad y confidencialidad de los datos al ingreso, en la recolección, almacenamiento, transmisión y procesamiento de datos.

Cada una de las etapas son implementadas, además se tomaron las medidas adecuadas para asegurar la trazabilidad de todas las medidas que tengan influencia significativa en los resultados de los trabajos que se realicen, permitiendo así elaborar una serie de documentos fundamentales para el proceso de validación.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA tiene como necesidad avanzar en el proceso de validación de métodos para análisis de aguas, siendo de gran importancia el posible acceso de certificación por la norma ISO 17025 como lo ha estado haciendo; con el fin de seguir mejorando sus políticas de calidad, su prestación de servicios al sector empresarial, entre otros, hasta considerarse como uno de los mejores laboratorios preferidos por los clientes.

2. JUSTIFICACIÓN

La pasantía realizada en el **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** fue de gran experiencia y ayuda para el posible acceso a la acreditación bajo la norma **ISO 17025. REQUISITOS GENERALES DE COMPETENCIA DE LABORATORIOS DE ENSAYO Y CALIBRACIÓN**. Con la validación de los quince (15) métodos y demás métodos que ya se han validado cumpliendo con los requisitos establecidos por el IDEAM.

El obtener resultados confiables que se pueden aplicar a un método implica que este puede ser validado realizando una serie de tratamientos estadísticos a los ensayos satisfaciendo las necesidades del laboratorio frente a un ente de certificación, teniendo así alternativas de presentarse en comparación con otros laboratorios y dar credibilidad del trabajo realizado con los métodos validados para la certificación por la **ISO 17025**.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Validar los métodos analíticos propuestos para las determinaciones fisicoquímicas de aguas en el **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA.**

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Contribuir con el proceso de certificación bajo la Norma ISO 17025 (Requisitos Generales de Competencia de Laboratorios de Ensayo y Calibración) al Laboratorio Quimicontrol Ltda., y a los estudiantes de química de la Universidad del Quindío en su aprendizaje.
- Hallar los parámetros estadísticos de exactitud, precisión, linealidad, límite de detección y de cuantificación, sensibilidad, análisis de varianza (ANOVA) en los ensayos propuestos de la validación.
- Validar el proceso de concentración en metales determinando su límite de confianza al 95%.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 MISIÓN DEL LABORATORIO

Ofrecer a nuestros clientes asesoría y servicios de análisis con calidad, aportando al desarrollo industrial y al control de la contaminación ambiental del país, basados en nuestra experiencia y conocimientos en el campo de la química analítica.

4.2 VISIÓN DEL LABORATORIO

El Laboratorio Quimicontrol Ltda., será una organización certificada bajo normas internacionales para la prestación de sus servicios de asesoría, análisis e investigación, que cuente con un equipo de trabajo interdisciplinario y sistemas de análisis de última tecnología acordes con las necesidades ambientales, sociales y económicas del país.

4.3 CAMPO DE ACTIVIDAD DEL LABORATORIO

El Laboratorio Quimicontrol Ltda presta sus servicios de análisis químicos, muestreos, evaluación de vertimientos y asesoría en lo relacionado con la industria y calidad ambiental, reflejando competencia e idoneidad necesaria para llevar a cabo la determinación de los análisis y la generación de resultados confiables.

4.3.1 Recursos Humanos

El grupo de personas que conforman este laboratorio son:

- Gerente del laboratorio y Coordinador del Departamento Técnico: Químico, Especialista en Consultoría Ambiental. Especialista Higiene y Salud Ocupacional, **Constantino N. Zuloaga Moya.**
- Coordinadora del Departamento Administrativo, **Señora, Luz Gabriela Zapata Gómez.**
- Personal de análisis: Doctor en Ciencias Químicas, **Tomás Medina Mancilla,** Licenciada en Biología y Química, **Nilsa Dolly Lasso,** Químico **Constantino N. Zuloaga Moya.**
- Coordinadora del Departamento de Calidad: Tecnóloga en Saneamiento Ambiental, **Sonia Janneth Martínez Mora.**
- Asesoría externa: Ingeniera Agrónoma. Master en ingeniería ambiental. Asesora de la ISO, **Margarita Maria Lopera Mesa.**
- Pasante en Química de la Universidad del Quindío. **Luz Adriana Rios González.**

4.3.2 Recursos Técnicos

Algunos de los materiales y equipos que se emplearon en el proceso de validación

- Destilador de agua, marca SCHOTT.

- Espectrofotómetro Spectronic 20D, modelo 333175, marca Milton Roy. Con certificado de calibración.
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica con llama, modelo 2380, marca Perkin Elmer. Con certificado de calibración.
- Balanza Analítica, modelo BP211D, marca Sartorius, con cinco (5) cifras decimales. Con certificado de calibración.
- pHmetro, modelo 37, marca Orion.
- Turbidímetro digital, marca Orbeco Hellige.
- Conductímetro B-173, marca HORIBA.
- Micro-Kjeldahl
- Material de vidrio (pipetas, buretas, erlenmeyer, vasos de precipitado, balones aforados, entre otros). Marca Brand y Schott debidamente certificado.

4.4 ENFOQUE DE LA PASANTÍA

La pasantía realizada en el Laboratorio Quimicontrol Ltda fue llevada a cabo con el fin de validar una serie de métodos analíticos para el proceso de certificación bajo la norma **ISO 17025** y una manera de aprendizaje para conmigo misma y los estudiantes de química de la Universidad del Quindío.

4.5 ACTIVIDADES DESARROLLADAS EN LA PASANTÍA

Se tuvo una duración de ochocientas (800) horas para cumplir con el plan de actividades propuesto para la validación de los métodos analíticos de la siguiente manera:

Enero

- Recorrido e inducción por el Laboratorio

Febrero

- Documentación de los métodos y realización de diagramas de flujo.

Marzo

- Iniciación de la validación de los métodos.

Abril

- Determinación y cálculos de los ensayos.

Mayo

- Acopio de toda la información empleada siguiendo el Sistema de Calidad del Laboratorio.

Junio

- Recopilación, redacción, realización y análisis de la información obtenida.

5. PROCESO REALIZADO EN LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN EL LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA.

La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso que dependiendo de la técnica analítica a la que pertenezca el método, la matriz, el analito, la cantidad de parámetros de estandarización, y de logística empleada para su desarrollo, puede requerir de un tiempo más o menos considerable (en algunos casos puede superar los seis meses).

La validación es un proceso que se circunscribe en el contexto de la calidad analítica y tiene dos objetivos fundamentales: A) Definir y asegurar la calidad (y su constancia) de la información analítica generada (resultados, informes), lo que implica la denominada **validación intrínseca**, que se define como la caracterización del proceso de métodos químicos a través de las propiedades del mismo: exactitud (trazabilidad), precisión (incertidumbre), selectividad, intervalo de determinación, rapidez, costo, etc.; B) Garantizar la coherencia entre la información analítica generada y las necesidades informativas planteadas por la sociedad, industria, comercio, ciencia y tecnología en un proceso denominado **validación extrínseca** en el ámbito del problema analítico. Además, permite: 1) Tipificar (caracterizar) a los procesos de métodos químicos y a las herramientas analíticas; 2) Facilitar las auditorías de calidad; 3) Fundamentar la transferibilidad de procesos de métodos químicos y herramientas entre laboratorios; y 4) Apoyar la armonización de laboratorios y el reconocimiento mutuo de resultados entre los mismos.

La validación de herramientas es muy variada. Se emplean, en general, materiales de referencia (certificados o no). Es interesante resaltar que, en el caso de instrumentos, la validación de los mismos prácticamente coincide con la calibración, tanto instrumental (métodos primarios) como metodológica o analítica (métodos relativos).

El control de calidad tiene connotaciones fundamentalmente cuantitativas. En general, se basa en la comparación de datos (a ser posible acompañado de sus incertidumbres) bajo el paraguas de la Estadística (Quimiometría). Así pues, son necesarias referencias numéricas para el control de calidad; éstas son proporcionadas por los datos de los materiales de referencia certificados (MRC), resultados de diversas metodologías aplicados a la misma muestra, etc.

5.1. ETAPA PRELIMINAR A LA ESTANDARIZACIÓN

La etapa preliminar es parte integrante y prerrequisito de la estandarización; consiste en una serie de pasos que permiten obtener información relevante y orientar el proceso de la estandarización propiamente dicha.

El laboratorio decide que parámetros de rendimiento del método debe caracterizar, teniendo en cuenta las limitaciones de tiempo y costos; además de los requerimientos del cliente, la experiencia con el método y si el método será de aplicación rutinaria o no. Es por esto que el **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** se estableció unas metas de calidad como parte del proceso de certificación **ISO 17025. REQUISITOS GENERALES PARA LA COMPETENCIA DE LABORATORIOS DE ENSAYO Y CALIBRACIÓN**, soportado en manual de calidad, en la misma norma ISO 17025 en especial el numeral 5 que es el requisito para la acreditación de Laboratorios Ambientales, Standard Methods 19th Edition, programas de fisicoquímica ambiental. Estandarización de métodos analíticos suministrado por el IDEAM, asesor externo y coordinador tanto del departamento técnico como de calidad. Esto con el fin de implementar y corroborar los resultados obtenidos para el proceso de validación, haciendo un estudio más a fondo acerca de los protocolos, condiciones de trabajo, manejo de equipos y demás formatos que se trazaron como objetivo propuesto en el proceso realizado en la validación de técnicas analíticas.

5.1.1. DOCUMENTACIÓN Y MONTAJE DE LA METODOLOGÍA

- Selección del método para cada analito y por cada matriz. Debe contener los criterios de selección correspondientes.
- Creación de un archivo físico (carpeta) para toda la documentación generada en el proceso. La carpeta debe radicarse en el archivo técnico y estar disponible para su consulta permanente. Se crearon dos (2) carpetas una con código de calidad **TR-VAME** y la otra **TR-STVA**. En la carpeta **TR-VAME** encontramos lo que son los protocolos del método (puntos de control, materiales y equipos, procedimiento, condiciones a las que se lleva el método y demás), validación proceso de concentración, validación del método (actividades realizadas durante el proceso y la validación en sí de los quince (15) métodos con sus respectivas gráficas, análisis de resultados...) e informe de validación (un pequeño resumen de la validación). La carpeta **TR-STVA** cuenta con las condiciones de trabajo, diagramas de flujo y formatos de captura de datos.
- Tener y conocer el protocolo del método, disponiendo de una copia de trabajo (debe incluir bibliografía).

- Conocimiento del fundamento físico y químico del método y de la técnica a la cual pertenece éste. Se hizo un reconocimiento del método y de los equipos que implican en el proceso estudiando el manual así como los libros que serán de guía fundamental.
- Conocimiento exacto del funcionamiento del equipo de medición. En lo posible se debe tener el 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 del reactivo puro y en solución).
- Inventario de vidriería y otros materiales necesarios, señalando las cantidades necesarias para cada día y requerimientos para su limpieza. Además se realizó un reporte con el material de vidrio calibrado para realizar la validación (balones aforados y pipetas graduadas).
- Establecer los procedimientos para la descontaminación y limpieza del material y para la disposición de los desechos.
- Diseño de un formato para la captura de los datos, solo si los formatos existentes no se adaptan a los requerimientos específicos de la metodología.
- Verificación y optimización de las condiciones y de los parámetros instrumentales, incluyendo curva de calibración.
- Definición del intervalo de aplicación del método, teniendo como criterios:
 - La información de la literatura (protocolo).
 - El interés específico (ambiental).
 - Los ensayos preliminares en el Laboratorio.

5.2 PARTE EXPERIMENTAL O DE MEDICIONES (Prevalidación)

Antes de iniciar el proceso de estandarización se debe establecer por mediciones programadas los parámetros que se van a determinar y a realizar:

- Precisión
- Exactitud
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Sensibilidad
- Linealidad

- ANOVA (solo en el caso de los metales que se leyeron por absorción atómica con llama).
- Variables instrumentales o metodológicas particulares del laboratorio que puede afectar el proceso de medición en aquellos aspectos en que no se pueda seguir estrictamente el protocolo.

5.3 PROCEDIMIENTO DE ESTANDARIZACIÓN (VALIDACIÓN)

5.3.1 Parte experimental o de mediciones

Antes de iniciar las mediciones, el analista debe garantizar que el método está montado y que el equipo funciona en condiciones óptimas para la lectura de muestras. La parte experimental consiste en la corrida de las “muestras” y el registro de los resultados para cada grupo diario de ENSAYOS (Ensayo No 1, Ensayo No 2,Ensayo No 5). En total se debe correr un mínimo de siete (7) ensayos, pero para estas validaciones se corrieron cinco (5) ensayos, esto con el fin de dar cumplimiento al cronograma de actividades llevado a cabo en el proceso de validación. Estos ensayos se realizan en días diferentes que pueden ser continuos o alternos, con una diferencia máxima de tres (3) días entre un ensayo y otro (viernes- lunes).

El grupo básico de “muestras” a correr en cada ensayo es:

- **Bk** (Blanco de reactivos y procedimiento)
- **Eb** (Estándar de concentración baja, que nos permite calcular el LDM)
- **Emb** (Estándar de concentración media baja; aproximadamente el 50% del rango)
- **Ema** (Estándar de concentración media alta)
- **Ea** (Estándar de concentración alta; aproximadamente el 90% del rango)

En el caso de las muestras provenientes del PICCAP en cada ensayo se determina así:

- **PM1** (Patrón para dureza cálcica, dureza total y conductividad (Minerales 1-1.1)).
- **PM2** (Patrón para dureza cálcica, dureza total y conductividad (Minerales 2-2.2))
- **PT1** (Patrón para turbiedad (T-1))
- **PT2** (Patrón para turbiedad (T-2))

Este grupo básico de “muestras” se debe correr mínimo por duplicado para un total de 12 datos diarios incluyendo el blanco. En esta etapa o de corrida de los ensayos es donde

se obtienen todos los datos primarios y requiere que en su ejecución se cumplan ciertas condiciones mínimas:

- Cada grupo de muestras se analiza el mismo día.
- Es recomendable que el proceso se inicie siempre a la misma hora o lo suficientemente temprano para que se pueda cumplir con el análisis de todas las muestras, teniendo en cuenta que pueden ocurrir imprevistos.
- Todo el material de vidrio deberá ser lavado previamente de acuerdo con el procedimiento establecido en el Laboratorio para cada uso y deberá ser sometido a la revisión o control de calidad correspondiente.
- Es recomendable que el procedimiento sea efectuado por un profesional Químico o con la supervisión del mismo.
- El formato de captura de datos se deberá diligenciar en el mismo momento en que se obtienen los datos (no transcribir, copiar, etc.). Las cifras erradas se deben corregir inmediatamente dejando constancia por parte del analista en forma clara en que consistió el error.

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Utilizando los diferentes parámetros estadísticos dados en la validación se tiene en cuenta lo siguiente:

Rechazo de datos. Calcular el estadístico T para los valores extremos de cada grupo (máximo y mínimo), de la siguiente manera:

- Ordenar los datos de menor a mayor: $[X_{\text{bajo}}, X_2, X_3, \dots, X_{\text{alto}}]$
- Calcular X_{PROM} y s
- Calcular T como: $T = (X_{\text{ALTO}} - X_{\text{PROM}})/s$ para un valor alto; $T = (X_{\text{PROM}} - X_{\text{BALO}})/s$ para un valor bajo.
- Si el T calculado es mayor que el T de tablas (para un nivel de confianza del 95% y n mediciones, Anexo, Tabla1), el dato se rechaza. De acuerdo con el tamaño pequeño de las poblaciones que se van a manejar, se pueden rechazar como máximo dos datos; si la aplicación del criterio de rechazo da positiva para más de dos datos, el ensayo debería repetirse.

Precisión. Calcular la desviación estándar (s), el coeficiente de variación (CV) y el límite de confianza del 95% (LC_{95}) para cada "muestra" tomando los datos de los cinco (5) ensayos (10 datos).

Exactitud. Calcular para cada estándar y para el patrón certificado el porcentaje de error relativo en cada determinación. Determinar para cada tipo de “muestra” el valor promedio de error relativo.

Límite de detección. Calcular la mínima cantidad que el equipo puede leer a las condiciones del estándar elegido.

Límite de cuantificación. Calcular la menor cantidad que el equipo puede cuantificar a condiciones establecidas para el estándar.

Sensibilidad. Calcular la sensibilidad como el promedio de la pendiente de la curva de calibración en las diferentes concentraciones estándar.

ANOVA. Calcular el análisis de varianza como variación entre y dentro de muestras para la validación únicamente de metales.

Las unidades en que se expresan los resultados de los métodos analíticos validados según el Sistema Internacional de Unidades se describen de la siguiente forma:

- Conductividad: $\mu\text{mho/cm}$
- Dureza cálcica : mgCaCO_3/L
- Dureza total: mgCaCO_3/L
- Nitritos: mgNO_2^-/L
- Nitratos: mgNO_3^-/L
- Nitrógeno total: mgN/L
- Turbiedad: NTU
- Aluminio: mgAl/L
- Cadmio: mgCd/L
- Cobre: mgCu/L
- Cromo hexavalente: $\text{mgCr}^{+6}/\text{L}$
- Manganeso: mgMn/L
- Níquel: mgNi/L
- Plomo: mgPb/L
- Cinc: mgZn/L

5.5 ELABORACIÓN Y PRESENTACIÓN DE DOCUMENTOS

Como resultado de la estandarización se deben presentar tres documentos:

- **Protocolo de validación:** El presente documento se toma como referencia para la estandarización de los diferentes métodos haciendo los ajustes correspondientes para las características particulares de cada analito y de la técnica utilizada.

- **Carpeta de soporte técnico:** Contiene todos los documentos originales producidos durante el proceso de estandarización, las notas y observaciones del analista, hojas de captura de datos, cálculos y demás información que permita la revisión del proceso y/o su replicación por otro analista o por otro laboratorio.

- **Parámetros de estandarización:** Son los resultados finales del proceso, expresados en forma clara y de acuerdo con las convenciones que se utilicen por la literatura especializada en el tema.

5.6 APROBACIÓN DE LOS MÉTODOS VALIDADOS

Los métodos nombrados anteriormente fueron revisados y aprobados por el comité tanto del departamento técnico como de calidad del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, dando como cumplido los objetivos trazados para la certificación del proceso de validación bajo la norma **ISO 17025. REQUISITOS GENERALES DE COMPETENCIA DE LABORATORIOS DE ENSAYO Y CALIBRACIÓN.**

6. RESULTADOS EXPERIMENTALES

6.1 VALIDACIÓN DE CONDUCTIVIDAD MÉTODO ELECTROMÉTRICO

6.1.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación; que servirán como criterios de confianza para la determinación de conductividad por el método electrométrico.

6.1.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

La conductividad es una medida de la propiedad que poseen las soluciones acuosas para conducir la corriente eléctrica. Esta propiedad depende de la presencia de iones, su concentración, movilidad, valencia y de la temperatura de la medición. Las soluciones de la mayor parte de los compuestos inorgánicos son buenas conductoras. Las moléculas orgánicas al no disociarse en el agua, conducen la corriente en muy baja escala. El Decreto 475 de 1998 del Ministerio de Salud "NORMAS TÉCNICAS DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE" da un valor admisible de 50-1000 $\mu\text{mho/cm}$ en agua potable y de $\leq 1500 \mu\text{S/cm}$ para agua segura.

6.1.3 REACTIVOS

- Agua desionizada, para conductividad
- Solución estándar de cloruro de potasio, KCl 0,0100 M.

6.1.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- **Conductímetro:** usar un instrumento cuya medida de conductividad en términos de error no exceda el 1% o 1 $\mu\text{mho/cm}$, dependiendo del que sea más grande.
- **Termómetro:** debe cubrir el intervalo de 23 a 27°C, con una aproximación de 0,1°C. Es conveniente un termómetro con un pequeño termistor como elemento sensible debido a su rápida respuesta; algunos conductímetros están equipados con un sensor automático de temperatura.
- **Celda de conductividad.**

- **Con electrodos de platino:** su selección depende del intervalo de resistencia y conductividad del instrumento, el cual se comprueba por comparación de los resultados experimentales con la conductividad verdadera de soluciones estándar de cloruro de potasio. Las celdas nuevas se lavan con mezcla sulfocrómica y los electrodos se platinizan antes de su uso; posteriormente se deben lavar y replatinizar cuando las lecturas sean erráticas, cuando no se obtenga un punto final nítido, o cuando se formen depósitos negros de platino en escamas. Para el platinizado de los electrodos, seguir las indicaciones del fabricante o consultar Standard Methods, pág. 2-45.
- **Con electrodos no platinizados:** contruidos de metales comunes (entre otros, acero inoxidable), se emplean para monitoreos continuos o mediciones en campo; se calibra por comparación de las lecturas contra un instrumento de laboratorio. Se debe emplear una celda y un instrumento diseñados correctamente para minimizar errores en la constante de la celda.

6.1.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de aguas, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th Edition de 1995".

Agua desionizada, para conductividad: existen varios métodos para preparar agua grado reactivo, el más común de los cuales consiste en pasar agua destilada a través de un desionizador de lecho mixto y descartar el primer filtrado. La conductividad debe ser pequeña comparada con el valor a ser medido, generalmente menor de 1 $\mu\text{mho/cm}$.

El agua destilada (hervida y fría) destinada a la preparación de soluciones, producida por el **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA.**, tiene una conductividad menor de 2,0 $\mu\text{S/cm}$.

Solución estándar de cloruro de potasio, KCl 0,0100 M: disolver 745,6 mg de KCl anhidro en agua desionizada y diluir a 1000 mL en un balón volumétrico, a 25°C. Guardar en un frasco de vidrio borosilicatado con tapón de vidrio. Esta solución tiene una conductividad de 1412 $\mu\text{mho/cm}$ a 25°C y es satisfactoria para la mayoría de muestras cuando la celda tiene una constante entre 1 y 2; para otras constantes de celda, usar soluciones de KCl más fuertes o débiles, de acuerdo con la **TABLA 1**.

Conductividad equivalente, Λ , y conductividad, k ,
de soluciones de cloruro de potasio a 25,0°C*

KCl Concentración M ó equiv./L	Conductividad equivalente, Λ , mho.cm ² /equiv.	Conductividad k_s , $\mu\text{mho/cm}^{**}$
0	149,9	
0,0001	148,9	14,9
0,0005	147,7	73,9
0,001	146,9	146,9
0,005	143,6	717,5
0,01	141,2	1412
0,02	138,2	2765
0,05	133,3	6667
0,1	128,9	12890
0,2	124,0	24800
0,5	117,3	58670
1	111,9	111900

* Basados en el ohm absoluto, la temperatura estándar 1968, y el volumen estándar dm³.

**Los valores son exactos a $\pm 0,1\%$ o 0,1 $\mu\text{mho/cm}$, según el que sea más grande.

6.1.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de conductividad por el método electrométrico se siguió el procedimiento 2510 (A-B) descrito en el protocolo para análisis de aguas Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 19. El siguiente fue el grupo básico de muestras que se leyó durante 5 ensayos con su respectiva replica de los que consta el proceso de validación:

PM1: Patrón para conductividad (Minerales 1-1.1), proveniente del **PICCAP** (Programa Interlaboratorios de Control de Calidad para Aguas Potables).

PM2: Patrón para conductividad (Minerales 2-2.2), proveniente del **PICCAP** (Programa Interlaboratorios de Control de Calidad para Aguas Potables).

Además de una solución patrón de 0,100 M de Cloruro de Potasio (KCl), de la cual se prepararon los demás estándares de 0,01 y 0,001M.

Las muestras se identificaron de la siguiente forma:

Eb: Estándar de conductividad de concentración baja = 147 $\mu\text{mhos/cm}$ (0,001M)

Ea: Estándar de dureza cálcica de concentración alta = 1412 $\mu\text{mhos/cm}$ (0,01M)

El proceso de validación se inició el día diez (10) de mayo a las 15 h: 10min, obteniendo los resultados que se reportan más adelante.

6.1.7 RESULTADOS

La conductividad es expresado en términos de ($\mu\text{mho/cm}$), tomando como base la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), el conductímetro nos da el resultado.

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos para muestras patrón provenientes del PICCAP.

	No. Ensayo	$\mu\text{mho/cm}$	
		PM1	PM2
	1	400	320
		420	320
	2	420	300
		410	270
	3	400	290
		400	310
	4	360	310
		390	310
	5	450	370
		450	320
Promedio		410	312
Desviación estándar		27,080	25,734
Número de datos		10	10
Mínimo		360	270
Máximo		450	370
Intervalo		90	100
Tbajo		1,846	1,632
Talto		1,477	2,254
T teórico		2,180	2,180

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: Estos datos fueron sometidos bajo el criterio de rechazo de datos, dando como resultado todos los datos aceptados.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para $n=10$, donde n es el número de muestras. El valor reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos para muestras patrón provenientes del PICCAP.

	No. Ensayo	µmho/cm			
		PM1		PM2	
	1	400		320	
		420		320	
	2	420		300	
		410		270	
	3	400		290	
		400		310	
	4	360		310	
		390		310	
	5	450		370	
		450		320	
Promedio		410		312	
Desviación estándar		27,080		25,734	
%CV		6,605		8,248	
%Error		0,910		0,220	

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	µmho/cm			
		147 (0,001M)		1412 (0,01 M)	
	1	179		1210	
		152		1220	
	2	176		1170	
		173		1190	
	3	176		1200	
		174		1280	
	4	154		1170	
		166		1230	
	5	197		1430	
		185		1440	
Promedio		173,200		1254	
Desviación estándar		13,440		100,576	
Número de datos		10		10	
Mínimo		152		1170	
Máximo		197		1440	
Intervalo		45		270	
Tbajo		1,577		0,835	
Talto		1,771		1,849	
T teórico		2,180		2,180	

Tabla 3. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	µmho/cm	
		147 (0,001M)	1412 (0,01 M)
	1	179	1210
		152	1220
	2	176	1170
		173	1190
	3	176	1200
		174	1280
	4	154	1170
		166	1230
	5	197	1430
		185	1440
Promedio		173,2	1254
Desviación estándar		*	*
%CV		*	*
%Error		*	*

Tabla 4. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

➤ Límite de detección y cuantificación

En la siguiente tabla se muestran los valores de la respuesta del conductímetro para la determinación de la conductividad en función del límite de detección y de cuantificación:

CONCENTRACIONES ESTÁNDAR	UNIDADES µmho/cm	T(°C)
0,00001	2,0	23
	2,0	23
	2,0	23
	2,0	23
	2,0	23
	2,0	23
	2,0	23
	2,0	23
	2,0	23
	2,0	23
PROMEDIO	2,0	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,60	
LÍMITE DE DETECCIÓN	1,81	
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	6,03	

Tabla 5. Respuesta conductímetro en función del límite de detección y de cuantificación.

Para hallar el dato de $2,0 \mu\text{mho/cm}$ se tomo directamente la lectura que registra el conductímetro, determinando de esta manera también su temperatura sumergiendo el termómetro dentro de la solución de KCl a una concentración estándar de $0,00001 \mu\text{mho/cm}$ y de esta manera se calculó su límite de detección y de cuantificación.

6.1.8 ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Al observar los datos experimentales de conductividad por el método electrométrico se puede decir que:

➤ Precisión

El parámetro estadístico “precisión”, se define como el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a una alícuota de una muestra homogénea.

La precisión de conductividad por el método electrométrico se va a expresar en términos de desviación estándar y de coeficiente de variación de las muestras.

Para que el ensayo fuese más representativo se tomaron dos muestras patrón; las cuales fueron suministradas por el **PICCAP** (Programa de Interlaboratorios de Control de Calidad de Aguas Potables), así como fue necesario preparar una solución patrón de $0,1 \text{ M}$ de Cloruro de Potasio (KCl) como punto de referencia para preparar una solución de $0,001$ y otra de $0,01 \text{ M}$ que fueron luego expresadas en $\mu\text{mho/cm}$. Esto se hizo con el fin de seguir el proceso de validación de las diferentes metódicas llevadas a cabo en el laboratorio.

Las muestras patrón provenientes del PICCAP analizadas durante el proceso de validación dieron valores de $27,080$ para el parámetro de la desviación estándar y de $6,605$ para el coeficiente de variación en PM1: Patrón para conductividad (Minerales 1-1.1), **lo que indica un alto grado de variación en los resultados obtenidos, esto se debe a factores que alteran de una manera u otra el análisis en especial la temperatura** y para PM2: Patrón para conductividad (Minerales 2-2.2), se obtuvo $25,734$ para desviación estándar y $8,248$ para coeficiente de variación, **implicándose de una manera u otra la temperatura.**

Para la solución patrón de $0,001 \text{ M}$ de cloruro de potasio (KCl) los datos obtenidos fueron: para la desviación estándar $13,440$ y de $7,760$ para el coeficiente de variación; para la solución, patrón de $0,01 \text{ M}$ de Cloruro de potasio la desviación estándar fue de $100,576$ y el coeficiente de variación de $8,020$, **esto significa que también se vio influenciada la temperatura a condiciones del ambiente en el cual se debe tener en cuenta a la hora de reportar los resultados en el proceso de validación.**

➤ Exactitud

El parámetro estadístico “exactitud” está definido como la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos al valor verdadero. A diferencia de la precisión que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él.

Estos porcentajes de error muestra que el determinar un porcentaje de error es bastante difícil, pues las unidades en que se expresa la conductividad es $\mu\text{mho/cm}$ y la tendencia de este hace que se produzca un error sistemático, siendo este un factor que influye altamente en los resultados, dando pie para seguir en el proceso de validación para la determinación de conductividad por el método electrométrico del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** en la matriz agua.

➤ **Límite de detección**

El límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que se puede leer de acuerdo a las concentraciones estándar que se escogieron para la validación, se tomo la menor y se leyó. Se determino de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de conductividad por el método electrométrico, se estableció el límite de detección en $1,81 \mu\text{mho/cm}$, para una concentración de $0,00001 \mu\text{mho/cm}$, dando la mínima lectura que puede reportar el instrumento.

➤ **Límite de cuantificación**

El “límite de cuantificación” (o límite de determinación”), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleo para el límite de detección, solo que esta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

El límite de cuantificación se determinó para la validación de conductividad método electrométrico en 6,03, que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas. Lo que indica que el valor de 6,03 es lo que se puede cuantificar el método.

6.1.9 CONCLUSIONES

- El proceso de validación para la determinación de la conductividad por el método electrométrico presentó una serie de inconvenientes que fue el punto clave para la determinación de los parámetros precisión y exactitud siguiendo la continuidad de este método en el **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** para la matriz agua.
- El límite de detección para la determinación de conductividad por el método electrométrico es 1,81 $\mu\text{mho/cm}$. Este límite es la concentración mínima que pudo ser medida con una exactitud aceptable, para una concentración estándar de 0,00001 $\mu\text{mho/cm}$.
- El límite de cuantificación que se determinó para conductividad fue de 6,03 $\mu\text{mho/cm}$ siendo esta la menor cantidad de analito que pudo determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, para una concentración estándar de 0,00001 $\mu\text{mho/cm}$.
- De acuerdo a cada temperatura varía la conductividad en la solución de KCl, es decir son directamente proporcionales.

6.1.10 RECOMENDACIONES

- Las muestras a tratar en la determinación de conductividad por el método electrométrico, deben estar a una temperatura ambiente, la recomendada es 25 °C pues este factor influye altamente en los resultados analíticos.
- Sumergir el termómetro dentro de las soluciones para registrar la temperatura a la que se encuentra en ese instante con su respectiva conductividad.
- El tiempo de estabilización para hacer la lectura se determina de acuerdo con el aparato para medir la conductividad quien registra una carita feliz que indica el resultado en $\mu\text{mho/cm}$.
- Para la determinación de conductividad se debe tener en cuenta la temperatura, su concentración ya que son factores importantes que se encuentran presentes en estas soluciones que conducen la corriente eléctrica, como lo es el Cloruro de Potasio (KCl).

6.2 VALIDACIÓN DE DUREZA CÁLCICA MÉTODO COMPLEXOMÉTRICO

6.2.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación que servirán como criterios de confianza para la determinación de dureza cálcica por el método complexométrico.

6.2.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

El principio es idéntico al del método complexométrico descrito para la dureza total. No obstante, como la determinación se hace a pH elevado, el magnesio precipita en forma de hidróxido y no interviene. Además, el indicador elegido no se combina más que con el calcio. Varios indicadores dan un cambio de color cuando todo el calcio ha sido complejado por el EDTA a un pH entre 12 y 13, preferiblemente llevar la muestra a un pH=14 para obtener un cambio de color en el punto final.

6.2.3 REACTIVOS

- Solución de Hidróxido de sodio, NaOH 1N
- Indicador murexida (purpurado de amonio)
- Solución estándar de EDTA 0,01 M
- Solución estándar de Calcio

6.2.4 MATERIALES Y EQUIPOS

Aparatos de soporte

- Agitador magnético
- Buretas de vidrio Boro silicato de 50 y 25 mL
- Balanza analítica, sensibilidad 0,01 mg
- Magnetos con su atrapa magneto
- Peras de caucho

- Pinzas.
- Pipetas volumétricas de 1 y aforadas de 2; 5; 10 y 25 mL
- Soporte universal
- Vasos de precipitados de 100 y/o 200 mL

6.2.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de aguas, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th Edition de 1995".

- **Solución de Hidróxido de sodio, NaOH 1N:** pesar 40 g y disolverlos en un litro de agua desmineralizada. Realizar posteriormente el título con una solución de ácido clorhídrico 1N.
- Determinación del título de una solución de NaOH 1N:
- **Indicadores:** muchos indicadores son apropiados para la determinación de calcio por titulación. El murexida fue el primer indicador utilizado para detectar el punto final del calcio y es presentado en este procedimiento. Para las personas que se les dificulta detectar el punto final con este indicador se aconseja usar el negro eriocromo T el cual cambia de rosado a violeta.
- **Indicador murexida (purpurado de amonio):** Este indicador cambia de rosado a púrpura en el punto final. Preparación: disolver 150 mg en 100 mL de etilenglicol absoluto. Soluciones acuosas de la tinta no son estables por más de un día. Para dar una buena estabilidad mezclar 200 mg de murexida con 100 g de NaCl pulverizando muy bien la sal. Pasar por malla 50. Usar 0,2 g de la mezcla para la titulación. Nota: titular inmediatamente después de la adición del indicador porque es inestable bajo condiciones alcalinas. Para facilitar el reconocimiento del punto final, titular siempre frente a un testigo o blanco.
- **Solución estándar de EDTA 0,01 M:** pesar 3,732 g de reactivo grado analítico etilendiaminotetraacético disódico dos aguas (EDTA), disolver en agua desionizada y diluir a 1000 mL. Estandarizar contra una solución estándar de calcio.
- **Solución estándar de Calcio:** pesar 1,000 g de CaCO₃ anhidro (reactivo primario) en un erlenmeyer de 500 mL. Adicionar lentamente HCl 1:1 hasta la completa disolución del CaCO₃. Añadir 200 mL de agua desionizada y hervir por unos pocos minutos para eliminar el CO₂. Enfriar y adicionar unas gotas de indicador de rojo

de metilo y ajustar al color naranja intermedio por adición de NH_4OH 3N o HCl 1:1 y diluir con agua a 1000 mL. 1 mL = 1,00 mg CaCO_3 .

6.2.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de dureza cálcica por el método complexométrico se siguió el procedimiento 2130 (A-B) descrito en el protocolo para análisis de aguas Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 19. El siguiente fue el grupo básico de muestras patrón que se leyeron durante 5 ensayos con su respectiva replica de los que consta el proceso de validación.

- **PM1:** Patrón para dureza cálcica (Minerales 1-1.1), proveniente del **PICCAP** (Programa Interlaboratorios de Control de Calidad para Aguas Potables).
- **PM2:** Patrón para dureza cálcica (Minerales 2-2.2), proveniente del **PICCAP** (Programa Interlaboratorios de Control de Calidad para Aguas Potables).

Además de preparar una solución patrón de 1000 ppm, de la cual se preparó una solución de 25 ppm, de ésta una de 12 ppm y una de 5 ppm que se identificaron así:

- **Eb:** Estándar de dureza cálcica de concentración baja = 5 mg CaCO_3/L
- **Ea:** Estándar de dureza cálcica de concentración alta = 12 mg CaCO_3/L

El proceso de validación se inició el día cinco (5) de mayo a las 10 h: 04min, obteniendo los resultados que se reportan más adelante.

6.2.7 RESULTADOS

El cálculo de la determinación de dureza cálcica es expresado en unidades de mg/L CaCO_3 , el resultado es calculado primero determinando los mg Ca/L y segundo los mg CaCO_3/L que pueda existir tanto en las muestras patrón provenientes del PICCAP como de la solución patrón de 1000 ppm con la que se preparó una de 25 ppm y de esta una de 5 ppm y una de 12 ppm de calcio.

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos para muestras patrón provenientes del PICCAP.

	No. Ensayo	mg/L CaCO ₃	
		PM1	PM2
	1	22,017	26,021
		22,418	24,819
	2	22,418	22,418
		22,418	20,416
	3	26,021	20,817
		26,022	20,817
	4	24,419	19,616
		24,019	19,616
	5	24,419	20,416
		24,419	20,416
Promedio		23,859	21,537
Desviación estándar		1,489	2,207
Número de datos		10	10
Mínimo		22,017	19,616
Máximo		26,022	26,021
Intervalo		4,005	6,405
Tbajo		1,237	0,871
Talto		1,453	2,031
T teórico		2,180	2,180

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: Estos datos fueron sometidos bajo el criterio de rechazo de datos, dando como resultado todos los datos aceptados.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para n = 10, donde n es el número de muestras. El valor reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos para muestras patrón provenientes del PICCAP.

	No. Ensayo	mg/L CaCO ₃	
		PM1	PM2
	1	22,017	26,021
		22,418	24,819
	2	22,418	22,418
		22,418	20,416
	3	26,021	20,817
		26,022	20,817
	4	24,419	19,616
		24,019	19,616
	5	24,419	20,416
		24,419	20,416
		24,419	20,416
Promedio		23,859	21,537
Desviación estándar		1,489	0,010
%CV		6,239	0,046
%Error		0,919	0,220

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos muestras patrón

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	mg/L CaCO ₃	
		Eb	Ea
	1	5,185	11,920
		5,185	11,920
	2	4,973	12,010
		4,973	12,010
	3	4,973	12,010
		4,973	12,010
	4	4,973	12,010
		4,973	12,010
	5	4,973	12,010
		4,973	12,010
Promedio		5,015	11,992
Desviación estándar		0,089	0,038
Número de datos		10	10
Mínimo		4,973	11,920
Máximo		5,185	12,010
Intervalo		0,212	0,090
Tbajo		0,474	1,897
Talto		1,897	0,474
T teórico		2,180	2,180

Tabla 3. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	mg/L CaCO ₃	
		5,0	12
	1	5,185	11,920
		5,185	11,920
	2	4,973	12,010
		4,973	12,010
	3	4,973	12,010
		4,973	12,010
	4	4,973	12,010
		4,973	12,010
	5	4,973	12,010
		4,973	12,010
Promedio		5,015	11,992
Desviación estándar		0,089	0,010
%CV		1,782	0,083
%Error		0,003	0,001

Tabla 4. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

➤ Límite de detección y cuantificación

En la siguiente tabla se muestran los valores de la respuesta de la titulación complexométrica para dureza cálcica en función del límite de detección y de cuantificación:

CONCENTRACIONES ESTÁNDAR	mg CaCO ₃ /L	VOLUMEN (mL) GASTADOS CON EDTA
1,5	3,203	0,08
	3,203	0,08
	3,203	0,08
	3,203	0,08
	3,203	0,08
	3,203	0,08
	3,203	0,08
	3,203	0,08
	3,203	0,08
	3,203	0,08
	3,203	0,08
	PROMEDIO	3,203
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,51	
LÍMITE DE DETECCIÓN	3,04	
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	6,63	

Tabla 5. Respuesta titulación complexométrica para dureza cálcica en función del límite de detección y de cuantificación.

Para hallar el dato de **3,203** mg CaCO₃/L se tomaron los mL de EDTA gastados durante la titulación complexométrica en una concentración estándar de 1,5 mg CaCO₃/L, calculando primero los mg Ca/L, después la dureza cálcica, y luego su límite de detección y límite de cuantificación.

6.2.8 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al observar los datos experimentales de dureza cálcica por el método complexométrico se puede decir que:

➤ **Precisión**

El parámetro estadístico “precisión”, se define como el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a una alícuota de una muestra homogénea.

La precisión de dureza cálcica por el método complexométrico se va a expresar en términos de desviación estándar y del coeficiente de variación de las muestras.

Para que el ensayo fuese más representativo se tomaron dos muestras patrón; las cuales fueron suministradas por el **PICCAP** (Programa de Interlaboratorios de Control de Calidad de Aguas Potables), así como fue necesario preparar una solución patrón de 1000 ppm de calcio como punto de referencia para preparar una solución de 25 ppm y de esta una de 5 y 12 ppm de calcio, que fueron luego expresadas en mg CaCO₃/L. Esto se hizo con el fin de seguir el proceso de validación de las diferentes metodicas llevadas a cabo en el laboratorio.

Las muestras patrón provenientes del PICCAP analizadas durante el proceso de validación dieron valores de 1,489 para el parámetro de desviación estándar y de 6,239 para el parámetro de coeficiente de variación en PM1: Patrón para dureza cálcica (Minerales 1-1.1), **lo que indica un alto grado de variación en los resultados obtenidos, esto se debe a factores que alteran de una manera u otra el análisis tales como: la temperatura y el pH** y para PM2: Patrón para dureza cálcica (Minerales 2-2.2), se obtuvo 0,010 para desviación estándar y 0,046 para coeficiente de variación, **revelando así una buena precisión entre una réplica y otra.**

Para la solución patrón de 5 ppm de calcio los datos obtenidos fueron: desviación estándar 0,089 y 1,782 de coeficiente de variación; en la solución patrón de 12 ppm de calcio la desviación estándar fue 0,010 y el coeficiente de variación 0,083, esto significa que también se ve influenciada la temperatura y el pH en especial el pH **en el cuál se debe tener un control para evitar posibles interferencias químicas que alteren el proceso de validación.**

➤ **Exactitud**

El parámetro estadístico “exactitud” está definido como la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos al valor verdadero. A diferencia de la precisión que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él.

El porcentaje de error para ambos patrones de dureza cálcica por el método complexométrico fue bajo, dando como resultado valores de 0,910 y 0,220% respectivamente para las muestras provenientes del PICCAP y para la solución patrón de 5,0 y de 12 ppm tanto de calcio como de magnesio fue de 0,003 y de 0,001%.

Los resultados obtenidos expresados en porcentaje de error muestran la buena exactitud del método, minimizando de esta manera los errores sistemáticos que pueden haber.

➤ **Límite de detección**

El límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que se puede leer de acuerdo a las concentraciones estándar que se escogieron para la validación, se tomo la menor y se leyó. Se determino de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de dureza cálcica por el método complexométrico, se estableció el límite de detección en 3,04 mg CaCO_3/L , para una concentración de 1,5 mg CaCO_3/L , obteniéndose un volumen de 0,08 mL en la lectura de las respectivas muestras para esta concentración.

➤ **Límite de cuantificación**

El “límite de cuantificación” (o límite de determinación”), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleo para el límite de detección, solo que esta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración cuantificable del estándar

S_B : Desviación estándar

El límite de cuantificación se determinó para la validación de dureza cálcica método de complexometría en 6,63 mg CaCO_3/L , que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas. Lo que indica que el valor de 6,63 es lo que se puede cuantificar el método, ya que un dato por encima de este el volumen se hace mayor y muy por debajo se hace imposible de ver y de leer y lo que se buscaba era determinar la menor cantidad que la titulación complexométrica pudiera considerar inferior para una medida cuantitativa precisa.

6.2.9 CONCLUSIONES

- El proceso de validación para la determinación de dureza cálcica por el método complexométrico fue de fácil ejecución dando óptimos resultados en cuanto a los parámetros de exactitud y precisión, que confirma la aplicabilidad del método en el **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** para la matriz agua.
- En el momento de la titulación con EDTA se homogenizó muy bien el indicador con la solución que contiene carbonato de calcio (CaCO_3), pues es un punto clave para la correcta toma de volumen gastado, en especial la última gota que es decisiva para calcular los mg Ca/L y los mg CaCO_3/L que hay tanto para muestras provenientes del PICCAP como para concentraciones estándar de 5,0 y 12 ppm.
- Los límites de detección y de cuantificación se aplicó con el fin de determinar la mínima y la menor cantidad que el método puede leer y cuantificarse para tener una certeza de un valor permisible y confiable que se pueda reportar en la validación llevada a cabo en este proceso.
- La determinación de la dureza es una prueba analítica que proporciona una medida de la calidad del agua potable.

6.2.10 RECOMENDACIONES

- Las muestras a tratar en la determinación de dureza cálcica por el método complexométrico, deben estar a una temperatura ambiente lo recomendado es 25°C , pues este factor influye en los resultados analíticos, pues de acuerdo a la variación de la temperatura esta aumenta o disminuye según la velocidad en que se lleve a cabo la reacción.
- Hacer los ajustes pertinentes de pH con NaOH para que sea complejado el calcio con el EDTA llevándolo a un pH =14 y observar mejor el cambio de color.

- No adicionar más de 0,2 g del indicador para la titulación. Titular inmediatamente después de la adición del indicador porque es inestable bajo condiciones alcalinas. Para facilitar el reconocimiento del punto final, titular siempre frente a un testigo o blanco.
- Mantener el material limpio para eliminar posibles errores que intervengan en el análisis.

6.3 VALIDACIÓN DE DUREZA TOTAL MÉTODO COMPLEXOMÉTRICO

6.3.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación que servirán como criterios de confianza para la determinación de dureza total por el método complexométrico.

6.3.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

La dureza o grado hidrotimétrico de una agua corresponde a la suma de las concentraciones de cationes metálicos con la excepción de la de los metales alcalinos y del ion hidrogeno. En la mayoría de los casos la dureza se debe principalmente a los iones calcio y magnesio, a los que se añaden algunas veces los iones hierro, aluminio, manganeso y estroncio.

La dureza se llama todavía dureza cálcica y magnésica o consumo de jabón. Se expresa en miliequivalentes de concentración de CaCO_3 . También se da muy a menudo en grados franceses.

En el agua se determinan:

Dureza total: Es la suma de las durezas cálcica y magnésica.

Dureza cálcica: Corresponde al contenido global de sales de calcio.

Dureza magnésica: Corresponde al contenido global de sales magnesio

Dureza carbonatada o valor alcalimétrico completo: Es la suma de las alcalinidades carbonatada y bicarbonatada.

Dureza permanente o no carbonatada: Es la dureza que persiste después de la ebullición el agua y corresponde a los sulfatos de calcio y magnesio.

Dureza temporal: Es la diferencia de la dureza total y la permanente. Si la dureza total es igual o inferior a la carbonatada se debe completamente a los carbonatos y bicarbonatos; si es mas elevada entonces existe una dureza no carbonatada que de hecho, corresponde a la dureza permanente (sulfato de calcio y de magnesio y accesoriamente cloruros y nitratos).

El Decreto 475 de 1998 del Ministerio de Salud "NORMAS TÉCNICAS DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE" da un valor de 160 mg/L para dureza total en agua potable y de 180 mg/L para agua segura.

6.3.3 REACTIVOS

- Solución buffer

- Indicador Negro de Eriocromo T (Sal de sodio de 1-(1-hidroxi-2-naftilazo-5-nitro-2-naftol-4-acido sulfónico))
- Solución estándar de EDTA 0,01M
- Solución estándar de Calcio
- Solución estándar de Magnesio

6.3.4 MATERIALES Y EQUIPOS

Aparatos de soporte

- Agitador magnético.
- Buretas de vidrio Boro silicato de 50 y 25 mL
- Balanza analítica, sensibilidad 0,01 mg
- Magnetos con su atrapa magneto
- Peras de caucho
- Pinzas
- Pipetas volumétricas de 1 y aforadas de 2; 5; 10 y 25 mL
- Soporte universal
- Vasos de precipitados de 100 y/o 200 mL

6.3.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de aguas, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th Edition de 1995".

La preparación de los estándares y de reactivos se hizo de la siguiente manera:

➤ Solución buffer:

Disolver 16,9 g de cloruro de amonio (NH_4Cl) en 143 mL de hidróxido de amonio concentrado (NH_4OH). Añadir 1,25 g de sal de magnesio de EDTA y diluir a 250 mL con agua destilada. Almacenar esta solución en envase plástico o en vidrio de borosilicato. Tapar muy bien para evitar pérdidas de amoniaco (NH_3). El tiempo de almacenaje debe de ser no superior a un mes.

Si la sal de magnesio de EDTA no es posible tenerla, disolver 1,179 g de sal de sodio de etilendiamino tetraacético (EDTA) y 780 mg de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) o 644

mg de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Adicionar y mezclar con la solución que se mencionó antes y completar a 250 mL. Para obtener mayor exactitud, ajustar a equivalentes exactos con EDTA con pequeñas concentraciones de EDTA. Se agregó un gramo de EDTA.

Nota: experimentalmente luego de preparar esta solución se realizó la siguiente prueba:

Se adicionó un (1) mL del buffer anterior a 25 mL de una solución de 0,5 ppm de magnesio y 0,2g de indicador de Negro de Eriocromo T, gastándose 0,6 mL de titulante. Luego se hizo otra prueba; se adicionó 1 mL del buffer anterior a 25 mL de una solución de 0,5 ppm de calcio, y una cantidad mínima más o menos 0,2g de indicador de Negro de Eriocromo T; se tituló con el respectivo titulante de EDTA, gastándose 0,1 mL de titulante.

- **Indicador Negro de Eriocromo T (Sal de sodio de 1-(1-hidroxi-2-naftilazo-5-nitro-2-naftol-4-acido sulfónico):** disolver 0,5 g en 100g de 2, 2, 2-trietanolamina. Añadir dos gotas por cada 50 mL de muestra titulada.
- **Solución estándar de EDTA 0,01M:** pesar 3,732 g de reactivo grado analítico etilendiaminotetraacético disódico dos aguas (EDTA), disolver en agua desionizada y diluir a 1000 mL. Estandarizar contra una solución estándar de calcio.
- **Solución estándar de Calcio:** pesar 1,000 g de CaCO_3 anhidro (reactivo primario) en un erlenmeyer de 500 mL. Adicionar lentamente HCl 1:1 hasta la completa disolución del CaCO_3 . Añadir 200 mL de agua desionizada y hervir por unos pocos minutos para eliminar el CO_2 . Enfriar y adicionar unas gotas de indicador de rojo de metilo y ajustar al color naranja intermedio por adición de NH_4OH 3N o HCl 1:1 y diluir con agua a 1000 mL. 1 mL = 1,00 mg CaCO_3 .
- **Solución patrón de calcio y de magnesio:** tomar 20 mL de la solución patrón titrisol de 1000 ppm de calcio y 12,15 mL de magnesio y aforar a 500 mL con agua destilada y de ahí tomar las respectivas alícuotas de las diferentes concentraciones estándares que se van a leer y completar a 25 mL con agua destilada.

6.3.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de dureza total por el método complexométrico se siguió el procedimiento 2130 (A-B) descrito en el protocolo para análisis de aguas Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 19. El siguiente fue el grupo básico de muestras que se leyó durante 5 ensayos con su respectiva réplica de los que consta el proceso de validación.

- **PM1:** Patrón para dureza total (Minerales 1-1.1), proveniente del **PICCAP** (Programa Interlaboratorios de Control de Calidad para Aguas Potables).

- **PM2:** Patrón para dureza total (Minerales 2-2.2), proveniente del **PICCAP** (Programa Interlaboratorios de Control de Calidad para Aguas Potables).

Además de preparar una solución de 1000 ppm de calcio y una de 1000 ppm de magnesio siendo esta un titrisol con su respectivo certificado de calidad.

A partir de las soluciones de 1000 ppm de ambas se preparó una solución de 230 mg CaCO₃/L en donde hubiera 115 ppm de calcio y 115 de magnesio para una concentración correspondiente de 40 ppm de Calcio y 24,3 ppm de Magnesio a un volumen de 500 mL con el fin de proceder a la validación de esta metodología y preparar los respectivos estándares de 24; 58; 115 y 138 mg CaCO₃/L para la determinación de dureza total.

6.3.7 RESULTADOS

El cálculo de la determinación de dureza total es expresado en unidades de mg CaCO₃/L, el resultado es calculado directamente tanto para las muestras provenientes del PICCAP como de la solución patrón de 1000 ppm con la que se preparó la de 230 mg CaCO₃/L y de esta las demás concentraciones estándar de 24; 58; 115 y 138 ppm de calcio y de magnesio.

$$DT = 2,497(\text{ppm Ca}) + 4,118(\text{ppm Mg})$$

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos para muestras patrón provenientes del PICCAP

	No. Ensayo	mgCaCO ₃ /L	
		PM1	PM2
	1	86,069	63,251
		88,070	63,651
	2	80,064	60,849
		80,064	59,648
	3	80,064	58,847
		80,064	58,847
	4	80,064	59,648
		80,064	58,447
	5	80,064	56,445
		80,064	56,845
Promedio		81,465	59,648
Desviación estándar		2,991	2,387
Número de datos		10	10
Mínimo		80,064	56,445
Máximo		88,070	63,651
Intervalo		8,006	7,206
Tbajo		0,468	1,342
Talto		2,208	1,677
T teórico		2,180	2,180

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: Estos datos fueron sometidos bajo el criterio de rechazo de datos, dando como resultado todos los datos aceptados.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para n=10, donde n es el número de muestras. El valor reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos para muestras patrón provenientes del PICCAP.

	No. Ensayo	mg CaCO ₃ /L	
		PM1	PM2
	1	86,069	63,251
		88,070	63,651
	2	80,064	60,849
		80,064	59,648
	3	80,064	58,847
		80,064	58,847
	4	80,064	59,648
		80,064	58,447
	5	80,064	56,445
		80,064	56,845
Promedio		81,465	59,648
Desviación estándar		2,991	0,010
%CV		3,672	0,017
%Error		0,910	0,220

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	mg CaCO ₃ /L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	1	0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
		0,00	24,124	57,974	114,791	138,163
	2	0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
		0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
	3	0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
		0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
	4	0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
		0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
	5	0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
		0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
Promedio		-	24,114	57,857	114,859	138,158
Desviación estándar		-	0,003	0,041	0,024	0,002
Número de datos		10	10	10	10	10
Mínimo		-	24,113	57,844	114,791	138,157
Máximo		-	24,124	57,974	114,866	138,163
Intervalo		-	0,011	0,130	0,075	0,006
Tbajo		-	0,316	0,316	2,846	0,316
Talto		-	2,846	2,846	0,316	2,846
T teórico		2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

Tabla 3. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	mg CaCO ₃ /L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
mg CaCO ₃ /L teórico		0	24	58	115	138
	1	0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
		0,00	24,124	57,974	114,791	138,163
	2	0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
		0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
	3	0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
		0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
	4	0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
		0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
	5	0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
		0,00	24,113	57,844	114,866	138,157
Promedio		-	24,114	57,857	114,859	138,156
Desviación estándar		-	0,003	0,041	0,024	0,007
%CV		-	0,014	0,071	0,021	0,005
%Error		-	0,475	0,247	0,123	0,113

Tabla 4. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

Las muestras patrón provenientes del **PICCAP** analizadas durante el proceso de validación dan valores de 2,991 para el parámetro de la desviación estándar y de 3,672 para el parámetro de coeficiente de variación en PM1: Patrón para dureza cálcica (Minerales 1-1.1), **lo que indica un alto grado de variación en los resultados obtenidos, esto se debe a factores que alteran de una manera u otra el análisis tales como: la temperatura y el pH** y para PM2: Patrón para dureza cálcica (Minerales 2-2.2), se obtuvo 2,387 para desviación estándar y para coeficiente de variación 4,002, **revelando así una buena precisión entre una replica y otra.**

Para la solución patrón de 24 ppm de calcio y de magnesio los datos obtenidos fueron: para la desviación estándar 0,003 y de 0,014 para el coeficiente de variación; para la solución patrón de 58 ppm de calcio y de magnesio, la desviación estándar fue de 0,041 y el coeficiente de variación fue de 0,071, para la de 115 ppm de calcio y de magnesio, la desviación estándar fue de 0,024 y el coeficiente de variación fue de 0,021, para la de 138 ppm de calcio y de magnesio, la desviación estándar fue de 0,007 y el coeficiente de variación fue de 0,005, esto significa que hubo una **excelente precisión.**

➤ **Exactitud**

El parámetro estadístico “exactitud” está definido como la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos al valor verdadero. A diferencia de la precisión que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él.

El porcentaje de error para ambos patrones de dureza total por el método complexométrico fue bajo dando valores de 0,910 y 0,220% respectivamente para las muestras provenientes del PICCAP y para la solución patrón de 24; 58; 115 y 138 ppm tanto de calcio como de magnesio fue de 0,475; 0,247; 0,123 y de 0,113% respectivamente.

Los resultados obtenidos expresados en porcentaje de error nos muestra la buena exactitud del método, minimizando de esta manera los errores sistemáticos que pueden haber.

➤ **Límite de detección**

El límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que se puede leer de acuerdo a las concentraciones estándar que se escogieron para la validación, se tomo la menor y se leyó. Se determino de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de dureza total por el método complexométrico, se estableció el límite en 15,98 mg CaCO₃/L, para una concentración de 15,7 mg CaCO₃/L, obteniéndose un volumen de 0,4 mL en la lectura de las respectivas muestras para esta concentración.

➤ **Límite de cuantificación**

El “límite de cuantificación” (o límite de determinación”), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleo para el límite de detección, solo que ésta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B^1$$

Donde:

y_B: Concentración cuantificable del estándar

S_B: Desviación estándar

El límite de cuantificación se determinó para la validación de dureza total método de complexometría en 16,64 mg CaCO₃/L, que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas. Lo que indica que el valor de 16,64 es lo que se puede cuantificar el método, ya que un dato por encima de este el volumen se hace mayor y muy por debajo se hace imposible de ver y de leer y lo que se buscaba era determinar la menor cantidad que la titulación complexométrica pudiera considerar inferior para una medida cuantitativa precisa.

6.3.9 CONCLUSIONES

- El proceso de validación para la determinación de dureza total por el método complexométrico fue de fácil ejecución dando óptimos resultados en cuanto a los parámetros de exactitud y precisión, que confirma la aplicabilidad del método en el **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** para la matriz agua.
- Los límites de detección y de cuantificación se aplicó con el fin de determinar la mínima y la menor cantidad que el método en este caso fue titulación complexométrica puede leer y cuantificarse para tener una certeza de un valor permisible y confiable que se pueda reportar a la validación llevada a cabo durante este proceso.
- Los datos obtenidos en el proceso de validación para las muestras provenientes del PICCAP estuvieron dentro de los parámetros establecidos (mg CaCO₃/L) por este programa de comparación interlaboratorios dando así la aprobación para la

validación de dureza total en el **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** para la matriz agua.

6.3.10 RECOMENDACIONES

- Las muestras a tratar en la determinación de dureza total por el método complexométrico, deben estar a una temperatura ambiente, pues este factor influye altamente en los resultados analíticos.

- Hacer los ajustes pertinentes de pH con solución Buffer con el fin de impedir la precipitación del magnesio, permitiendo determinar la suma de los iones calcio y magnesio con EDTA como titulante para observar mejor el cambio de viraje.

- Para asegurar que haya suficientes iones magnesio y el indicador funcione adecuadamente, a veces se añade al amortiguador o al titulante una pequeña concentración del quelato de magnesio y EDTA.

- El magnesio que forma el complejo de EDTA menos estable de los cationes multivalentes que existen en las muestras normales de agua, no se compleja con EDTA hasta que se adicione en cantidad suficiente de negro de eriocromo T que puede ser adecuado en las titulaciones de la dureza del agua.

- Mantener el material limpio para eliminar posibles errores que intervengan en el análisis.

6.4 VALIDACIÓN DE NITRITOS MÉTODO DE ZABELLI

6.4.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad, que servirán como criterios de confianza para la determinación de nitritos por el método de Zambelli.

6.4.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

Según el origen de las aguas, la cantidad en nitritos es bastante variable. El método del reactivo de Zambelli puede aplicarse para contenidos en iones NO_2^- superiores a 50 $\mu\text{g/L}$. El ácido Sulfanílico en medio de ácido clorhídrico y en presencia del ion amonio y de fenol, forma con los iones nitroso (NO_2^{1-}), un complejo de color amarillo, cuya intensidad es proporcional a la concentración o cantidad de nitritos en la muestra. Es necesario tener presente que existen otros métodos un poco mas sensibles como el método de la Sulfanilamida. Se aplica en aguas completamente transparentes y si no lo fueran se debe de llevar a cabo un tratamiento a la muestra con una suspensión de hidróxido de aluminio.

El Decreto 475 de 1998 del Ministerio de Salud "NORMAS TÉCNICAS DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE" da un valor de 0,1 mg/L para nitratos en agua potable y de 1,0 mg/L para agua segura.

6.4.3 REACTIVOS

- Agua destilada y desmineralizada.
- Solución Reactivo de Zambelli (R. Z.): contiene
 - Ácido clorhídrico
 - Ácido Sulfanílico
 - Agua destilada
 - Cloruro de amonio
 - Fenol cristalizado
- Solución patrón de Nitrito (NaNO_2) de 100 mg NO_2^-/L
- Solución estándar de Nitrito de 2,5 mg NO_2^-/L

6.4.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- Espectrofotómetro con región visible

- Balones aforados de 25, 50 y 100 mL
- Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 25 mL
- Vasos de precipitado de 100 mL

6.4.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de las aguas, J. Rodier. Ediciones Omega, S.A., Barcelona 1981.

- **Reactivo de Zambelli:** Introducir en un matraz aforado de un (1) L ácido clorhídrico y agua destilada. Después disolver el ácido sulfanílico y el fenol en el matraz calentando ligeramente a baño maría. Después de la disolución completa, adicionar el cloruro amónico y agitar hasta disolución. Dejar enfriar y ajustar el volumen de la solución con un (1) L de agua destilada.

Preparación del reactivo:

HCl puro: 260 mL

Ácido Sulfanílico: 5 g

Fenol cristalizado: 7,5 g

Cloruro amónico: 135 g

Agua destilada: 625 mL

- **Solución patrón de Nitrito (NaNO_2) de 100 mg NO_2^-/L :** pesar 0,03750 g de Nitrito de Sodio (NaNO_2), previamente pulverizados en un mortero para 250 mL.
- **Solución estándar de Nitrito de 2,5 mg NO_2^-/L :** tomar 2,5 mL de la solución patrón de 100 mg NO_2^-/L y completar a 100 mL con agua desionizada.
- **Hidróxido de Amonio (NH_4OH)**

6.4.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de nitritos por el método de Zambelli se siguió el procedimiento descrito en el protocolo para análisis de las aguas. J. Rodier. Ediciones Omega, S.A., Barcelona 1981.

El siguiente fue el grupo básico de muestras que se leyó durante 5 ensayos con su respectiva replica de los que consta el proceso de validación.

Bk: Blanco de reactivos

Eb: Estándar de nitrito de concentración baja = 0,025 mg NO_2^-/L

Emb: Estándar de nitrito de concentración media baja = 0,050 mg NO_2^-/L

Em: Estándar de nitrito de concentración media alta = 0,075 mg NO_2^-/L

Ea: Estándar de nitrito de concentración alta = 0,100 mg NO₂⁻/L

El proceso de validación se inicio el día dieciocho (18) de abril a las 12h: 22min, hasta el día veintidós (22) del mismo mes.

Los estándares de las diferentes concentraciones analizadas se prepararon el primer día; a partir de una solución patrón de 2,5 mg NO₂⁻/L, los datos que se obtuvieron serán reportados en la tabla de parámetros analíticos.

6.4.7 RESULTADOS

El cálculo de la determinación de nitritos es hallado por la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 435 nm de cada estándar o patrón incluyendo la curva de calibración se procede a determinar la concentración de la muestra.

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	mg NO ₂ ⁻ /L				
		BK	Eb	Emb	Ema	Ea
	1	0,00	0,024	0,047	0,075	0,101
		0,00	0,025	0,051	0,074	0,100
	2	0,00	0,024	0,047	0,079	0,099
		0,00	0,025	0,051	0,074	0,100
	3	0,00	0,028	0,047	0,073	0,102
		0,00	0,027	0,048	0,073	0,102
	4	0,00	0,025	0,048	0,074	0,102
		0,00	0,025	0,052	0,076	0,099
	5	0,00	0,026	0,052	0,073	0,100
		0,00	0,024	0,050	0,074	0,101
Promedio		-	0,025	0,049	0,075	0,101
Desviación estándar		-	0,001	0,002	0,002	0,001
Número de datos		10	10	10	10	10
Mínimo		-	0,024	0,047	0,073	0,099
Máximo		-	0,028	0,052	0,079	0,102
Intervalo		-	0,004	0,005	0,006	0,003
Tbajo		-	0,972	1,090	0,815	1,363
Talto		-	2,019	1,279	2,444	1,193
T teórico		2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: La **TABLA 1.** Presenta los parámetros estadísticos de los resultados analíticos antes de aplicar el criterio de rechazo de datos, se eliminan los datos resaltados con negrilla.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para n=10, donde n es el número de muestras. El valor reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	mg NO ₂ /L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
mg NO ₂ /L teórico		0	0,025	0,050	0,075	0,100
	1	0,00	0,024	0,047	0,075	0,101
		0,00	0,025	0,051	0,074	0,100
	2	0,00	0,024	0,047	0,079	0,099
		0,00	0,025	0,051	0,074	0,100
	3	0,00	0,028	0,047	0,073	0,102
		0,00	0,027	0,048	0,073	0,102
	4	0,00	0,025	0,048	0,074	0,102
		0,00	0,025	0,052	0,076	0,099
	5	0,00	0,026		0,073	0,100
		0,00	0,024	0,050	0,074	0,101
Promedio		-	0,025	0,049	0,075	0,101
Desviación estándar		-	0,001	0,002	0,002	0,001
%CV		-	5,287	4,082	2,471	1,167
%Error		-	1,200	2,000	0,667	0,600

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

➤ Respuesta del instrumento en función de la concentración de nitritos

La tabla que se muestra a continuación, representa los datos obtenidos al realizar la curva de calibración de nitritos en un intervalo de concentración entre 0,0 y 0,1 mg NO₂ /L.

Concentración mg/L	Abs	% T	log C	Abst	T	(ΔC/C)/ΔT ⁻¹ Error relativo
0,000	0,00	100,00		0,00	1,00	
0,025	0,014	96,828	-1,602	3,172	0,968	32,016
0,050	0,028	93,756	-1,301	6,244	0,938	16,532
0,075	0,042	90,782	-1,125	9,218	0,908	11,383
0,100	0,056	87,902	-1,000	12,098	0,879	8,817

Tabla 3. Respuesta del Instrumento en Función de la concentración de nitritos.

¹ Error relativo considerado para 1% de error de transmitancia

Abs : Absorbancia

%T : Porcentaje de transmitancia

Log C : Logaritmo de la concentración

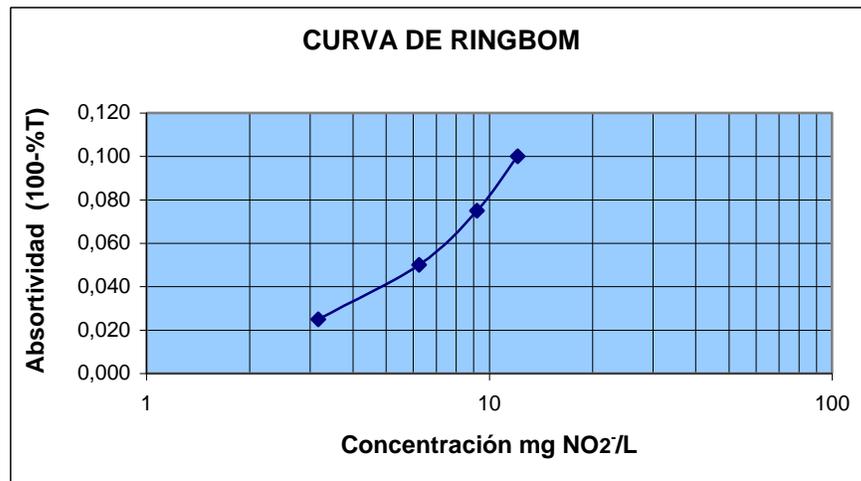
Abs. : Absortividad

T : Transmitancia.

$$\begin{aligned} \%T &= 10^{(2 - Abs)} \\ T &= \%T/100 \\ Abst &= 100 - \%T \\ (\Delta C/C)/\Delta T &= 0,434 / (T \log T) \end{aligned}$$

➤ **Curva de Ringbom**

A partir de los datos de absorbancia en función de la concentración se construyó la curva de Ringbom:

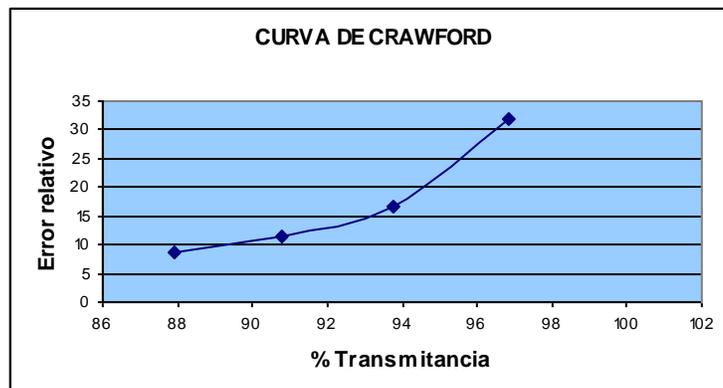


Gráfica 1. Curva de Ringbom

La **Gráfica 1** muestra la absortividad o porcentaje de absorción en función de la concentración donde se obtiene una curva de forma sigmoide llamada la curva de Ringbom, que es usada para definir el intervalo de concentración donde se cumpla la ley de Beer.

La ley de Lambert Beer nos dice que cuando un eje de radiación monocromático atraviesa una solución que contiene una especie absorbente, una parte de la radiación es absorbida en cuanto que la otra es transmitida por el medio.

➤ **Curva de Crawford**

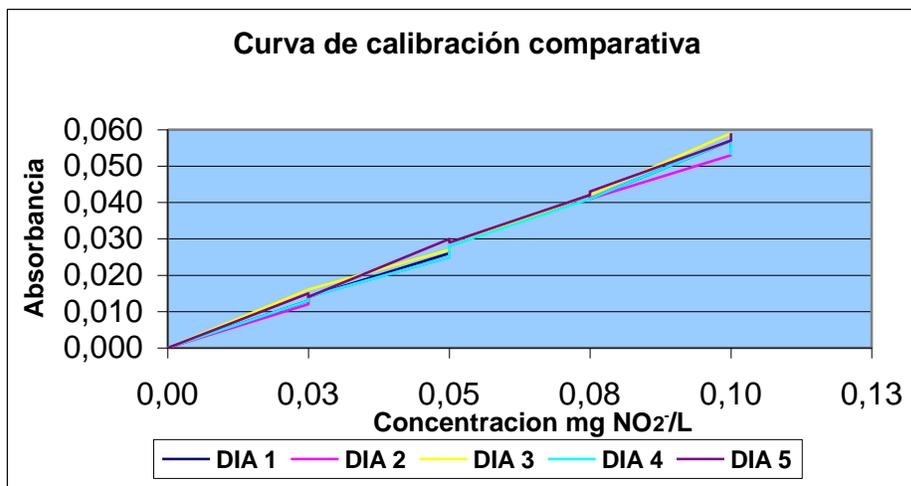


Gráfica 2. Curva de Crawford

La curva de Crawford permite el cálculo del intervalo de mínimo error relativo analítico en concentración, considerando un error de 1% en transmitancia.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Teniendo en cuenta la parte lineal de la curva de Ringbom se construyó la curva de calibración comparativa con un coeficiente de correlación promedio de 0,99863 y una pendiente promedio de 0,56160. Se reporta el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de validación y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.



Grafica 3. Curva de calibración comparativa

Se puede observar las cinco (5) curvas de calibración, cada una de estas elaboradas en días diferentes.

Los coeficientes de correlación de cada una de las gráficas se puede observar en la siguiente tabla:

No. DE ENSAYO Y FECHA	COEFICIENTE DE CORRELACION (r)
No. 1 – 2006 – 04 – 18	0,99918
No. 2 – 2006 – 04 – 19	0,99845
No. 3 – 2006 – 04 – 20	0,99811
No. 4 – 2006 – 04 – 21	0,99811
No. 5 – 2006 – 04 – 22	0,99931

Tabla 4. Resumen de coeficientes de correlación

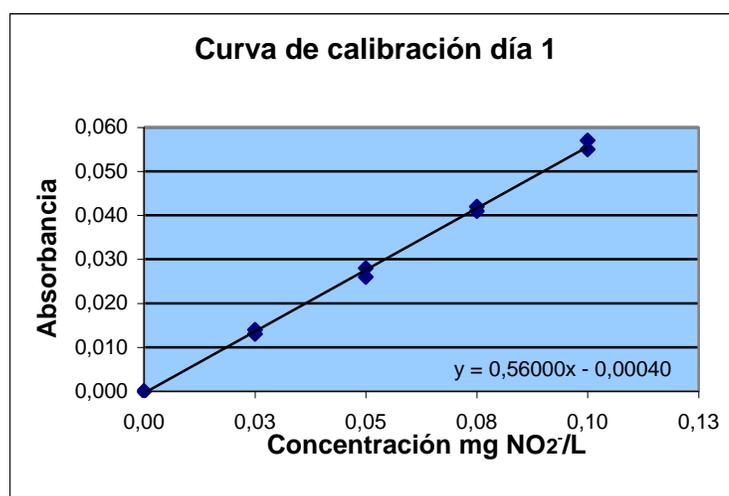
Se observa la concordancia entre cada uno mostrando tendencia al valor de 1 que corresponde a la pendiente de un ángulo de 45°.

➤ **Curvas de calibración por días**

Ensayo No. 1 / 2006 – 04 – 18

No.	mg NO ₂ /L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
1	0,00	0,013	0,026	0,042	0,057
	0,00	0,014	0,028	0,041	0,055
Pendiente	0,56000				
Intercepto	-0,00040				
Correlación	0,9997				

Tabla 5. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 1

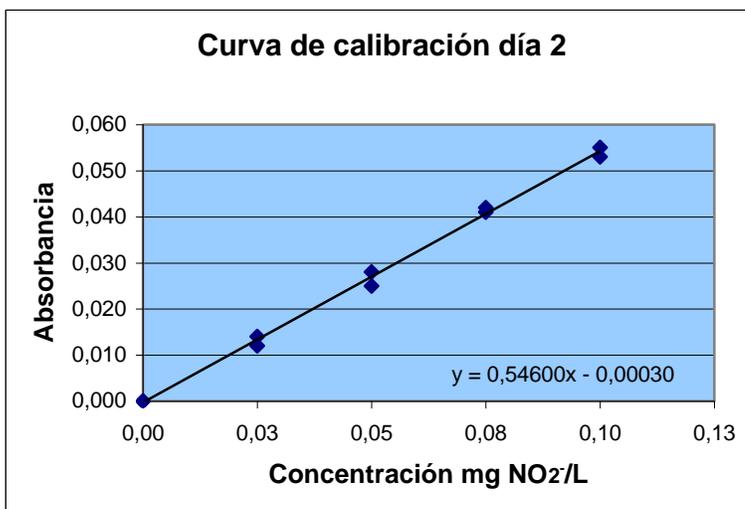


Gráfica 4. Curva de calibración día 1

Ensayo No. 2 / 2006 – 04 – 19

No.	mg NO ₂ /L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
2	0,00	0,012	0,025	0,042	0,053
	0,00	0,014	0,028	0,041	0,055
Pendiente	0,54600				
Intercepto	-0,00030				
Correlación	0,99845				

Tabla 6. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 2

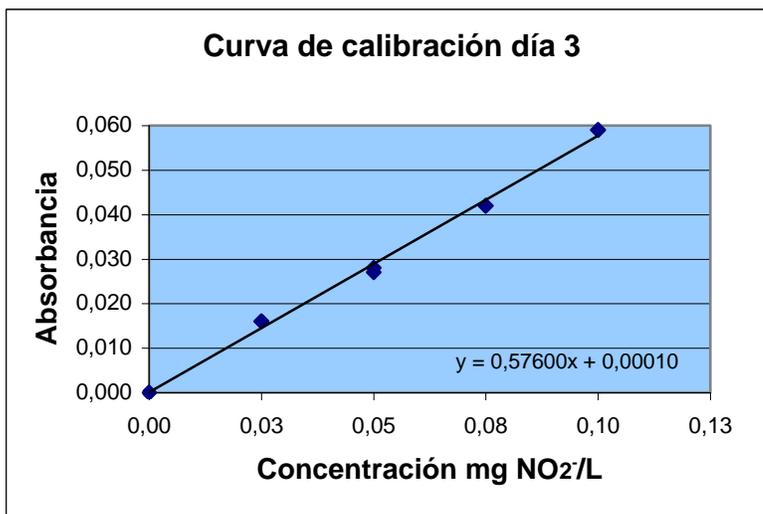


Gráfica 5. Curva de calibración día 2

Ensayo No. 3 / 2006 – 04 – 20

No.	mg NO ₂ /L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
1	0,00	0,016	0,027	0,042	0,059
2	0,00	0,016	0,028	0,042	0,059
Pendiente	0,57600				
Intercepto	0,00010				
Correlación	0,99811				

Tabla 7. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 3

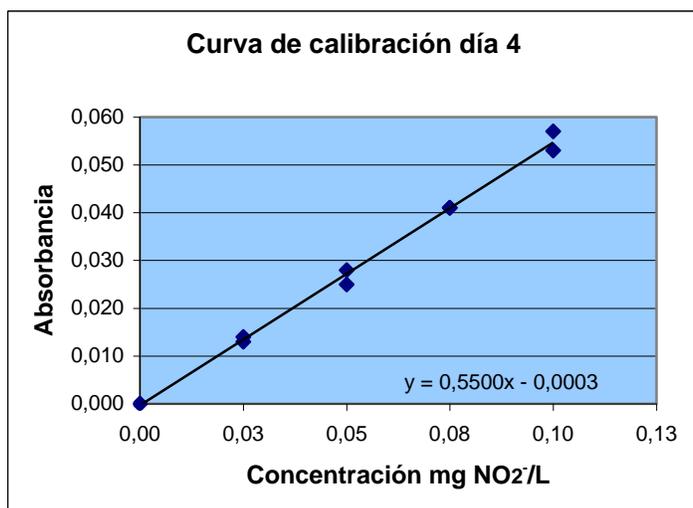


Gráfica 6. Curva de calibración día 3

Ensayo No. 4 / 2006 – 04 – 21

No.	mg NO ₂ /L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
4	0,00	0,013	0,026	0,041	0,057
	0,00	0,014	0,028	0,041	0,053
Pendiente	0,55000				
Intercepto	-0,00030				
Correlación	0,99811				

Tabla 8. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 4

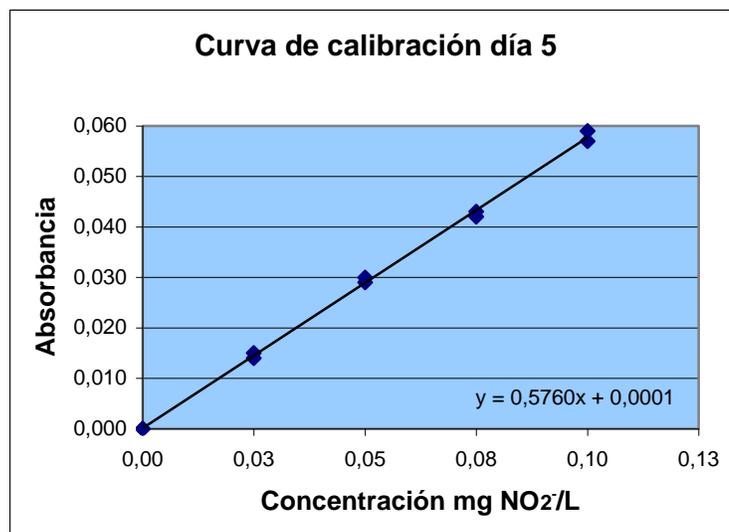


Gráfica 7. Curva de calibración día 4

Ensayo N° 5 / 2006 – 04 – 22

No.	mg NO ₂ /L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
5	0,00	0,015	0,030	0,042	0,057
	0,00	0,014	0,029	0,043	0,059
Pendiente	0,57600				
Intercepto	0,00100				
Correlación	0,99931				

Tabla 9. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 5



Gráfica 8. Curva de calibración día 5

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad del método es la pendiente promedio de las curvas de calibración (curvas de trabajo). En este proceso el valor obtenido fue 0,56160 de sensibilidad de calibración lo que significa que este valor es el factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

Fecha	Pendiente	Coficiente de correlación
18/04/2006	0,56000	0,99918
19/04/2006	0,54600	0,99845
20/04/2006	0,57600	0,99811
21/04/2006	0,55000	0,99811
22/04/2006	0,57600	0,99931
Promedio	0,56160	0,99863
Desviación estándar	0,01261	0,00058
Sensibilidad calibración	0,56160	

Tabla 10. Parámetros estadísticos de sensibilidad

Se asume la sensibilidad del método como la pendiente promedio de las curvas de calibración (curvas de trabajo), el valor a reportar es de 0,56160, lo que significa que este valor corresponde al factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

➤ **Límite de detección y cuantificación**

En la siguiente tabla se muestran los valores de la respuesta del colorímetro para nitritos en función del límite de detección y de cuantificación:

CONCENTRACIÓN ESTÁNDAR		ABSORBANCIAS MEDIDAS	
	0,01		0,006
			0,004
			0,006
			0,006
			0,006
			0,004
			0,006
			0,006
			0,004
			0,006
			0,006
			0,004
			0,006
	PROMEDIO		0,005
	DESVIACIÓN ESTÁNDAR		0,002
	LÍMITE DE DETECCIÓN		0,01
	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN		0,03

Tabla 11. Respuesta colorímetro para nitritos en función del límite de detección y de cuantificación.

El colorímetro me da las lecturas obtenidas por cada muestra de la cual los resultados dados se incluye el promedio en la curva de calibración es decir **0,005** hallando de esta forma así el límite de detección y de cuantificación.

6.4.8 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al observar los datos experimentales de nitritos por el método de Zambelli se puede decir que:

➤ **Precisión**

El parámetro estadístico “precisión”, definiéndolo en términos del coeficiente de variación para concentraciones de soluciones estándares preparadas menores de 0,1 mg NO₂/L está por de bajo del 5%.

De acuerdo al intervalo de concentración que se tuvo en cuenta para el proceso de validación (0,025 – 0,1 mg NO₂/L) se pudo observar que la precisión para esta técnica es muy buena pues los resultados obtenidos son cercanos a los que hace referencia la literatura.

➤ **Exactitud**

Respecto al parámetro estadístico de “exactitud”, definiéndolo en términos de porcentaje de error relativo, para los estándares de concentraciones menores de 0,1 mg NO₂⁻/L utilizadas en este proceso de validación se puede decir que este porcentaje de error está en el rango de 0,600 y 2,000%.

Este porcentaje de error relativo tan bajo revela y confirma la buena exactitud de la técnica para la determinación de nitritos método de Zambelli por colorimetría.

➤ **Curva de calibración**

La curva de Ringbom obtenida (**GRÁFICO No.1**) muestra la tendencia sigmoideal aplicada a las cuatro (4) concentraciones estándar de 0,025; 0,050; 0,075 y 0,100 mgNO₂⁻/L, principalmente en el intervalo de concentración de 0,075 a 0,100 mgNO₂⁻/L en el que se cumple la ley de Beer.

➤ **Curva de Crawford**

La medida de la transmitancia esta sujeta a una incerteza llamada error relativo de concentración.

El intervalo en que los resultados producen menor error relativo están entre 0,4 a 0,7 o del 20 al 60% de T (Transmitancia). Para la curva de Crawford obtenida no se aprecia muy bien pues su tendencia es en forma de U, que se debió a los pocos datos de concentración estándar de la muestra tomados para el proceso de validación.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Se puede notar una buena concordancia entre ellas, aunque se observa diferencia entre los días dos (2), cuatro (4) y cinco (5) (**Gráfica No 3 y Tabla No 4**), que obedeció posiblemente a elementos que afectaron la sensibilidad como:

- Paso óptico (ajuste de la longitud de onda, lámpara, amplitud de abertura del diafragma).
- Absorbancia (velocidad de aspiración del material por la llama).

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad se calcula como el promedio de las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.

La sensibilidad resulta del promedio de la pendiente de la curva de calibración ± desviación estándar (0,56160 ± 0,01261) .El valor a reportar es de 0,56160, lo que significa que este valor corresponde al factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

➤ **Límite de detección**

El límite de detección (LOD) de una analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que puede leer el espectrofotómetro Spectronic 20D modelo 333175 de acuerdo con las concentraciones estándar que se escogieron para la validación, se tomo la menor y se leyó. Se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de nitritos por el método de Zambelli, utilizando el equipo del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** espectrofotómetro Spectronic 20D modelo 333175 con base a los patrones de la curva de calibración, se estableció el límite en 0,01 mgNO₂⁻/L, para una concentración de 0,03 mgNO₂⁻/L, obteniéndose unas lecturas de absorbancia que oscilaban entre 0,006 y 0,004 de las respectivas muestras para esta concentración ; esto significa que es lo mínimo que puede leer el equipo a esta concentración para nitritos.

➤ Límite de cuantificación

El “límite de cuantificación” (o límite de determinación”), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleó para el límite de detección, solo que esta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración cuantificable del estándar

S_B : Desviación estándar

Se determinó para la validación de nitritos método de Zambelli el límite de cuantificación en 0,01 mgNO₂⁻/L, para 0,03 mgNO₂⁻/L lo que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, este valor obtenido nos indica que a esta concentración dada el equipo puede cuantificarlo, de ahí en adelante se hace más difícil apreciar y valorar este dato, pues de una manera u otra lo que se busca es minimizar los errores que el método presenta en cuanto a la precisión y la exactitud.

➤ Linealidad

Hace referencia a la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento. Para la determinación de la linealidad se necesito de la tabla de valores de la distribución T para calcular LC 95%, después de haber calculado ANOVA para la variación dentro y entre muestras, reportándose 2,78 para P= 0,05.

6.4.9 CONCLUSIONES

- La longitud de onda óptima para realizar la determinación de nitritos método de Zambelli por colorimetría es de 435 nm.
- Según la curva de Ringbom los mejores datos, se encuentran en la sección recta correspondiente al ciclo logarítmico entre concentraciones de 0,05 y 0,1 mgNO₂⁻/L.
- La curva de calibración comparativa para concentraciones de 0,0 a 0,1 mg NO₂⁻/L presenta un coeficiente de correlación de 0,99863 confirmando una buena relación entre la concentración y la absorbancia.
- El método presenta una sensibilidad de calibración de 0,99863, la cual corresponde a la pendiente de la curva de calibración que puede producir un resultado significativo.
- El límite de detección para la determinación de nitritos método de Zambelli por colorimetría es 0,02 mg NO₂⁻/L. Este límite es la concentración mínima que pudo ser medida con una exactitud aceptable.
- El límite de cuantificación que se determinó para nitratos fue de 0,03 mg NO₂⁻/L siendo esta la menor cantidad de analito que pudo determinarse y cuantificarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, para una concentración estándar de 0,01 mg NO₂⁻/L.

6.5 VALIDACIÓN DE NITRATOS MÉTODO DEL SALICILATO DE SODIO

6.5.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad que servirán como criterios de confianza para la determinación de nitratos por el método del salicilato de sodio.

6.5.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

En presencia de salicilato de sodio, los nitratos dan el paranitrosalicilato de sodio de color amarillo susceptibles de una determinación colorimétrica y es estable por lo menos una hora. Este método solo es aplicable a aguas claras. El Decreto 475 de 1998 del Ministerio de Salud "NORMAS TÉCNICAS DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE" da un valor de 10 mg/L para nitratos en agua potable y de 10 mg/L para agua segura.

6.5.3 REACTIVOS

- Agua destilada Tipo III., agua destilada y desmineralizada
- Solución de salicilato de sodio 5%, preparado cada 24 horas
- Ácido sulfúrico concentrado
- Solución de hidróxido de sodio y de tartrato doble de sodio y potasio
- Solución patrón de 100 mg/L nitrógeno nítrico
- Solución estándar de 5 mg/L de nitrógeno nítrico

6.5.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- Espectrofotómetro con región visible
- Erlenmeyers de 250 mL
- Pipetas de 1, 5 y 25 mL
- Peras de caucho
- Balanza analítica de sensibilidad 0,01 mg

- Pesa sustancias

6.5.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de las aguas, J. Rodier. Ediciones Omega, S.A., Barcelona 1981.

- **Solución de salicilato de sodio 5%, preparado cada 24 horas:** pesar 0,25 g de salicilato de sodio y disolverlo en 5 mL de agua destilada.
- Ácido sulfúrico concentrado.
- **Solución de hidróxido de sodio y de tartrato doble de sodio y potasio:** pesar 400 g de hidróxido de sodio, 60 g de tartrato doble de sodio y potasio y llevar a un (1) litro con agua destilada. Esta solución se debe almacenar en envase de polietileno.
- **Solución patrón de 100 mg/L nitrógeno nítrico:** pesar 0,722 g de nitrato de potasio anhidro, agua destilada hasta casi enrase y 1 mL de cloroformo para conservar esta solución.
- **Solución estándar de 5 mg/L de nitrógeno nítrico:** diluir 2,5 mL de la solución patrón y llevar a volumen de 50 mL con agua destilada.

6.5.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de nitratos por el método del salicilato de sodio se siguió el procedimiento descrito en el protocolo para análisis de las aguas. J. Rodier. Ediciones Omega, S.A., Barcelona 1981.

El siguiente fue el grupo básico de muestras que se leyó durante 5 ensayos con su respectiva réplica de los que consta el proceso de validación.

Bk: Blanco de reactivos

Eb: Estándar de nitrato de concentración baja = 0,5 mg NO₃⁻/L

Emb: Estándar de nitrato de concentración media baja = 1,0 mg NO₃⁻/L

Ema: Estándar de nitrato de concentración media alta = 2,5 mg NO₃⁻/L

Ea: Estándar de nitrato de concentración alta = 5,0 mg NO₃⁻/L

El proceso de validación se inició el día veinticinco (25) de mayo a las 10h:35 min, hasta el día treinta y uno (31) del mismo mes. Los estándares de las diferentes concentraciones analizadas se prepararon el primer día; a partir de una solución patrón de 25 mg NO₃⁻/L.

6.5.7 RESULTADOS

El cálculo de la determinación de nitratos es hallado por la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 420 nm de cada estándar o patrón incluyendo la curva de calibración se procede a determinar la concentración de la muestra.

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	mg NO ₃ /L				
		BK	Eb	Emb	Ema	Ea
	1	0,00	0,337	1,249	2,600	4,916
		0,00	0,380	1,200	2,507	4,969
	2	0,00	0,446	0,969	2,539	4,992
		0,00	0,481	0,932	2,552	4,990
	3	0,00	0,466	0,956	2,521	5,002
		0,00	0,460	0,943	2,577	4,977
	4	0,00	0,424	0,995	2,506	5,005
		0,00	0,424	1,037	2,450	5,025
	5	0,00	0,518	0,931	2,434	5,045
		0,00	0,478	0,911	2,560	4,990
Promedio		-	0,441	1,012	2,525	4,991
Desviación estándar		-	0,053	0,118	0,053	0,034
Número de datos		10	10	10	10	10
Mínimo		-	0,337	0,911	2,434	4,916
Máximo		-	0,518	1,249	2,600	5,045
Intervalo		-	0,181	0,338	0,166	0,129
Tbajo		-	1,980	0,858	1,716	2,178
Talto		-	1,453	2,006	1,428	1,563
T teórico		2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: La **TABLA 1.** Presenta los parámetros estadísticos de los resultados analíticos antes de aplicar el criterio de rechazo de datos, se eliminan los datos resaltados con negrilla.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para n=10, donde n es el número de muestras. El valor reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	mg NO ₃ /L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
mg NO ₃ /L teórico		0	0,5	1,0	2,5	5,0
	1	0,00	0,337		2,600	4,916
		0,00	0,380		2,507	4,969
	2	0,00	0,446	0,969	2,539	4,992
		0,00	0,481	0,932	2,552	4,990
	3	0,00	0,466	0,956	2,521	5,002
		0,00	0,460	0,943	2,577	4,977
	4	0,00	0,424	0,995	2,506	5,005
		0,00	0,424		2,450	5,025
	5	0,00	0,518	0,931	2,434	5,045
		0,00	0,478	0,911	2,560	4,990
Promedio		-	0,441	1,012	2,525	4,991
Desviación estándar		-	0,053	0,028	0,053	0,034
%CV		-	11,946	2,752	2,091	0,691
%Error		-	11,720	1,200	0,984	0,178

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

➤ Respuesta del instrumento en función de la concentración de nitratos

La tabla que se muestra a continuación, representa los datos obtenidos al realizar la curva de calibración de nitratos en un intervalo de concentración entre 0,0 y 5,0 NO₃ mg/L.

Concentración mg/L	Abs	% T	log C	Abst	T	(ΔC/C)/ΔT ¹ Error relativo
0,000	0,00	100,00		0,00	1,00	
0,5	0,445	35,925	-0,301	64,075	0,359	2,717
1,0	1,005	9,895	0,000	90,105	0,099	4,366
2,5	2,529	0,296	0,398	99,704	0,003	58,037
5,0	4,990	0,001	0,699	99,999	0,000	8503,0

Tabla 3. Respuesta del Instrumento en Función de la concentración de nitratos.

¹ Error relativo considerado para 1% de error de transmitancia

Abs : Absorbancia

%T : Porcentaje de transmitancia

Log C : Logaritmo de la concentración

Abs. : Absortividad

T : Transmitancia.

$$\%T = 10^{(2 - Abs)}$$

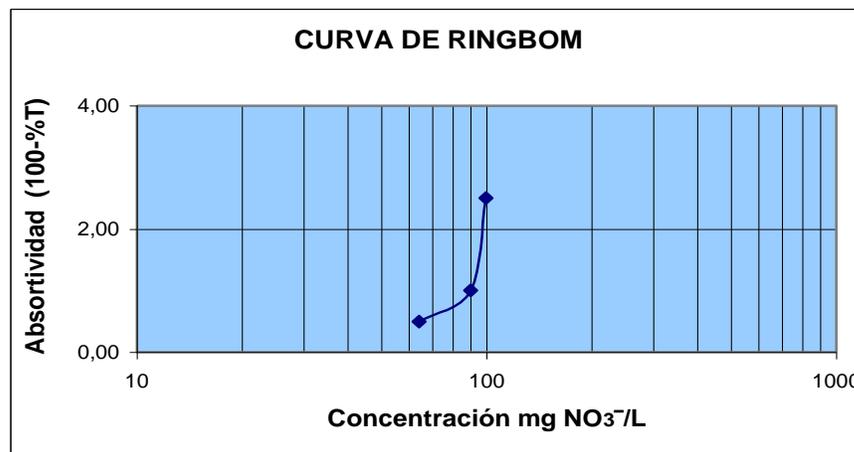
$$T = \%T/100$$

$$Abst = 100 - \%T$$

$$(\Delta C/C)/\Delta T = 0,434 / (T \log T)$$

➤ Curva de Ringbom

A partir de los datos de absorbancia en función de la concentración se construyó la curva de Ringbom:

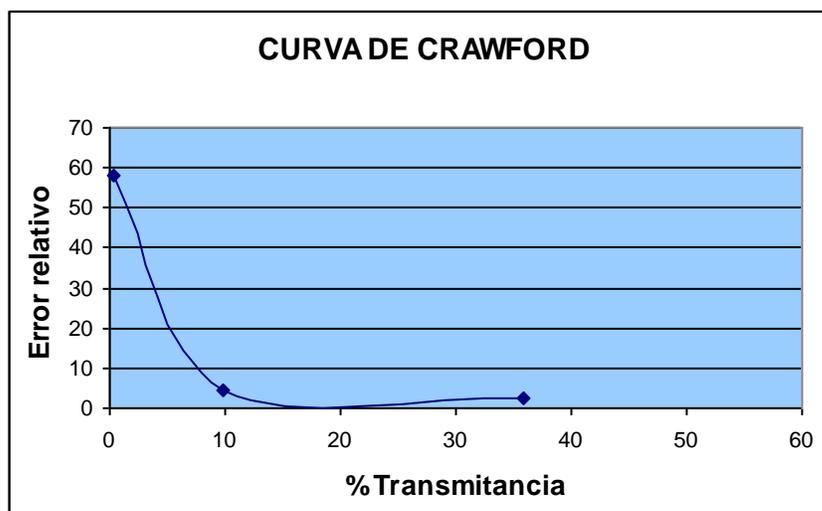


Gráfica 1. Curva de Ringbom

La **Gráfica 1** muestra la absortividad o porcentaje de absorción en función de la concentración donde se obtiene una curva de forma sigmoidal llamada la curva de Ringbom, que es usada para definir el intervalo de concentración donde se cumpla la ley de Beer.

La ley de Lambert Beer nos dice que cuando un eje de radiación monocromático atraviesa una solución que contiene una especie absorbente, una parte de la radiación es absorbida en cuanto que la otra es transmitida por el medio.

➤ Curva de Crawford

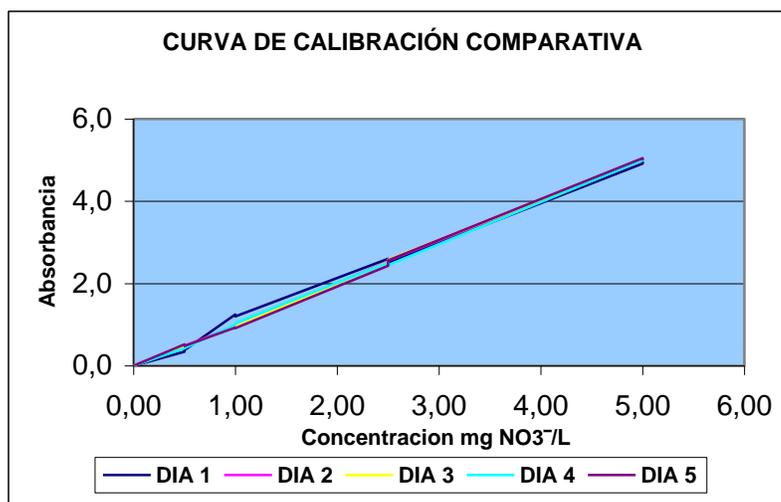


Gráfica 2. Curva de Crawford

La curva de Crawford permite el cálculo del intervalo de mínimo error relativo analítico en concentración, considerando un error de 1% en transmitancia.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Teniendo en cuenta la parte lineal de la curva de Ringbom se construyó la curva de calibración comparativa con un coeficiente de correlación promedio de 0,99934 y una pendiente promedio de 1,00338. Se reporta el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de validación y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.



Grafica 3. Curva de calibración comparativa

Se puede observar las cinco (5) curvas de calibración, cada una de estas elaboradas en días diferentes.

Los coeficientes de correlación de cada una de las gráficas se puede observar en la siguiente tabla:

No. DE ENSAYO Y FECHA	COEFICIENTE DE CORRELACION (r)
No. 1 – 2006 – 05 – 25	0,99757
No. 2 – 2006 – 05 – 26	0,99983
No. 3 – 2006 – 05 – 27	0,99980
No. 4 – 2006 – 05 – 30	0,99981
No. 5 – 2006 – 05 – 31	0,99970

Tabla 4. Resumen de coeficientes de correlación

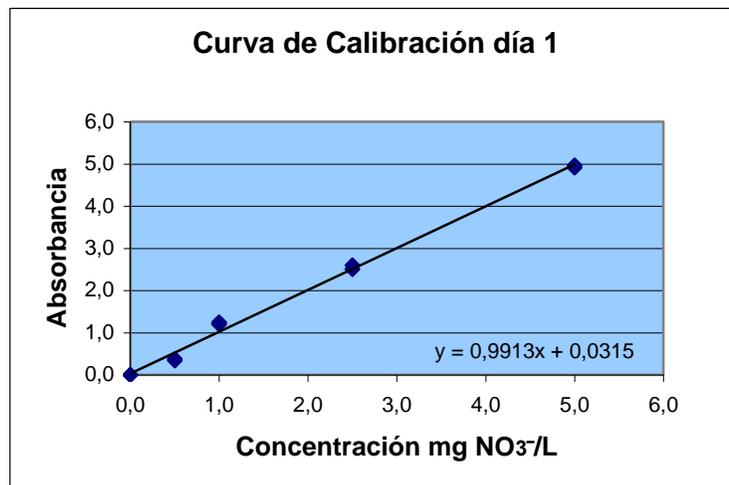
Se observa la concordancia entre cada uno mostrando tendencia al valor de 1 que corresponde a la pendiente de un ángulo de 45°.

➤ **Curvas de calibración por días**

Ensayo No. 1 / 2006 – 05 – 25

No.	mg NO ₃ /L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
1	0,00	0,337	1,249	2,600	4,916
	0,00	0,380	1,200	2,507	4,969
Pendiente	0,99128				
Intercepto	0,03150				
Correlación	0,99757				

Tabla 5. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 1

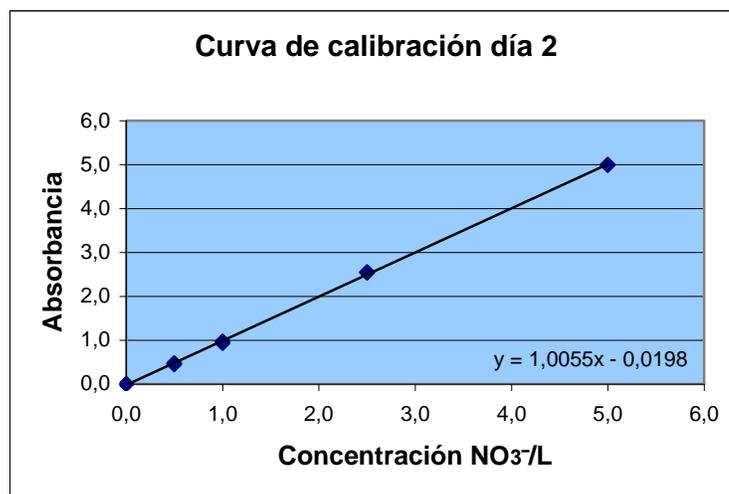


Gráfica 4. Curva de calibración día 1

Ensayo No. 2 / 2006– 05 – 26

No.	mg NO ₃ ⁻ /L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
2	0,00	0,446	0,969	2,539	4,992
	0,00	0,481	0,932	2,552	4,990
Pendiente	1,00553				
Intercepto	-0,01985				
Correlación	0,99983				

Tabla 6. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 2

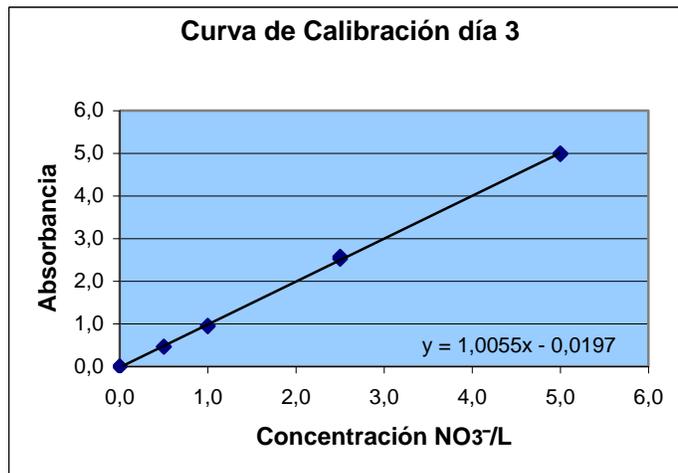


Gráfica 5. Curva de calibración día 2

Ensayo No. 3 / 2006 – 05 – 27

No.	mg NO ₃ ⁻ /L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
3	0,00	0,466	0,956	2,521	5,002
	0,00	0,460	0,943	2,577	4,977
Pendiente	1,00547				
Intercepto	-0,01695				
Correlación	0,99980				

Tabla 7. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 3

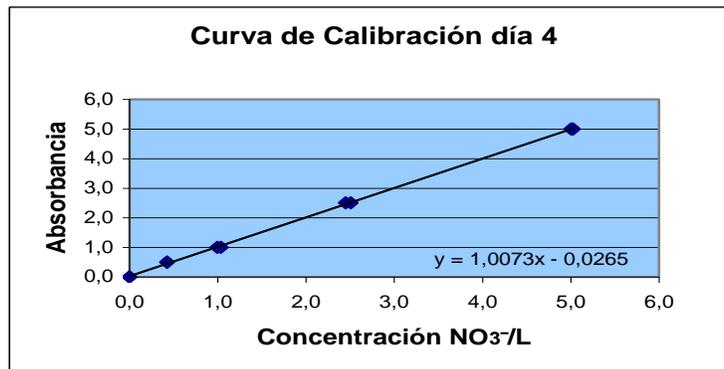


Gráfica 6. Curva de calibración día 3

Ensayo No. 4 / 2006 – 05 – 30

No.	mg NO ₃ ⁻ /L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
1	0,00	0,424	0,995	2,506	5,005
	0,00	0,424	1,037	2,450	5,025
Pendiente		1,00728			
Intercepto		-0,02650			
Correlación		0,99981			

Tabla 8. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 4

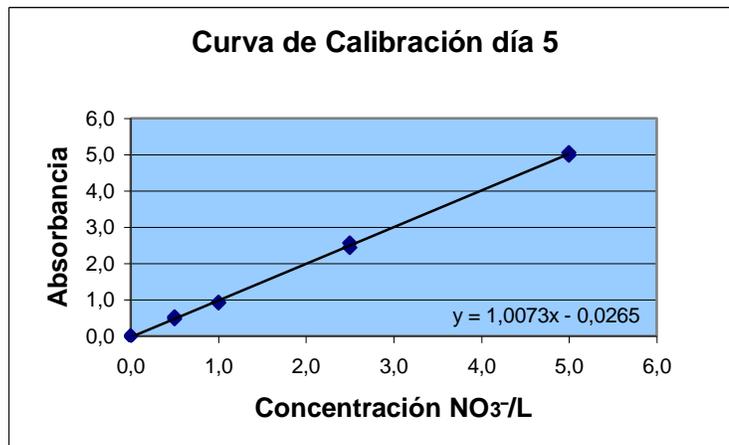


Gráfica 7. Curva de calibración día 4

Ensayo N° 5 / 2006 – 05 – 31

No.	mg NO ₃ ⁻ /L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
2	0,00	0,518	0,931	2,434	5,045
	0,00	0,478	0,911	2,560	4,990
Pendiente		1,00734			
Intercepto		-0,02652			
Correlación		0,99970			

Tabla 9. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 5



Gráfica 8. Curva de calibración día 5

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad del método es la pendiente promedio de las curvas de calibración (curvas de trabajo). En este proceso el valor obtenido fue 1,00338 de sensibilidad de calibración lo que significa que este valor es el factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

Fecha	Pendiente	Coefficiente de correlación
26/05/2006	0,99128	0,99757
27/05/2006	1,00553	0,99983
28/05/2006	1,00547	0,99980
30/05/2006	1,00728	0,99981
31/05/2006	1,00734	0,99970
Promedio	1,00338	0,99934
Desviación estándar	0,00610	0,0001
Sensibilidad calibración	1,00338	

Tabla 10. Parámetros estadísticos de sensibilidad

Se asume la sensibilidad del método como la pendiente promedio de las curvas de calibración (curvas de trabajo), el valor a reportar es de 1,00338, lo que significa que este valor corresponde al factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

➤ **Límite de detección y cuantificación**

En la siguiente tabla se muestran los valores de la respuesta del colorímetro para nitratos en función del límite de detección y de cuantificación:

CONCENTRACIÓN ESTÁNDAR	ABSORBANCIAS MEDIDAS
0,1	0,003
	0,002
	0,003
	0,002
	0,003
	0,002
	0,003
	0,003
	0,002
	0,003
PROMEDIO	0,003
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,03
LÍMITE DE DETECCIÓN	0,19
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	0,39

Tabla 6. Respuesta colorímetro para nitratos en función del límite de detección y de cuantificación.

El colorímetro me da las lecturas obtenidas por cada muestra de la cual los resultados dados se incluye el promedio en la curva de calibración es decir **0,003** hallando de esta forma así el límite de detección y de cuantificación.

6.5.8 ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Al observar los datos experimentales de nitratos por el método del salicilato de sodio se puede decir que:

➤ Precisión

El parámetro estadístico “precisión”, definiéndolo en términos del coeficiente de variación para concentraciones de soluciones estándares preparadas menores de 5,0 mgNO₃⁻/L está por de bajo del 11%.

De acuerdo al intervalo de concentración que se tuvo en cuenta para el proceso de validación (0,5 – 5,0 mgNO₃⁻/L) se pudo observar que la precisión o reproducibilidad se afecta por los errores aleatorios que provoca que de una manera u otra los resultados cambien, aunque estos son pequeños.

El obtener un resultado por debajo del 11% indica que el grado de concordancia entre la muestra y su respectiva replica es buena, pues hay reproducibilidad en el ensayo, así la desviación estándar o su coeficiente de variación que en este caso fue: 0,053 para 0,5 mgNO₃⁻/L; 0,028 para 1,0 mgNO₃⁻/L; 0,053 para 2,5 mgNO₃⁻/L y 0,034 para 5,0 mgNO₃⁻/L, nos da el ejemplo de un error relativo que no es más que la comparación de la precisión de estos resultados obtenidos con la definición dada anteriormente. No está demás decir que para una concentración de 0,5 mgNO₃⁻/L el %de error es muy alto respecto de las demás concentraciones, tal vez por factores tales como la disolución completa de la

muestra con el salicilato de sodio al 5% en presencia del ácido sulfúrico (H_2SO_4) que de una manera u otra afecto la concentración de esta, o una parte de la solución no fue absorbida por el haz luminoso si no que fue transmitida por el medio (pérdidas por reflexión y por dispersión).

➤ **Exactitud**

Respecto al parámetro estadístico de “exactitud”, definiéndolo en términos de porcentaje de error relativo, para los estándares de concentraciones menores de $5,0 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$ utilizadas en este proceso de validación se puede decir que este porcentaje de error esta en el rango de 0,178 y 11,720%.

Este porcentaje de error relativo revela y confirma una buena exactitud a excepción de la concentración de $0,5 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$ que presento un % error algo lejos de los demás rangos de concentraciones de la técnica para la determinación de nitratos por el método de colorimetría.

Curva de calibración

➤ **Curva de Ringbom**

La curva de Ringbom obtenida (**GRÁFICO No.1**) muestra una tendencia recta en los puntos $1,0$ a $2,5 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$ aplicada a las cuatro (4) concentraciones estándar de $0,5$; $1,0$; $2,5$ y $5,0 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$, en este caso no se obtuvo la forma sigmoide en la gráfica ya que no se tomó la concentración estándar de $5,0 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$ pues su error relativo fue tan alto que afecto el cumplimiento de la ley de Beer, talvez cuando al ser colocada la muestra en la celda del instrumento su ubicación no fue reproducible, se introdujo cierto error debido a que cada medición se realiza con una geometría ligeramente distinta. Como siempre las diferencias de preparación de la muestra contribuyen a la imprecisión y parte del material bloqueo la luz y el resultado fue inexacto, lo que significa que para el proceso de nitratos en el colorímetro no se apreció la curva de Ringbom.

➤ **Curva de Crawford**

La medida de la transmitancia esta sujeta a una incerteza llamada error relativo de concentración.

El intervalo en que los resultados producen menor error relativo están entre $0,4$ a $0,7$ o del 20 al 60% de T (Transmitancia). Para la curva de Crawford obtenida no se aprecia muy bien pues su tendencia es en forma de U, que se debió a los pocos datos de concentración estándar de la muestra tomados para el proceso de validación.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Se puede notar una buena concordancia entre ellas, aunque se observa diferencia en el día uno (1) en comparación con los otros días (**Gráfica No 3 y Tabla No 4**), que obedeció posiblemente a elementos que afectaron la sensibilidad como:

- Paso óptico (ajuste de la longitud de onda, lámpara, amplitud de abertura del diafragma).
- Absorbancia (velocidad de aspiración del material por la llama).

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad se calcula como el promedio de las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.

La sensibilidad resulta del promedio de la pendiente de la curva de calibración \pm desviación estándar (1,00338 \pm 0,00610). El valor a reportar es de 1,00338, lo que significa que este valor corresponde al factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

➤ Límite de detección

El límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del "blanco" o "ruido de fondo". En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que puede leer el espectrofotómetro Spectronic 20D modelo 333175 de acuerdo con las concentraciones estándar que se escogieron para la validación, se tomó la menor y se leyó. Se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de nitratos por el método de Salicilato de Sodio, utilizando el equipo del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** espectrofotómetro Spectronic 20D modelo 333175 con base a los patrones de la curva de calibración, se estableció el límite en 0,19 mgNO₃⁻/L, para una concentración de 0,1 mgNO₃⁻/L, obteniéndose unas lecturas de absorbancia que oscilaban entre 0,003 y 0,002 de las respectivas muestras para esta concentración; esto significa que es lo mínimo que puede leer el equipo a esta concentración para nitratos.

➤ Límite de cuantificación

El "límite de cuantificación" (o límite de determinación), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleó para el límite de detección, solo que ésta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración cuantificable del estándar

S_B : Desviación estándar

Se determinó para la validación de nitratos método de Salicilato de Sodio el límite de cuantificación en $0,39 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$, para $0,1 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$ lo que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, este valor obtenido nos indica que a esta concentración dada el equipo puede cuantificarlo, de ahí en adelante se hace más difícil apreciar y valorar este dato, pues de una manera u otra lo que se busca es minimizar los errores que el método presenta en cuanto a la precisión y la exactitud.

➤ **Linealidad**

Hace referencia a la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento. Para la determinación de la linealidad se necesito de la tabla de valores de la distribución T para calcular LC 95%, después de haber calculado ANOVA para la variación dentro y entre muestras, reportándose 2,78 para $P=0,05$.

6.5.9 CONCLUSIONES

- La longitud de onda óptima para realizar la determinación de nitratos método de salicilato de sodio por colorimetría es 420 nm.
- La validación de nitratos método de Salicilato de Sodio por colorimetría presento una variación en los resultados algo amplia lo que indica que el método no fue lo suficientemente rentable en cuanto a su sensibilidad, pues su promedio en curvas de calibración en los ensayos de estandarización fue alto con respecto a la pendiente, introduciéndose un error fotométrico que puede ser asociado con la medición de la luz o de la precisión del mismo.
- Según la curva de Ringbom se observo una tendencia recta ya que se tomaron pocos datos para graficar, pues se obtuvo un dato algo discordante que alteraba de una manera u otra ésta grafica (concentración de $5,0 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$) ya que del rango de 2,5 a 5,0 la absorbividad es bastante grande y se ve afectada en la curva de Crawford para el error relativo.
- Cuando la muestra es colocada en la celda o cualquier tipo de recipiente y su ubicación no es reproducible, se introduce cierto error debido a que cada medición se realiza con una geometría ligeramente distinta, ya que las diferencias de preparación de la muestra contribuyen a la imprecisión.
- La curva de calibración comparativa para concentraciones de 0,0 a $5,0 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$ presenta un coeficiente de correlación de 0,99934 confirmando una buena relación entre la concentración y la absorbancia.
- El límite de detección para la determinación de nitratos método de Salicilato de Sodio por colorimetría es $0,19 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$. Este límite es la concentración mínima que pudo ser medida con una exactitud aceptable.
- El límite de cuantificación que se determinó para nitratos fue de $0,39 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$ siendo esta la menor cantidad de analito que pudo determinarse y cuantificarse

con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, para una concentración estándar de 0,10 mgNO₃⁻/L.

- La linealidad que registra el método en base de la tabla de límite de confianza para un 95% es 2,78 para P=0,05, con n-1 grados de libertad. Este dato se tomó como valor crítico de t para contraste de una cola, pues se empleó un solo método para llevar a cabo el proceso de validación y es el único dato que se reporta pues es específico para cuatro (4) muestras (concentraciones estándar).

6.6 VALIDACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL MÉTODO MICRO-KJELDAHL (VOLUMETRÍA)

6.6.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, límite de detección y de cuantificación que servirán como criterios de confianza para la determinación de nitrógeno total por el método micro-kjeldahl (volumetría).

6.6.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

El nitrógeno amino de la mayoría de materiales orgánicos y el amoníaco libre son convertidos a amonio en presencia de ácido sulfúrico (H_2SO_4), sulfato de potasio (K_2SO_4), y sulfato cúprico ($CuSO_4$) como catalizador. Después de la adición de base, el amoníaco es destilado desde el medio alcalino y absorbido en ácido bórico o sulfúrico, para ser cuantificado volumétricamente con H_2SO_4 estándar.

El amoníaco también puede ser determinado colorimétricamente o mediante electrodo selectivo de amonio; la sensibilidad de los métodos colorimétricos los hace particularmente útiles para la determinación de niveles de nitrógeno orgánico menores de 5 mg/L. Los métodos volumétrico y de electrodo selectivo para medición de amoníaco en el destilado son adecuados para un amplio rango de concentraciones de nitrógeno orgánico; los métodos de electrodo selectivo y colorimétrico automatizado pueden usarse para la medición de amoníaco sin destilación.

El método kjeldahl determina el nitrógeno en estado trinegativo; **el “nitrógeno kjeldahl” es la suma del nitrógeno orgánico y el nitrógeno amoniacal**. El principal factor que influencia la selección del método macro o semi-micro-kjeldahl para determinar el nitrógeno orgánico es su concentración. El método macro-kjeldahl es aplicable para muestras que contengan bajas o altas concentraciones de nitrógeno orgánico pero requiere volúmenes de muestra relativamente grandes para bajas concentraciones.

En el método semi-micro-kjeldahl, aplicable a muestras con altas concentraciones de nitrógeno orgánico, el volumen de muestra debe escogerse para un contenido de nitrógeno orgánico más amoniacal en el rango de 0,2 a 2 mg.

6.6.3 REACTIVOS

- Agua destilada y desmineralizada.
- Solución de Sulfato de Amonio $(NH_4)_2SO_4$
- Ácido sulfúrico concentrado para la digestión
- Catalizador

- Hidróxido de sodio, 40 %
- Solución de Ácido Bórico, H_3BO_3 , 4%
- Indicador de Tashiro

6.6.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- Aparato de destilación micro-Kjeldahl
- Balones de cuello largo de 100 mL
- Balón de boca ancha de 100mL
- Balón de 2000 mL
- Erlenmeyer de 1000 mL y de 500 mL para el micro-Kjeldahl
- Pinzas con nuez doble
- Soporte universal
- Mangueras
- Balón aforado de 25,0 mL
- Pipetas graduadas de 1,0 mL y de 10,0 mL
- Pera de succión
- Perlas de vidrio
- Estufa.

6.6.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de las aguas, J. Rodier. Ediciones Omega, S.A., Barcelona 1981.

6.6.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de nitrógeno total por el método Micro-Kjeldahl (Volumetría) se siguió el procedimiento descrito en el protocolo para análisis de las aguas. J. Rodier. Ediciones Omega, S.A., Barcelona 1981.

Los ensayos se realizaron a partir de una solución patrón de 50 ppm de sulfato de amonio $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ con seis (6) soluciones estándar de esta misma concentración, para los cinco (5) días consecutivos del análisis a llevar a cabo, preparados el primer día. Se partió primero que todo de una solución patrón de 1000 ppm siendo esta un titrisol con su respectivo certificado de calidad.

Las muestras se identificaron de la siguiente forma:

Em1: Estándar de nitrógeno total muestra 1

Em2: Estándar de nitrógeno total muestra 2

Em3: Estándar de nitrógeno total muestra 3

El proceso de validación se inició el día veintiséis (26) de abril a las 12h: 00 min y culminó el día treinta (30) del mismo mes.

6.6.7 RESULTADOS

El cálculo de la determinación de nitrógeno total es hallado directamente con el volumen gastado de Ácido Sulfúrico en la titulación de la muestra, conociendo su concentración y el volumen de muestra que se empleó en la validación de esta técnica.

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	mg N/L			
		BK	Eb	Emb	Ema
	1	0,00	48,392	48,392	48,392
		0,00	48,392	49,775	49,775
	2	0,00	49,775	48,392	49,775
		0,00	49,775	48,392	48,392
	3	0,00	47,914	49,454	47,914
		0,00	47,914	49,454	49,454
	4	0,00	47,914	49,454	47,914
		0,00	47,914	47,914	49,454
	5	0,00	49,454	49,454	47,914
		0,00	47,914	49,454	49,454
Promedio		-	48,536	49,014	48,844
Desviación estándar		-	0,809	0,660	0,806
Número de datos		10	10	10	10
Mínimo		-	47,914	47,914	47,914
Máximo		-	49,775	49,775	49,775
Intervalo		-	1,861	1,861	1,861
Tbajo		-	0,769	1,666	1,153
Talto		-	1,532	1,154	1,155
T teórico		2,18	2,18	2,18	2,18

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: La **TABLA 1.** Presenta los parámetros estadísticos de los resultados analíticos antes de aplicar el criterio de rechazo de datos, se eliminan los datos resaltados con negrilla.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para n = 10, donde n es el número de muestras. El valor reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	mg N/L			
		Bk	Eb	Emb	Ema
mg N/L teórico		0	50	50	50
	1	0,00	48,392	48,392	48,392
		0,00	48,392	49,775	49,775
	2	0,00	49,775	48,392	49,775
		0,00	49,775	48,392	48,392
	3	0,00	47,914	49,454	47,914
		0,00	47,914	49,454	49,454
	4	0,00	47,914	49,454	47,914
		0,00	47,914	47,914	49,454
	5	0,00	49,454	49,454	47,914
		0,00	47,914	49,454	49,454
Promedio		-	48,536	49,014	48,844
Desviación estándar		-	0,809	0,660	0,806
%CV		-	1,667	1,346	1,651
%Error		-	2,928	1,973	2,312

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

➤ Límite de detección y cuantificación

En la siguiente tabla se muestran los valores de la respuesta de volumetría (titulación con ácido sulfúrico) para nitrógeno total en función del límite de detección y de cuantificación:

➤ **Exactitud**

El parámetro estadístico “exactitud” está definido como la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos al valor verdadero. A diferencia de la precisión que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él.

Estos porcentajes de error demuestran una óptima exactitud del método y minimizan estos errores; dando así la aprobación para la continuidad de la determinación de nitrógeno total por el método Micro-Kjeldahl (Volumetría) del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** en la matriz agua.

➤ **Límite de detección**

El límite de detección (LOD) de una analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que se puede leer de acuerdo a las concentraciones estándar que se escogieron para la validación, se tomo la menor y se leyó. Se determino de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de nitrógeno total por el método Micro-Kjeldahl (Volumetría), se estableció el límite de detección en 3,33 mgN/L, para una concentración de 2,0 mgN/L, obteniéndose un volumen de 0,05 mL en la lectura de las respectivas muestras para esta concentración.

➤ **Límite de cuantificación**

El “límite de cuantificación” (o límite de determinación”), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleo para el límite de detección, solo que esta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B$$

Donde:

y_B : Concentración cuantificable del estándar

S_B : Desviación estándar

Se determinó para la validación de nitrógeno total método de Micro-Kjeldahl (Volumetría) el límite de cuantificación en 6,44 mgN/L, lo que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas. Lo que indica que el valor de 6,44 es lo que se puede cuantificar el método, ya que un dato por encima de este el volumen se hace mayor y muy por debajo se hace imposible de ver y de leer y lo que se buscaba era determinar la menor cantidad que la titulación por volumetría pudiera considerar inferior para una medida cuantitativa precisa.

6.6.9 CONCLUSIONES

- En la validación del nitrógeno total se utilizó el sistema semi-micro-kjeldahl aplicable a muestras con altas concentraciones de nitrógeno orgánico.
- Se utilizó un catalizador que no fuera tan tóxico y perjudicial para la validación como lo fue la mezcla de Selenio, Sulfato de Cobre y Sulfato de Potasio para la digestión Kjeldahl y acelerador en la reacción de Sulfato de Amonio.
- El proceso de validación para la determinación de nitrógeno total por el método Micro-Kjeldahl (Volumetría) fue de fácil ejecución dando óptimos resultados en cuanto a los parámetros de exactitud y precisión, que confirma la aplicabilidad del método en el **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** para la matriz agua.
- El límite de detección para la determinación de nitrógeno total método de Micro-Kjeldahl (Volumetría) es 3,33 mgN/L. Este límite es la concentración mínima que pudo ser medida con una exactitud aceptable.
- El límite de cuantificación que se determinó para el nitrógeno total fue de 6,44 mgN/L siendo esta la menor cantidad de analito que pudo determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas.

6.6.10 RECOMENDACIÓN

- En una determinación de Micro-Kjeldahl (Volumetría), la etapa que frecuentemente consume más tiempo es la descomposición. Por eso se recomienda adicionar una sal neutra, como sulfato de potasio para aumentar el punto de ebullición de la solución del ácido sulfúrico y, por tanto aumentar la temperatura para que se lleve a cabo la descomposición.

6.7 VALIDACIÓN DE TURBIEDAD MÉTODO TURBIDIMETRÍA-NEFELOMETRÍA

6.7.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, límite de detección y de cuantificación que servirán como criterios de confianza para la determinación de turbiedad por el método turbidimetría-nefelometría.

6.7.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

Las pruebas de Turbiedad Nefelométricas y pruebas químicas basadas en el análisis turbidimétrico pueden ejecutarse con este modelo. La Turbidimetría ha sido descrita en un gran número de artículos. Esencialmente es el efecto óptico que ocurre cuando la luz choca con sólidos en suspensión en un líquido y es usada para expresar lo turbio de ese líquido. La Nefelometría, generalmente es un método específico de medida de la turbiedad, derivada de la palabra Griega Turbio.

6.7.3 REACTIVOS

- Formazina a partir de 200NTU: 40; 20; 10 y 8 NTU.
- Agua destilada

6.7.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- Medidor de turbiedad con sus celdas para muestras y patrones (Turbidímetro ORBECO HELLIGE).
- Balones volumétricos
- Frasco lavador
- Pipetas volumétricas
- Vasos de precipitado 100 mL

6.7.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de aguas, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th Edition de 1995".

Los estándares son preparados con base al Formazín de 200 NTU, el cual dura mucho tiempo.

- **Estándares permanentes:** la Formazina Orbeco, dado con el equipo, viene en cinco viales de 40 mL cada uno y con una concentración de 200 NTU. Las diluciones de Formazina no son estables por mucho tiempo, sin embargo Orbeco ofrece un conjunto de tres estándares, los cuales tienen un tiempo de vida muy largo. Orbeco recomienda que se prepare 200 mL de Formazina fresca, a partir de la vendida por la firma que es de 200 FTU (R-3401P Perma-Pak) rotulando el recipiente y la fecha de su preparación.
- **Preparación de estándares:** preparar soluciones patrón de Formazina a partir de la de 200 NTU: 40; 20; 10 y 8 NTU.
Agua destilada
- **Usar los estándares permanentes:** estos estándares vienen con la tapa pintada con un color especial dependiendo de la concentración en NTU. Ellos son:
Color naranja: 000 – 999 NTU
Color rojo: 000 – 99,9 NTU
Color café: 000 – 9,99 NTU

Para usar los colores, asignar un valor de turbiedad a cada uno de ellos, como sigue:

- **Valor de turbiedad alto:** colocar el estándar color naranja y girar el selector a la posición 000 - 999, habiendo previamente colocado en cero el equipo. Llenar la celda con Formazina de 200 NTU, insertarla en el equipo y ajustar con el control a una lectura de 200.

Colocar ahora el estándar color naranja y registrar la lectura del valor a usar en el paso 4.

Asignar igualmente un valor medio a la solución intermedia (color rojo), usar una solución de Formazina de 40 NTU y registrarla para usarla en la etapa 4.

Asignar de igual manera un valor a la solución intermedia (color café), usar un estándar de Formazina de 8 NTU y registrar el valor para usarla en el paso 4.

Rotular, después que se le ha asignado un valor a cada estándar.

6.7.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de turbiedad por el método turbidimetría-nefelometría se siguió el procedimiento 2130 (A-B) descrito en el protocolo para análisis de aguas Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 19. El siguiente fue el grupo básico de muestras que se leyó durante 5 ensayos con su respectiva replica de los que consta el proceso de validación.

- **PT1:** Patrón para turbiedad (T-1), proveniente del **PICCAP** (Programa Interlaboratorios de Control de Calidad para Aguas Potables).
- **PT2:** Patrón para turbiedad (T-1), proveniente del **PICCAP** (Programa Interlaboratorios de Control de Calidad para Aguas Potables).

Al igual que se tomó una solución patrón de Formazina, de 4000 NTU a partir de la cuál se preparó el estándar de 100 NTU y de este se preparó el de 25 NTU, además se prepararon uno de 8,0 NTU y uno de 40 NTU, esto con el fin de tener un patrón de comparación para leer la respectiva turbiedad según como lo indica el equipo.

Las muestras se identificaron de la siguiente forma:

A partir de la de 25 NTU se prepararon las siguientes:

Eb: Estándar de turbiedad de concentración baja= 2,5 NTU

Emb: Estándar de turbiedad de concentración media baja = 5,0 NTU

A partir de la de 100 NTU se prepararon las siguientes:

Ema: Estándar de turbiedad de concentración media alta = 10 NTU

Ea: Estándar de turbiedad de concentración alta = 20 NTU

El proceso de validación se inició el día diez (10) de mayo a las 09 h: 15min, obteniendo los resultados que se reportan más adelante.

6.7.7 RESULTADOS

El cálculo de la determinación de turbiedad es expresado en unidades de NTU, el resultado es tomado directamente del aparato utilizado en el análisis correspondiente.

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos para muestras patrón provenientes del PICCAP.

	No. Ensayo	NTU	
		PT1	PT2
	1	11,00	8,92
		11,60	8,91
	2	12,20	10,00
		12,00	10,00
	3	13,00	10,20
		12,90	11,10
	4	12,70	10,10
		13,40	10,00
	5	13,30	10,20
		12,60	10,50
Promedio		12,47	9,99
Desviación estándar		0,77	0,66
Número de datos		10	10
Mínimo		11,00	8,91
Máximo		13,40	11,10
Intervalo		2,40	2,19
Tbajo		1,92	1,64
Talto		1,21	1,68
T teórico		2,18	2,18

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: Estos datos fueron sometidos bajo el criterio de rechazo de datos, dando como resultado todos los datos aceptados.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para n = 10, donde n es el número de muestras. El valor reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos para muestras patrón provenientes del PICCAP

	No. Ensayo	NTU	
		PT1	PT2
	1	11,00	8,92
		11,60	8,91
	2	12,20	10,00
		12,00	10,00
	3	13,00	10,20
		12,90	11,10
	4	12,70	10,10
		13,40	10,00
	5	13,30	10,20
		12,60	10,50
Promedio		12,47	9,99
Desviación estándar		0,77	0,66
%CV		6,15	6,60
%Error		0,91	0,22

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	UNIDADES DE NTU			
		Eb	Emb	Ema	Ea
	1	2,83	4,53	9,90	18,70
		2,86	5,21	10,20	17,40
	2	2,84	4,93	10,30	19,70
		2,86	5,19	10,30	19,30
	3	2,82	6,16	10,50	20,50
		2,63	4,87	9,10	16,50
	4	2,82	5,50	10,90	20,00
		2,75	4,54	8,00	16,00
	5	2,98	4,77	10,90	19,30
		2,04	4,01	7,00	13,20
Promedio		2,74	4,97	9,71	18,06
Desviación estándar		0,26	0,59	1,29	2,28
Número de datos		10	10	10	10
Mínimo		2,04	4,01	7,00	13,20
Máximo		2,98	6,16	10,90	20,50
Intervalo		0,94	2,15	3,90	7,30
Tbajo		2,68	1,62	2,09	2,14
Talto		0,90	2,01	0,92	1,07
T teórico		2,18	2,18	2,18	2,18

Tabla 3. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	UNIDADES DE NTU			
		Eb	Emb	Ema	Ea
		2,5	5,0	10	20
	1	2,83	4,53	9,90	18,70
		2,86	5,21	10,20	17,40
	2	2,84	4,93	10,30	19,70
		2,86	5,19	10,30	19,30
	3	2,82	6,16	10,50	20,50
		2,63	4,87	9,10	16,50
	4	2,82	5,50	10,90	20,00
		2,75	4,54	8,00	16,00
	5	2,98	4,77	10,90	19,30
		2,04	4,01	7,00	13,20
Promedio		2,74	4,97	9,71	18,06
Desviación estándar		0,26	0,59	1,29	2,28
%CV		9,56	11,91	13,33	12,60
%Error		9,72	0,60	2,90	9,70

Tabla 4. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:
CV: Coeficiente de Variación

➤ **Límite de detección y cuantificación**

En la siguiente tabla se muestran los valores de la respuesta del turbidímetro para la determinación de la turbiedad en función del límite de detección y de cuantificación:

CONCENTRACIONES ESTÁNDAR	UNIDADES NTU	T(°C)
2,0	1,40	0,08
	1,39	0,08
	1,40	0,08
	1,38	0,08
	1,39	0,08
	1,40	0,08
	1,40	0,08
	1,39	0,08
	1,38	0,08
	1,39	0,08
PROMEDIO	1,39	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,18	
LÍMITE DE DETECCIÓN	2,55	
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	3,83	

Tabla 5. Respuesta turbidímetro en función del límite de detección y de cuantificación.

Para hallar el dato de **1,39** NTU promedio se tomó directamente la lectura que registra el turbidímetro, determinando de esta manera también su temperatura sumergiendo el termómetro dentro de la solución de concentración estándar 2,0 NTU y de esta manera se calculó su límite de detección y de cuantificación.

6.7.8 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al observar los datos experimentales de turbiedad por el método turbidimetría-nefelometría se puede decir que:

➤ **Precisión**

El parámetro estadístico “precisión”, se define como el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a una alícuota de una muestra homogénea.

La precisión de turbiedad por el método turbidimetría-nefelometría se va a expresar en términos de desviación estándar y de coeficiente de variación de las muestras.

Para que el ensayo fuese más representativo se tomaron dos muestras patrón; las cuales fueron suministradas por el PICCAP (Programa de Interlaboratorios de Control de Calidad de Aguas Potables)), al igual que se tomo una solución patrón de Formazina, de 4000 NTU a partir de la cual se preparo el estándar de 100 NTU y de este se preparo el de 25 NTU, además se prepararon uno de 8,0 NTU y uno de 40 NTU, esto con el fin de tener un patrón de comparación para leer la respectiva turbiedad según como lo indica el equipo.

Las muestras patrón provenientes del PICCAP analizadas durante el proceso de validación dieron valores de 0,77 para el parámetro de la desviación estándar y de 6,15 para el coeficiente de variación en PT1: Patrón para turbiedad (Turbiedad 1-1.1), **lo que indica un grado de variación aceptable en los resultados obtenidos, esto se debe a factores que alteran de una manera u otra el análisis en especial la temperatura** y para PT2: Patrón para Turbiedad (Turbiedad 2-2.2), se obtuvo 0,66 para desviación estándar y 6,60 para coeficiente de variación, **implicándose de una manera u otra la temperatura.**

Para la solución turbia de 4000 NTU de la cual fueron preparadas los demás estándares los datos obtenidos fueron: para el **Eb** la desviación estándar 0,26 y de 9,56 para el coeficiente de variación; para el **Emb** la desviación estándar 0,59 y de 11,91 para el coeficiente de variación; para el **Ema** la desviación estándar 1,29 y de 13,33 para el coeficiente de variación ; para el **Ea** la desviación estándar 2,28 y de 12,60 para el coeficiente de variación, **esto significa que para cada uno de los estándares leídos se vio influenciada la temperatura, aunque esta no vario en el instante de la toma de datos, se vio más afectado por la parte del equipo que se demoro más para estabilizarse.**

➤ **Exactitud**

El parámetro estadístico “exactitud” está definido como la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos al valor verdadero. A diferencia de la precisión que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él.

Estos porcentajes de error 9,72; 0,60; 2,90 y 9,70 para las respectivas concentraciones estándar muestran que el método no posee una óptima exactitud, presentándose así la tendencia a estos errores sistemáticos o la tendencia a el; dando así paso a la mejoración y continuidad de la determinación de turbiedad por el método turbidimetría-nefelometría del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** en la matriz agua.

➤ **Límite de detección**

El límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que se puede leer de acuerdo a las concentraciones estándar que se escogieron para la validación, se tomó la menor y se leyó. Se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de turbiedad por el método turbidimetría-nefelometría, se estableció el límite de detección en 2,55 NTU, para una concentración de 2,0 NTU, dando la mínima lectura que puede reportar el equipo.

➤ Límite de cuantificación

El “límite de cuantificación” (o límite de determinación”), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleó para el límite de detección, solo que esta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración cuantificable del estándar

S_B : Desviación estándar

El límite de cuantificación se determinó para la validación de turbiedad método de turbiedad-nefelometría en 3,83 NTU, que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas. Lo que indica que el valor de 3,83 es lo que se puede cuantificar el método.

6.7.9 CONCLUSIONES

- El proceso de validación para la determinación de turbiedad por el método turbidimetría-nefelometría presentó alteración alguna en el ensayo en cuanto a los parámetros de exactitud y precisión lo que confirma la mejoración del método para el **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA.**
- La concentración de estos estándares se encuentra en un %error variado en la aplicación del método lo que indica que en los ensayos de análisis se presentó algún factor que implicó alteración en el proceso como la temperatura.

6.7.10 RECOMENDACIONES

- Los estándares a tratar en la determinación de turbiedad por el método turbidimetría-nefelometría, deben estar a una temperatura ambiente, pues este factor influye altamente en los resultados analíticos.
- Las diluciones de Formazina no son estables por mucho tiempo, por esto se deben preparar constantemente a partir de un determinado estándar con el fin de obtener buenos resultados.
- Encender el Turbidímetro unos diez (10) minutos antes de empezar hacer los respectivos análisis para que este se estabilice.
- Hacer el estándar cero con la solución negro y llevar con la clavija a cero y luego llevar la solución estándar con el botón estándar y leer las demás muestras.

6.8 VALIDACIÓN DE ALUMINIO MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA

6.8.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y análisis de varianza (ANOVA), que servirán como criterios de confianza para la determinación de aluminio por el método de absorción atómica con llama.

6.8.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

El aluminio es el tercer elemento más abundante de la corteza terrestre, encontrándose en minerales, rocas y arcillas. Esta amplia distribución cuenta por la presencia de aluminio cercanamente a toda el agua natural como una sal soluble, un coloide, o un compuesto insoluble.

El aluminio soluble, coloidal e insoluble también puede aparecer en aguas tratadas o residuales desde coagulación conteniendo material de aluminio. Agua filtrada con arena desde una moderna y rápida planta de filtración puede tener una concentración baja de aluminio de 50 µg/L. El Decreto 475 de 1998 del Ministerio de Salud "NORMAS TÉCNICAS DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE" da un valor admisible de 0,2 mg/L para aluminio en agua potable y de 2,0 mg/L para agua segura.

6.8.3 REACTIVOS

- Solución patrón de aluminio de 1000 µg/mL: preferiblemente un titrisol y/o fizanal con certificado de pureza de la firma fabricante.
- Soluciones estándares de 1,0; 2,5; 5,0 y 10 µg Al/mL.
- Ácido nítrico HNO_{3 conc} y Ácido perclórico HClO_{4 conc}.
- Agua destilada – desmineralizada.

6.8.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer modelo 2380
- Lámpara de cátodo hueco para aluminio (Al)

- Gases (acetileno-oxido nitroso grado absorción atómica) suministrado por Cryogas S.A.
- Balones aforados de 25, 50 y 100 mL marca Brand
- Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 25 mL marca Brand
- Vasos volumétricos de 100 mL marca Brand
- Probetas de 50 y 100 mL marca Brand
- Balones fondo redondo marca Brand.
- Filtros
- Embudos filtrantes

6.8.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de aguas, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th Edition de 1995".

Se deben de tener en cuenta las siguientes condiciones para el trabajo con el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 2380:

- El Mechero o quemador de 5 cm: debidamente alineado con el haz
- Longitud de onda: 309,2-309,3 nm
- Slit o rendija del monocromador: 0,7 nm
- Corriente de la lámpara : 26mA
- Voltaje del fototubo: 70-75 mV
- Relación de gases: oxido nitroso -acetileno (60 : 30)
- Serie de la lámpara de cátodo hueco y su respectiva marca: 364348 PERKIN ELMER
- Supresor de interferencia: El hierro y el HCl en concentraciones superiores a 0,2% decrecen la sensibilidad en la determinación del aluminio lo mismo que el H₂SO₄ dependiendo de la concentración de éste. Puede haber incremento en la sensibilidad del aluminio ante la presencia de Ti y ácido acético (CH₃COOH). **El aluminio sufre ionización** y ésta se puede controlar con la adición de una sal de un metal alcalino como el KCl O LaCl, tanto a las soluciones estándares como a las muestras (1000-2000 µg/mL). La sílice decrece débilmente la señal del aluminio siempre y cuando esta este como sílice coloidal. Al filtrar la muestra a través de un papel de filtro toda la sílice quedara retenida en esta, lo cual se eliminaría esta interferencia.

- Eliminar de la muestra, partículas flotantes grandes o aglomerados dispersos de material no homogéneo.
- Usar frascos de vidrio resistente o plástico, lavados con una solución de ácido nítrico (HNO₃) 1:1, en los que el material en suspensión no se adhiera a las paredes del recipiente.
- Filtrar inmediatamente para metales disueltos y añadir ácido nítrico (HNO₃) hasta pH < 2.
- Refrigerar la muestra a 4°C hasta el momento del análisis para minimizar la descomposición microbiológica de los sólidos. Antes de iniciar el análisis, llevar las muestras a temperatura ambiente.
- Alinear el haz emitido por la lámpara de cátodo hueco sobre el quemador o mechero.
- Considerar la respuesta de la lámpara de cátodo hueco, así como la corriente con respecto al voltaje del fototubo.
- Seleccionar la máxima longitud de onda con respecto al voltaje del fototubo.
- Aspiración correcta del capilar ubicado en la parte externa de la cámara de nebulización.
- Tipo de llama obtenida al mezclar los gases (Para el aluminio (Al) debe ser reductora: acetileno -oxido nitroso). **Llama obtenida roja.**
- Volumen mínimo de muestra por análisis de 500mL

6.8.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de aluminio se siguió el procedimiento 3500 (A-B) descrito en el protocolo para análisis de aguas Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 19. El siguiente fue el grupo básico de muestras que se leyó durante 5 ensayos con su respectiva réplica de los que consta el proceso de validación.

Bk: Blanco de agua

Eb: Estándar de aluminio de concentración baja = 1,0 mg Al/L

Emb: Estándar de aluminio de concentración media baja = 2,5 mg Al/L

Ema: Estándar de aluminio de concentración media alta = 5,0 mg Al/L

Ea: Estándar de aluminio de concentración alta = 10 mg Al/L

El proceso de validación se inició el día veintiuno (21) de marzo a las 11h: 25min, los estándares de concentración baja, media y alta se prepararon el primer día a partir de una solución patrón de 1000 ppm de aluminio.

6.8.7 RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la validación de aluminio método de absorción atómica con llama se muestra a continuación:

Cálculo para muestras líquidas (metal disuelto o soluble)

➤ Expresión matemática:

$$\mu\text{g/mL} = C_0 \frac{V_f}{V_0} \frac{V_1}{V_a}$$

Donde:

C_0 = Concentración en $\mu\text{g/mL}$ dado por la curva de calibración

V_0 = Volumen de muestra inicial, mL

V_f = Volumen de muestra final después de ser concentrada, mL

V_a = Volumen de alícuota tomada a partir de V_f , mL

V_1 = Volumen al cual se llevó la alícuota V_a , mL.

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	mg Al/L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	1	0,00	1,352	2,707	4,964	9,931
		0,00	1,042	2,814	5,029	9,903
	2	0,00	1,173	2,437	4,963	10,017
		0,00	1,236	2,511	4,634	10,156
	3	0,00	1,081	2,577	4,823	10,061
		0,00	1,007	2,689	5,215	9,844
	4	0,00	1,254	2,477	4,515	10,223
		0,00	1,236	2,511	4,634	10,156
	5	0,00	1,152	2,469	5,106	10,379
		0,00	1,173	2,437	4,963	10,017
Promedio		-	1,171	2,563	4,885	10,069
Desviación estándar		-	0,105	0,130	0,227	0,162
Número de datos		10	10	10	10	10
Mínimo		-	1,007	2,437	4,515	9,844
Máximo		-	1,352	2,814	5,215	10,379
Intervalo		-	0,345	0,377	0,700	0,535
Tbajo		-	1,551	0,965	1,628	1,383
Talto		-	1,720	1,925	1,456	1,910
T teórico		2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: La TABLA 1. Presenta los parámetros estadísticos de los resultados analíticos antes de aplicar el criterio de rechazo de datos, se eliminan los datos resaltados con negrilla.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para n=10, donde n es el número de muestras. El valor reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	mg Al/L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
mg Al/L teórico		0	1,0	2,5	5,0	10
	1	0,00		2,707	4,964	9,931
		0,00	1,042		5,029	9,903
	2	0,00	1,173	2,437	4,963	10,017
		0,00	1,236	2,511	4,634	10,156
	3	0,00	1,081	2,577	4,823	10,061
		0,00	1,007	2,689	5,215	9,844
	4	0,00	1,254	2,477	4,515	10,223
		0,00	1,236	2,511	4,634	10,156
	5	0,00	1,152	2,469	5,106	10,379
		0,00	1,173	2,437	4,963	10,017
Promedio		-	1,035	2,535	4,885	10,069
Desviación estándar		-	0,089	0,102	0,227	0,162
%CV		-	8,608	4,022	4,647	1,614
%Error		-	3,540	1,400	2,308	0,687

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

➤ **Respuesta del instrumento en función de la concentración de aluminio**

La tabla que se muestra a continuación, representa los datos obtenidos al realizar la curva de calibración del aluminio en un intervalo de concentración entre 0,0 y 10 mgAl /L.

Concentración mg/L	Abs	% T	log C	Abst	T	(ΔC/C)/ΔT ¹
0,0	0,00	100,00		0,00	1,00	
1,0	0,003	99,312	0,000	0,688	0,993	145,669
2,5	0,006	98,628	0,398	1,372	0,986	73,340
5,0	0,012	97,275	0,699	2,725	0,973	37,180
10	0,024	94,624	1,000	5,376	0,946	19,111

Tabla 3. Respuesta del Instrumento en Función de la concentración de Aluminio

¹ Error relativo considerado para 1% de error de transmitancia

Abs : Absorbancia
%T : Porcentaje de transmitancia
Log C : Logaritmo de la concentración
Abs. : Absortividad
T : Transmitancia

$$\%T = 10^{(2 - Abs)}$$

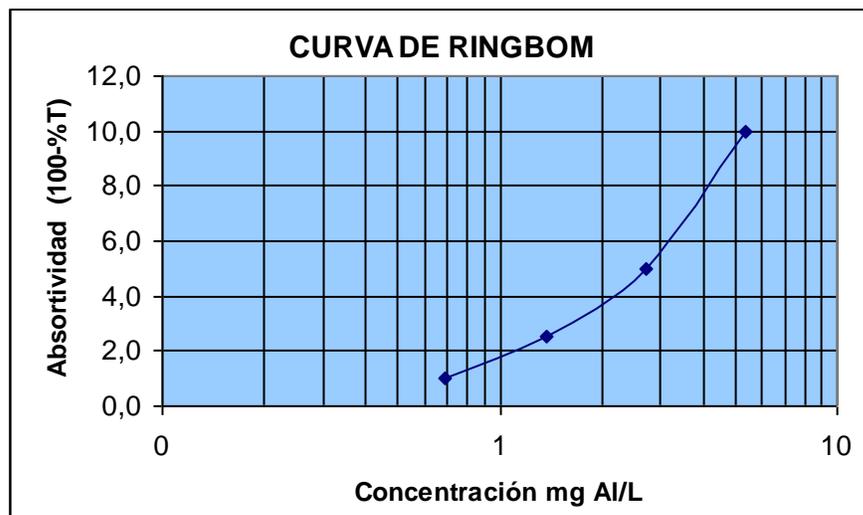
$$T = \%T/100$$

$$Abst = 100 - \%T$$

$$(\Delta C/C)/\Delta T = 0,434 / (T \log T)$$

➤ **Curva de Ringbom**

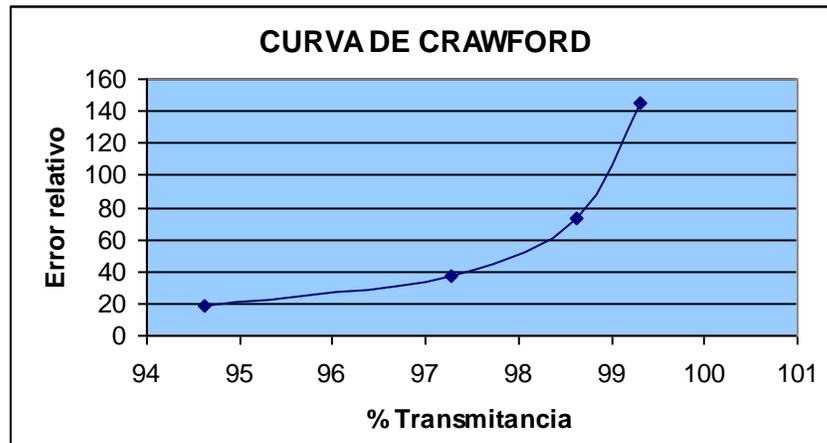
A partir de los datos de absorbancia en función de la concentración se construyó la curva de Ringbom:



Gráfica 1. Curva de Ringbom

La **Gráfica 1** muestra la absortividad o porcentaje de absorción en función de la concentración donde se obtiene una curva de forma sigmoideal llamada la curva de Ringbom, que es usada para definir el intervalo de concentración donde se cumple la ley de Beer. Esta ley dice que cuando un eje de radiación monocromático atraviesa una solución que contiene una especie absorbente, una parte de la radiación es absorbida en cuanto que la otra es transmitida por el medio.

➤ **Curva de Crawford**

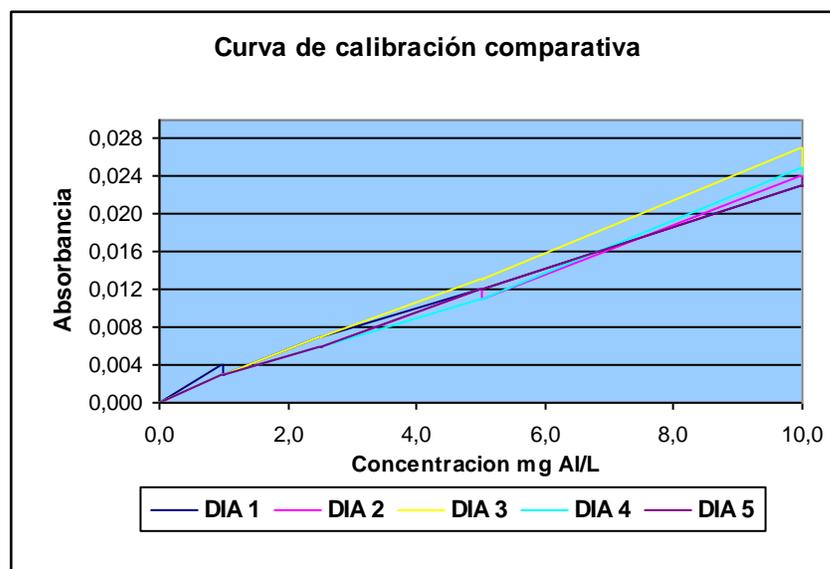


Gráfica 2. Curva de Crawford

La curva de Crawford permite el cálculo del intervalo de mínimo error relativo analítico en concentración, considerando un error de 1% en transmitancia.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Teniendo en cuenta la parte lineal de la curva de Ringbom se construyó la curva de calibración comparativa con un coeficiente de correlación promedio de 0,99805 y una pendiente promedio de 0,00237. Se reporta el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de validación y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.



Gráfica 3. Curva de calibración comparativa

Se puede observar las cinco (5) curvas de calibración, cada una de estas elaboradas en días diferentes.

Los coeficientes de correlación de cada una de las gráficas se puede observar en la siguiente tabla:

No. DE ENSAYO Y FECHA	COEFICIENTE DE CORRELACION (r)
No. 1 – 2006 – 03 – 21	0,99766
No. 2 – 2006 – 03 – 22	0,99891
No. 3 – 2006 – 03 – 23	0,99692
No. 4 – 2006 – 03 – 24	0,99749
No. 5 – 2006 – 03 – 25	0,99927

Tabla 4. Resumen de coeficientes de correlación

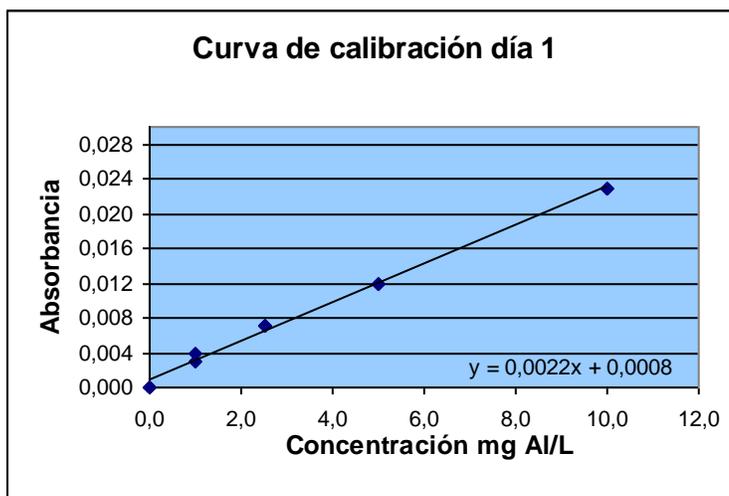
Se observa la concordancia entre cada uno mostrando tendencia al valor de 1 que corresponde a la pendiente de un ángulo de 45°.

➤ **Curvas de calibración por días**

Ensayo No. 1 / 2006 – 03 – 21

No. Ensayo	mg Al/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
1	0,00	0,004	0,007	0,012	0,023
	0,00	0,003	0,007	0,012	0,023
Pendiente	0,00224				
Intercepto	0,00083				
Correlación	0,99766				

Tabla 5. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 1

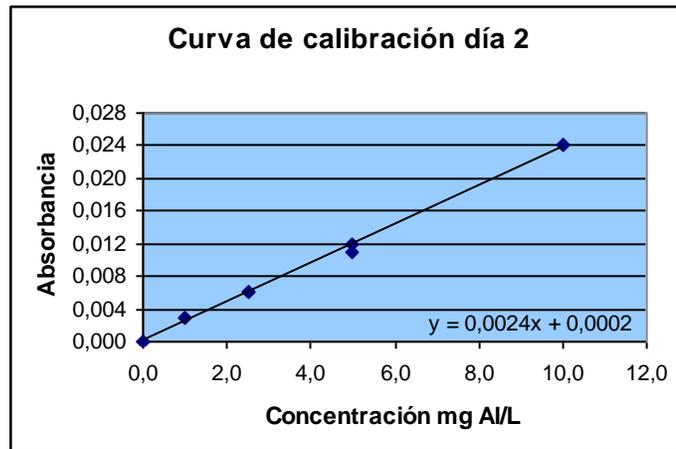


Gráfica 4. Curva de calibración día 1

Ensayo No. 2 / 2006 – 03 – 22

No. Ensayo	mg Al/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
2	0,00	0,003	0,006	0,012	0,024
	0,00	0,003	0,006	0,011	0,024
Pendiente	0,00236				
Intercepto	0,00015				
Correlación	0,99891				

Tabla 6. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 2

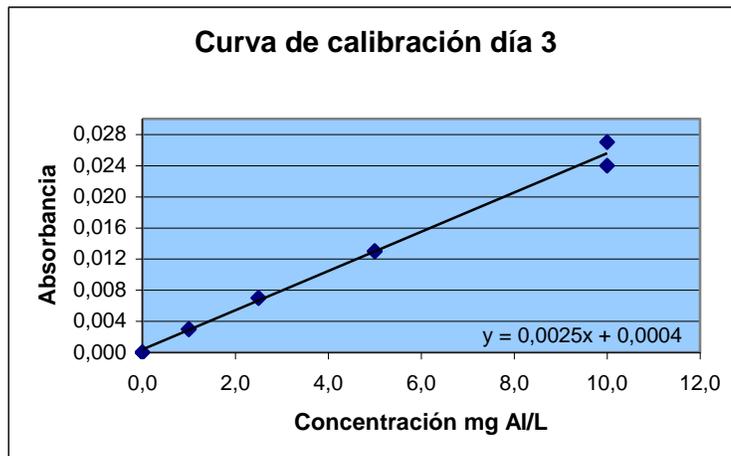


Gráfica 5. Curva de calibración día 2

Ensayo No. 3 / 2006 – 03 – 23

No. Ensayo	mg Al/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
3	0,00	0,003	0,007	0,013	0,027
	0,00	0,003	0,007	0,013	0,024
Pendiente	0,00252				
Intercepto	0,00036				
Correlación	0,99692				

Tabla 7. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 3

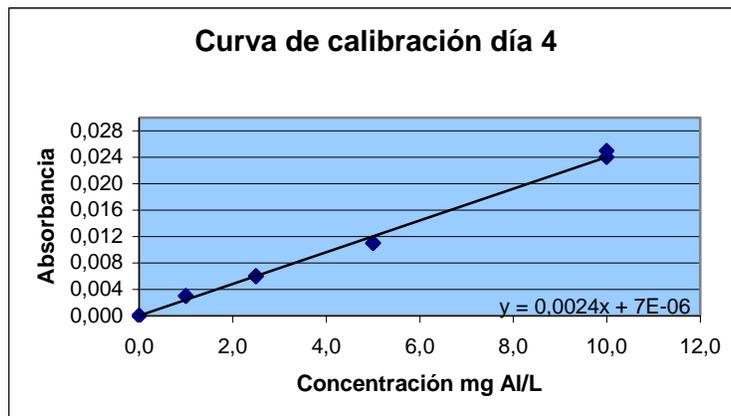


Gráfica 6. Curva de calibración día 3

Ensayo No. 4 / 2006 – 03 – 24

No.	mg Al/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	0,00	0,003	0,006	0,011	0,025
	0,00	0,003	0,006	0,011	0,024
Pendiente	0,00240				
Intercepto	0,00001				
Correlación	0,99749				

Tabla 8. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 4

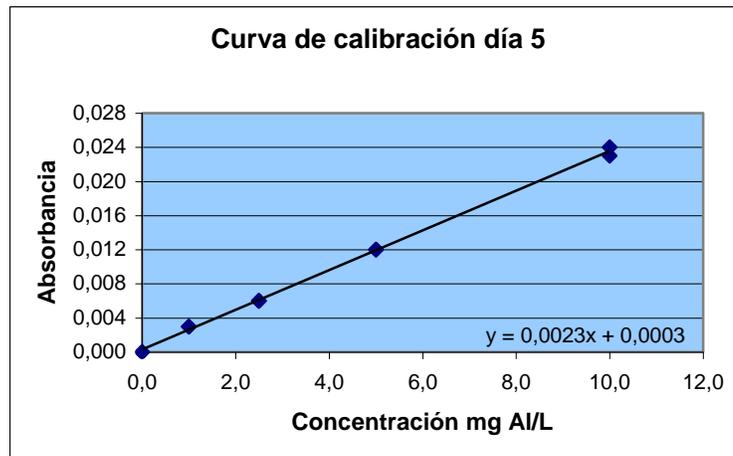


Gráfica 7. Curva de calibración día 4

Ensayo No. 5 / 2006 – 03 – 25

No.	mg Al/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	0,00	0,003	0,006	0,012	0,023
	0,00	0,003	0,006	0,012	0,024
Pendiente	0,00233				
Intercepto	0,00030				
Correlación	0,99927				

Tabla 9. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 5



Gráfica 8. Curva de calibración día 5

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad del método es la pendiente promedio de las curvas de calibración (curvas de trabajo). En este proceso el valor obtenido fue 0,00237 de sensibilidad de calibración lo que significa que este valor es el factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

Fecha	Pendiente	Coefficiente de correlación
01/09/2020	0,00224	0,99766
02/09/2020	0,00226	0,99904
03/09/2020	0,00252	0,99602
04/09/2020	0,00240	0,99740
05/09/2020	0,00222	0,99887
Promedio	0,00237	0,99805
Desviación estándar	0,00009	0,00100
Sensibilidad calibración	0,00237	

Tabla 10. Parámetros estadísticos de sensibilidad

➤ **Límite de detección y cuantificación**

En la siguiente tabla se muestran los valores de la respuesta del equipo de absorción atómica con llama para aluminio en función del límite de detección y de cuantificación:

CONCENTRACIONES ESTÁNDAR	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (concentración)	ABSORBANCIAS MEDIDAS*1000
1,0	0,97	2
	0,97	2
	0,97	2
	0,97	2
	0,97	2
	0,97	2
	0,97	2
	0,97	2
	0,97	2
	0,97	2
PROMEDIO	0,97	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,01	
LÍMITE DE DETECCIÓN	1,03	
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	1,09	

Tabla11. Respuesta equipo absorción para el aluminio en función del límite de detección y cuantificación.

Para hallar el promedio **0,97** se tomaron los resultados obtenidos en la lectura de absorbancia para la curva de calibración incluyendo 2 que fue el valor leído en el espectrofotómetro de absorción atómica con llama para una concentración estándar de 1,0 mg Al/L, obteniendo su límite de detección y de cuantificación.

➤ **Análisis de varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza se utilizó con el fin de separar y estimar las diferentes causas de variación. En éste proceso se emplearon los patrones de las curvas de calibración para determinar los parámetros de ANOVA así:

Concentraciones estándar	Absorbancias medidas *1000	Media
1,0	2,3,4	3
2,5	6,7,6	6
5,0	11,12,13	12
10	22,23,24	23
	Media global	11
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad
Entre muestras	$n \sum_i (X_i - \bar{X})^2 = 702$	$h - 1 = 3$
Dentro de muestras	$\sum_i \sum_j (X_{ij} - X_i)^2 = 8$	$h (n - 1) = 8$
Total	$\sum_i \sum_j (X_{ij} - \bar{X})^2 = 710$	$hn - 1 = 11$

ANOVA: de factor único

RESUMEN

Grupos	Frecuencia	Suma	Promedio	Varianza
1,0	3	9	3	1
2,5	3	18	6	1/2
5,0	3	45	15	1
10	3	84	28	1

ANOVA

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	F crit
Entre grupos	702	3	234	78	5,318
Dentro de grupos	8	8	1		
Total	710	11			

Tabla 12. Concentraciones estándar para el aluminio por absorción atómica con llama.

El valor crítico $F_{1, 8} = 5,318$ ($P=0,05$). Ya que el valor calculado es mayor que éste se rechaza la hipótesis nula: la media muestral difiere significativamente, es decir los valores tomados de 1 y 8 se determinaron de acuerdo al cuadrado medio (estimación dentro de muestras) y a los grados de libertad (estimación de cada muestra tiene 2 g.l y hay cuatro (4) muestras lo que me indica ocho (8)) y así se reporta este dato para un 95% de límite de confianza.

Donde:

h: promedio de varianzas muestrales

(n-1): varianza de cada muestra

SC: suma de cuadrados

gl : grados de libertad

CM: cuadrado medio

F: contraste (una o dos colas)

F crítico: valor del número de grados de libertad del denominador VS número de grados de libertad del numerador.

6.8.8 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al obtener los resultados experimentales en la validación del aluminio método de espectrofotometría de absorción atómica con llama no se evidenciaron errores sistemáticos, ni resultados erróneos; aunque hubo presencia de errores aleatorios, que es algo impredecible pues hay resultados que difieren uno del otro en el análisis. Dentro de los parámetros estadísticos calculados durante este proceso se analizó lo siguiente:

➤ Precisión

El parámetro estadístico “precisión”, definiéndolo como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por réplicas de una misma muestra, se expresa en términos de la desviación estándar o del coeficiente de variación para concentraciones de soluciones estándares preparadas menores a 10 mg Al/L está por debajo del 8%.

De acuerdo al intervalo de concentración que se tuvo en cuenta para el proceso de validación (1,0 – 10 mg Al/L) se observó que la precisión o reproducibilidad se afecta por los errores aleatorios que provoca de una manera u otra los resultados cambien, aunque sean pequeños.

El obtener un resultado por debajo del 3% indica que el grado de concordancia entre la muestra y su respectiva replica es buena, pues hay reproducibilidad en el ensayo, así la desviación estándar o su coeficiente de variación que en este caso fue: 0,089 para 1,0 mg Al/L; 0,102 para 2,5 mg Al/L; 0,227 para 5,0 mg Al/L y 0,162 para 10 mg Al/L, nos da el ejemplo de un error relativo que no es más que la comparación de la precisión de estos resultados obtenidos con la definición dada anteriormente.

➤ Exactitud

El parámetro estadístico “exactitud”, definido como el grado de aproximación entre el valor obtenido experimental y el valor real o aceptado; normalmente se expresa en términos de error, para concentraciones de soluciones estándares preparadas menores de 10 mg Al/L está en el rango de 0,687 y 3,540%.

Este porcentaje de error relativo tan bajo revela y confirma la buena exactitud de la técnica para la determinación de aluminio por el método de absorción atómica con llama.

Curva de calibración

➤ **Curva de Ringbom**

La curva de Ringbom obtenida (**GRÁFICO No.1**) muestra la tendencia sigmoideal aplicada a las cuatro (4) concentraciones estándar de 1,0; 2,5; 5,0 y 10 mg Al/L, principalmente en el intervalo de concentración de 5,0 a 10 mg Al/L en el que se cumple la ley de Beer, al no tener desvíos esto quiere decir que no se presentaron desvíos según la ley de Beer, los desvíos enunciados en dicha ley se deben a factores físicos, químicos e instrumentales, llegando a ocurrir el caso el más frecuente es el factor instrumental que es atribuido a la radiación policromática, selección inadecuada de la longitud de onda, fuente de radiación inestable, detectores deficientes y defectos en la parte óptica para la espectrofotometría de absorción atómica con llama, lo que significa que para el proceso de aluminio está dentro de las especificaciones requeridas.

➤ **Curva de Crawford**

La medida de la transmitancia está sujeta a una incerteza llamada error relativo de concentración.

El intervalo en que los resultados producen menor error relativo están entre 0,4 a 0,7 o del 20 al 60% de T (Transmitancia). Para la curva de Crawford obtenida no se aprecia muy bien pues su tendencia es en forma de U, que se debió a los pocos datos de concentración estándar de la muestra tomados para el proceso de validación.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Se puede notar que no hay una buena concordancia entre los cinco (5) días consecutivos, de la validación (**Gráfica No 3 y Tabla No 4**), que obedeció posiblemente a elementos que afectaron la sensibilidad como:

- Paso óptico (ajuste de la longitud de onda, lámpara, amplitud de abertura del diafragma).
- Llama (ajuste de nebulizador, de gases, de quemador rotacional, de profundidad del quemador).
- Absorbancia (velocidad de aspiración del material por la llama).

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad se calcula como el promedio de las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.

La sensibilidad resulta del promedio de la pendiente de la curva de calibración \pm desviación estándar ($0,00237 \pm 0,00009$). El valor a reportar es de 0,00237, lo que significa que este valor corresponde al factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

➤ Límite de detección

El límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que puede leer el espectrofotómetro Perkin Elmer 2380 de acuerdo con las concentraciones estándar que se escogieron para la validación, se tomó la menor y se leyó. Se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de aluminio por el método de absorción atómica con llama, utilizando el equipo del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** Perkin Elmer modelo 2380 con base a los patrones de la curva de calibración, se estableció el límite en 1,03 mg Al/L, para una concentración de 1,0 mg Al/L, obteniéndose una absorbancia de dos (2) en la lectura de las respectivas muestras para esta concentración; esto significa que es lo mínimo que puede leer el equipo a esta concentración para el aluminio.

➤ Límite de cuantificación

El “límite de cuantificación” (o límite de determinación), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleó para el límite de detección, solo que esta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración cuantificable del estándar

S_B : Desviación estándar

Se determinó para la validación del aluminio método de absorción atómica por llama el límite de cuantificación en 1,09 mg Al/L, para 1,0 mg Al/L lo que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, este valor obtenido nos indica que a esta concentración dada el equipo puede cuantificarlo, de ahí en adelante se hace más difícil apreciar y valorar este dato, pues de una manera u otra lo que se busca es minimizar los errores que el método presenta en cuanto a la precisión y la exactitud.

➤ Linealidad

Hace referencia a la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento. Para la determinación de la linealidad se necesitó de la tabla de valores de la distribución T para calcular LC 95%, después de haber calculado ANOVA para la variación dentro y entre muestras, reportándose 2,78 para $P = 0,05$.

Este valor se toma de acuerdo a los grados de libertad (n-1), es decir cuatro (4) concentraciones estándar tratadas en el proceso de validación, se determina según el contraste (una cola o dos colas), en este caso fue contraste de una cola, pues se utilizó un solo método absorción atómica con llama lo que significa que 2,78 es el dato que se reporta como lineal en la señal que muestra el instrumento para un 95% de confianza.

➤ **Análisis de varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza se define como una técnica estadística muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación.

La hipótesis nula se rechaza cuando la variación entre muestras es mayor que la variación dentro de las muestras.

Normalmente la hipótesis nula se rechaza cuando la probabilidad de que dicha diferencia observada ocurra por azar es menor que 1 en 20 veces (es decir, 0,05 ó 5%). En este caso se dice que la diferencia **es significativa al nivel 0,05 (ó 5%)**. Esto significa que se realiza con un límite de confianza del 95% que es con lo que se trabajo en el proceso de validación.

6.8.9 CONCLUSIONES

- La longitud de onda óptima para realizar la determinación de aluminio por el método espectrofotométrico de absorción atómica con llama es de 309,2-309,3 nm.
- Según la curva de Ringbom los datos óptimos, se encuentran en la sección recta correspondiente al ciclo logarítmico entre concentraciones de 5,0 y 10mg/L.
- La curva de calibración comparativa para concentraciones de 0,0 a 10 mg Al/L presenta un coeficiente de correlación de 0,99805 confirmando una buena relación entre la concentración y la absorbancia.
- El método presenta una sensibilidad de 0,00237 la cual corresponde a la pendiente de la curva de calibración que puede producir un resultado significativo.
- El límite de detección para la determinación de aluminio por el método de absorción atómica con llama es 1,03 mg Al/L. Este límite es la concentración mínima que pudo ser medida con una exactitud aceptable, para una concentración estándar de 1,0 mg Al/L.
- El límite de cuantificación que se determinó para el aluminio fue de 1,09 mg Al/L siendo esta la menor cantidad de analito que pudo determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, para una concentración estándar de 1,0 mg Al/L.

- La linealidad que registra el método en base de la tabla de límite de confianza para un 95% es 2,78 para $P=0,05$, con $n-1$ grados de libertad. Este dato se tomó como valor crítico de t para contraste de una cola, pues se empleó un solo método para llevar a cabo el proceso de validación y es el único dato que se reporta pues es específico para cuatro (4) muestras (concentraciones estándar).
- El análisis de varianza (ANOVA) para la determinación de aluminio por el método de absorción atómica con llama, bajo la hipótesis nula se estimó de dos formas: una la variación dentro de muestras y la otra la variación entre muestras obteniéndose lo siguiente: cuadrado medio dentro de las muestras = 1 con 8 g.l ; cuadrado medio entre muestras = 702 con 3 g.l con un valor de 5,318 para el contraste de una cola, lo que significa que la hipótesis nula se rechaza porque la variación entre muestras es mayor que la variación dentro de las muestras tomándose 1 con 8 g.l para la posible ubicación del dato a reportar, esto se hizo con el fin de separar y estimar las diferentes causas de variación que pueden conducir a diferencias significativas entre los valores medios obtenidos.

6.9 VALIDACIÓN DE CADMIO MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA

6.9.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y análisis de varianza (ANOVA), que servirán como criterios de confianza para la determinación de cadmio por el método de absorción atómica con llama.

6.9.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

El cadmio penetra en el medio ambiente a partir de una gran variedad de aplicaciones industriales, incluyendo operaciones de minería y fusión, electrodeposición y producción de baterías, pigmentos y plásticos. El cadmio aparece como impureza en el cinc y puede también penetrar en el grifo de los consumidores de agua por corrosión del tubo galvanizado.

El cadmio es altamente tóxico. El Decreto 475 de 1998 del Ministerio de Salud "NORMAS TÉCNICAS DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE" da un valor de 0,003 mg/L para cadmio en agua potable y de 0,005 mg/L para agua segura.

6.9.3 REACTIVOS

La concentración de ácido no es crítica en la concentración final en la muestra.

- **Solución patrón de cadmio de 1000 µg/mL:** preferiblemente un titrisol y/o fizanal con certificado de pureza de la firma fabricante.
- Soluciones estándares de 0,05; 0,1; 0,25 y 0,5 µg Cd/mL
- Ácido nítrico HNO_{3 conc} y Ácido perclórico HClO_{4 conc}.
- Agua destilada – desmineralizada

6.9.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer modelo 2380
- Lámpara de cátodo hueco para cadmio (Cd)
- Gases (Aire – acetileno) suministrado por Cryogas S.A.
- Balones aforados de 25, 50 y 100 mL marca Brand
- Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 25 mL marca Brand

- Vasos volumétricos de 100 mL marca Brand
- Probetas de 50 y 100 mL marca Brand
- Balones fondo redondo marca Brand.
- Filtros
- Embudos filtrantes

6.9.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de aguas, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th Edition de 1995".

Se deben de tener en cuenta las siguientes condiciones para el trabajo con el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 2380:

- El Mechero o quemador de 10 cm: debidamente alineado con el haz
- Longitud de onda: 228,7-228,8 nm
- Slit o rendija del monocromador: 0,7nm
- Corriente de la lámpara : 7 mA
- Voltaje del fototubo: 70-75 mV
- Relación de gases: aire-acetileno (30 : 20)
- Serie de la lámpara de cátodo hueco y su respectiva marca: 260933 PERKIN ELMER.
- Supresor de interferencia: no presenta interferencias.
- Eliminar de la muestra, partículas flotantes grandes o aglomerados dispersos de material no homogéneo.
- Usar frascos de vidrio resistente o plástico, lavados con una solución de ácido nítrico (HNO_3) 1:1, en los que el material en suspensión no se adhiera a las paredes del recipiente.
- Filtrar inmediatamente para metales disueltos y añadir ácido nítrico (HNO_3) hasta $\text{pH} < 2$.
- Refrigerar la muestra a 4°C hasta el momento del análisis para minimizar la descomposición microbiológica de los sólidos. Antes de iniciar el análisis, llevar las muestras a temperatura ambiente.
- Alinear el haz emitido por la lámpara de cátodo hueco sobre el quemador o mechero.

- Considerar la respuesta de la lámpara de cátodo hueco, así como la corriente con respecto al voltaje del fototubo.
- Seleccionar la máxima longitud de onda con respecto al voltaje del fototubo.
- Aspiración correcta del capilar ubicado en la parte externa de la cámara de nebulización.
- Tipo de llama obtenida al mezclar los gases (Para el cadmio (Cd) debe ser oxidante: aire-acetileno). **Llama obtenida azul.**
- Volumen mínimo de muestra por análisis de 500mL

6.9.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de cadmio se siguió el procedimiento 3500 (A-B) descrito en el protocolo para análisis de aguas Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 19. El siguiente fue el grupo básico de muestras que se leyó durante 5 ensayos con su respectiva réplica de los que consta el proceso de validación.

Bk: Blanco de agua

Eb: Estándar de cadmio de concentración baja = 0,05 mg Cd/L

Emb: Estándar de cadmio de concentración media baja = 0,1 mg Cd/L

Em: Estándar de cadmio de concentración media alta = 0,25 mg Cd /L

Ea: Estándar de cadmio de concentración alta = 0,5 mg Cd/L

El proceso de validación se inició el día veintiuno (21) de febrero a las 12h:05min, los estándares de concentración baja, media y alta se prepararon el primer día; a partir de una solución patrón de 1000 ppm de cadmio.

6.9.7 RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la validación de cadmio método de absorción atómica con llama se muestra a continuación:

Cálculo para muestras líquidas (metal disuelto o soluble)

- Expresión matemática:

$$\mu\text{g/mL} = C_0 \frac{V_f}{V_0} \frac{V_1}{V_a}$$

Donde:

C_0 = Concentración en $\mu\text{g/mL}$ dado por la curva de calibración

V_0 = Volumen de muestra inicial, mL

V_f = Volumen de muestra final después de ser concentrada, mL

V_a = Volumen de alícuota tomada a partir de V_f , mL

V_1 = Volumen al cual se llevó la alícuota V_a , mL.

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	mg Cd/L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	1	0,00	0,056	0,105	0,252	0,497
		0,00	0,056	0,105	0,252	0,497
	2	0,00	0,054	0,101	0,258	0,495
		0,00	0,055	0,106	0,258	0,495
	3	0,00	0,048	0,102	0,262	0,494
		0,00	0,051	0,109	0,246	0,499
	4	0,00	0,052	0,103	0,237	0,506
		0,00	0,047	0,102	0,269	0,490
	5	0,00	0,057	0,110	0,250	0,497
		0,00	0,061	0,097	0,260	0,495
Promedio		-	0,054	0,104	0,254	0,497
Desviación estándar		-	0,004	0,004	0,009	0,004
Número de datos		10	10	10	10	10
Mínimo		-	0,047	0,097	0,237	0,490
Máximo		-	0,061	0,110	0,269	0,506
Intervalo		-	0,014	0,013	0,032	0,016
Tbajo	-	-	1,569	1,814	1,929	1,579
Talto	-	-	1,710	1,555	1,618	2,308
T teórico		2,18 0	2,180	2,180	2,180	2,180

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: La **TABLA 1.** Presenta los parámetros estadísticos de los resultados analíticos antes de aplicar el criterio de rechazo de datos, se eliminan los datos resaltados con negrilla.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para n=10, donde n es el número de muestras. El valor reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	mg Cd/L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
mg Cd/L teórico		0	0,05	0,1	0,25	0,5
	1	0,00	0,056	0,105	0,252	0,497
		0,00	0,056	0,105	0,252	0,497
	2	0,00	0,054	0,101	0,258	0,495
		0,00	0,055	0,106	0,258	0,495
	3	0,00	0,048	0,102	0,262	0,494
		0,00	0,051	0,109	0,246	0,499
	4	0,00	0,052	0,103	0,237	0,506
		0,00	0,047	0,102	0,269	0,490
	5	0,00	0,057		0,250	0,497
		0,00		0,097	0,260	0,495
Promedio		-	0,048	0,103	0,254	0,497
Desviación estándar		-	0,004	0,003	0,009	0,004
%CV		-	7,607	3,317	3,546	0,822
%Error		-	4,800	3,333	1,760	0,660

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

➤ Respuesta del instrumento en función de la concentración de cadmio

La tabla que se muestra a continuación, representa los datos obtenidos al realizar la curva de calibración del cadmio en un intervalo de concentración entre 0,0 y 0,5Cd mg/L.

Concentración mg/L	Abs	% T	log C	Abs.	T	$(\Delta C/C)/\Delta T^1$
0,0	0,00	100,00		0,00	1,00	
0,05	0,004	99,083	- 1,301	0,917	0,991	109,504
0,10	0,006	98,628	- 1,000	1,372	0,986	73,340
0,25	0,015	96,605	- 0,602	3,395	0,966	29,950
0,5	0,028	93,756	- 0,301	6,244	0,938	16,532

Tabla 3. Respuesta del Instrumento en Función de la concentración del Cadmio

¹ Error relativo considerado para 1% de error de transmitancia

Abs : Absorbancia
%T : Porcentaje de transmitancia
Log C : Logaritmo de la concentración
Abs. : Absortividad
T : Transmitancia.

$$\%T = 10^{(2 - Abs)}$$

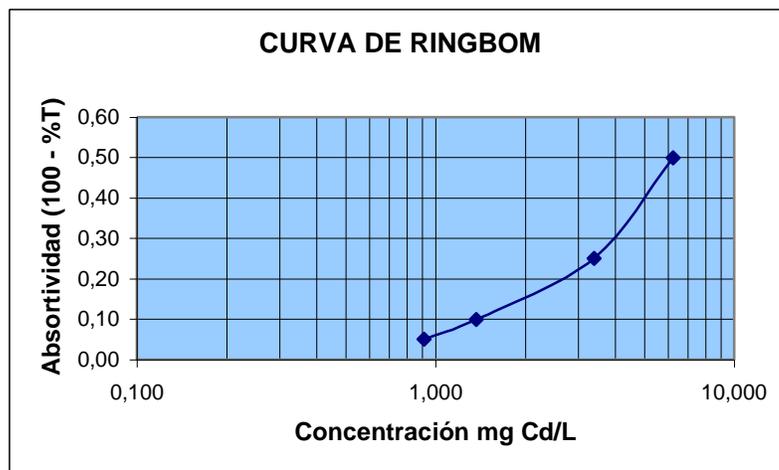
$$T = \%T/100$$

$$Abst = 100 - \%T$$

$$(\Delta C/C)/\Delta T = 0,434 / (T \log T)$$

➤ **Curva de Ringbom**

A partir de los datos de absorbancia en función de la concentración se construyó la curva de Ringbom:

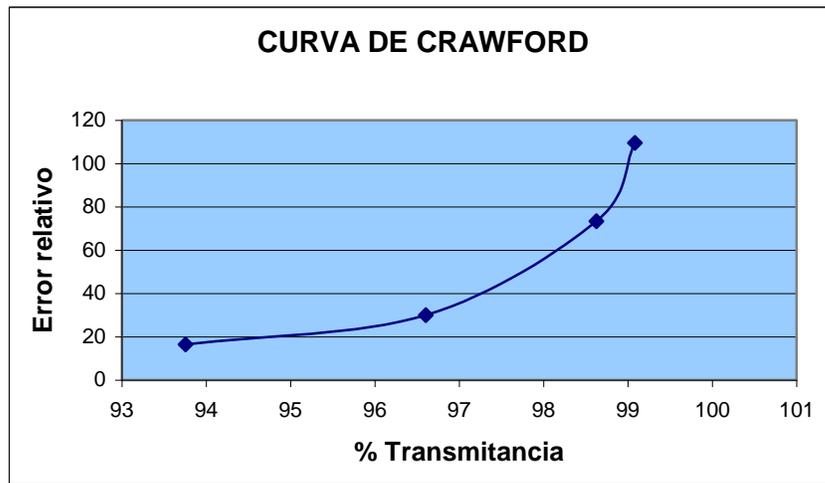


Gráfica 1. Curva de Ringbom

La **Gráfica 1** muestra la absortividad o porcentaje de absorción en función de la concentración donde se obtiene una curva de forma sigmoideal llamada la curva de Ringbom, que es usada para definir el intervalo de concentración donde se cumpla la ley de Beer.

La ley de Lambert Beer nos dice que cuando un eje de radiación monocromático atraviesa una solución que contiene una especie absorbente, una parte de la radiación es absorbida en cuanto que la otra es transmitida por el medio.

➤ **Curva de Crawford**

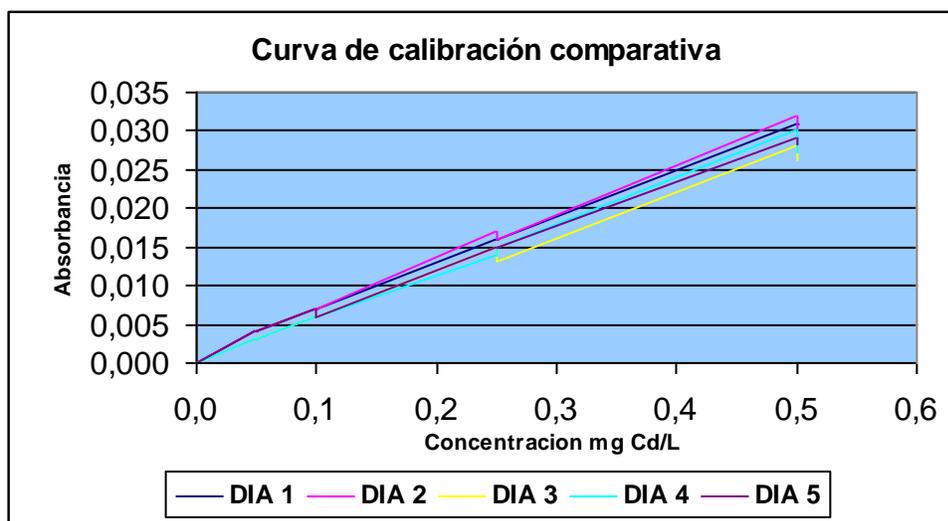


Gráfica 2. Curva de Crawford

La curva de Crawford permite el cálculo del intervalo de mínimo error relativo analítico en concentración, considerando un error de 1% en transmitancia.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Teniendo en cuenta la parte lineal de la curva de Ringbom se construyó la curva de calibración comparativa con un coeficiente de correlación promedio de 0,99830 y una pendiente promedio de 0,05779. Se reporta el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de validación y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.



Gráfica 3. Curva de calibración comparativa

Se puede observar las cinco (5) curvas de calibración, cada una de estas elaboradas en días diferentes.

Los coeficientes de correlación de cada una de las gráficas se puede observar en la siguiente tabla:

No. DE ENSAYO Y FECHA	COEFICIENTE DE CORRELACION (r)
No. 1 – 2006 – 02 – 21	0,99950
No. 2 – 2006 – 02 – 22	0,99824
No. 3 – 2006 – 02 – 23	0,99757
No. 4 – 2006 – 02 – 24	0,99757
No. 5 – 2006 – 02 – 25	0,99863

Tabla 4. Resumen de coeficientes de correlación

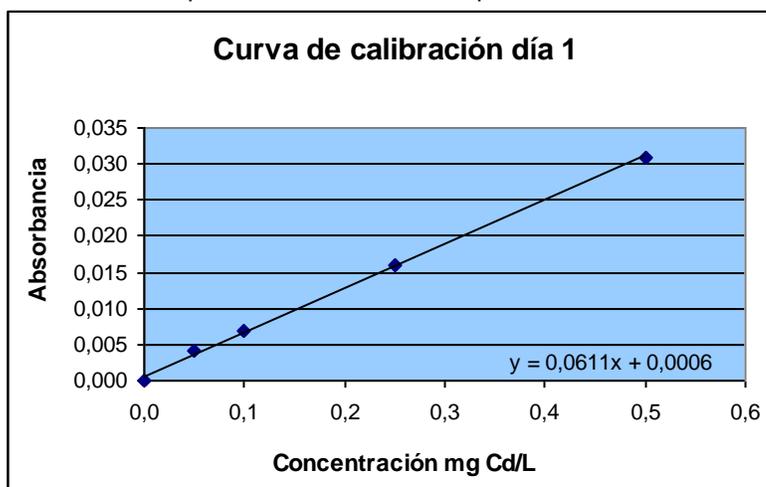
Se observa la concordancia entre cada uno mostrando tendencia al valor de 1 que corresponde a la pendiente de un ángulo de 45°.

➤ **Curvas de calibración por días**

Ensayo No. 1 / 2006 – 02 – 21

No.	mg Cd/L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
1	0,00	0,004	0,007	0,016	0,031
	0,00	0,004	0,007	0,016	0,031
Pendiente	0,06110				
Intercepto	0,00060				
Correlación	0,99950				

Tabla 5. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 1

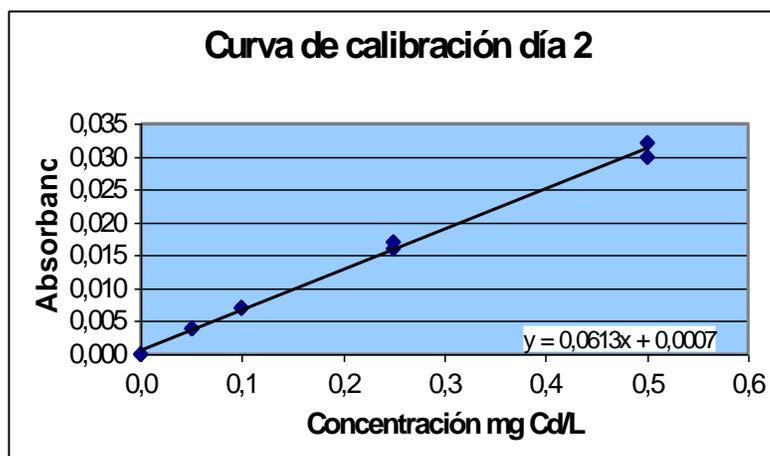


Gráfica 4. Curva de calibración día 1

Ensayo No. 2 / 2006 – 02 – 22

No.	mg Cd/L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
2	0,00	0,004	0,007	0,016	0,032
	0,00	0,004	0,007	0,016	0,030
Pendiente	0,06132				
Intercepto	0,00066				
Correlación	0,99824				

Tabla 6. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 2

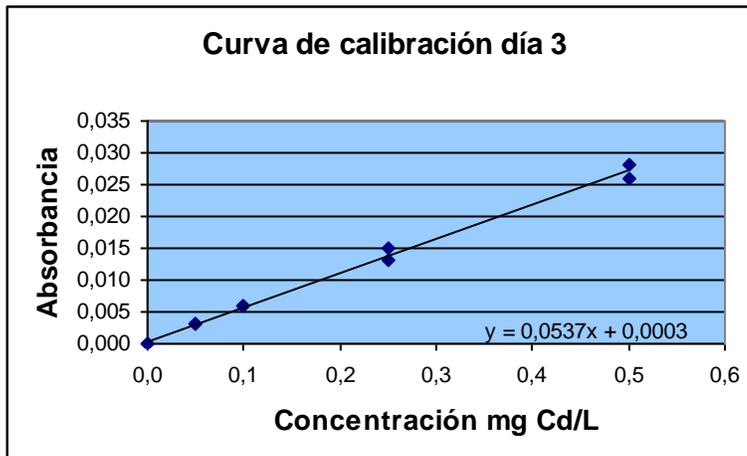


Gráfica 5. Curva de calibración día 2

Ensayo No. 3 / 2006 – 02 – 23

No.	mg Cd/L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
3	0,00	0,003	0,006	0,015	0,028
	0,00	0,003	0,006	0,013	0,026
Pendiente	0,05368				
Intercepto	0,00034				
Correlación	0,99757				

Tabla 7. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 3

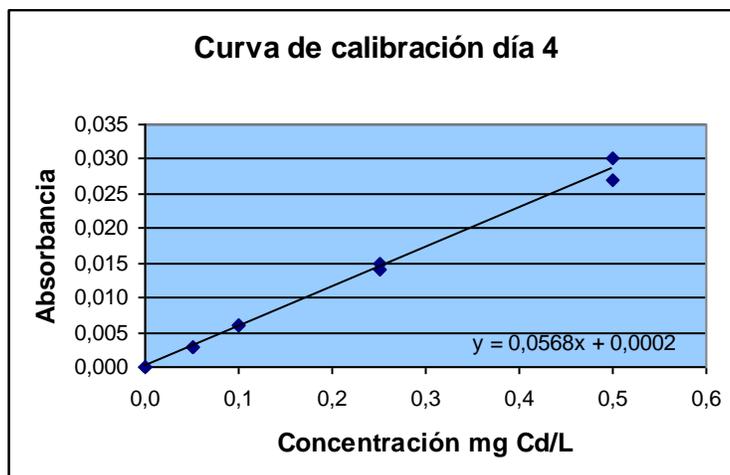


Gráfica 6. Curva de calibración día 3

Ensayo No. 4 / 2006 – 02 – 24

No.	mg Cd/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	0,00	0,003	0,006	0,014	0,030
	0,00	0,003	0,006	0,015	0,027
Pendiente		0,05684			
Intercepto		0,00017			
Correlación		0,99757			

Tabla 8. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 4

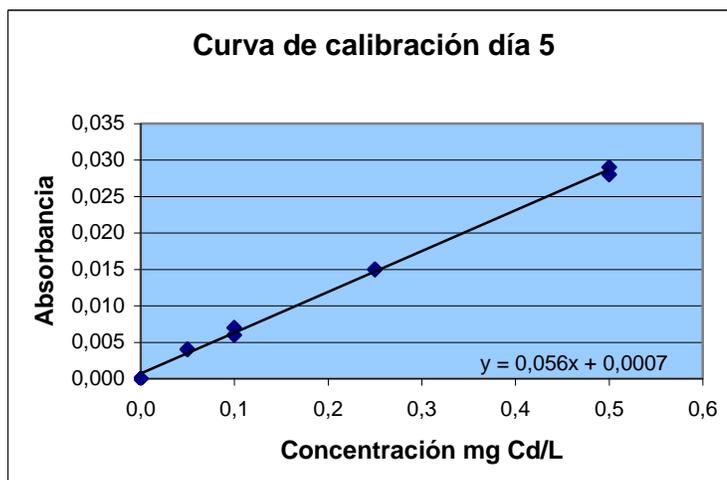


Gráfica 7. Curva de calibración día 4

Ensayo N° 5 / 2006 – 02 – 25

No.	mg Cd/L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
5	0,00	0,004	0,007	0,015	0,029
	0,00	0,004	0,006	0,015	0,028
Pendiente		0,05601			
Intercepto		0,00072			
Correlación		0,99863			

Tabla 9. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 5



Gráfica 8. Curva de calibración día 5

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad del método es la pendiente promedio de las curvas de calibración (curvas de trabajo). En este proceso el valor obtenido fué 0,00237 de sensibilidad de calibración lo que significa que este valor es el factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

Fecha	Pendiente	Coefficiente de correlación
21/02/2006	0,06110	0,99950
22/02/2006	0,06132	0,99824
23/02/2006	0,05368	0,99757
24/02/2006	0,05684	0,99757
25/02/2006	0,05601	0,99863
Promedio	0,05779	0,99830
Desviación estándar	0,00298	0,00081
Sensibilidad calibración	0,05779	

Tabla 10. Parámetros estadísticos de sensibilidad

➤ **Límite de detección y cuantificación**

En la siguiente tabla se muestran los valores de la respuesta del equipo de absorción atómica con llama para cadmio en función del límite de detección y de cuantificación:

CONCENTRACIONES ESTÁNDAR	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (concentración)	ABSORBANCIAS MEDIDAS*1000
0,025	0,001	1
	0,001	1
	0,001	1
	0,001	1
	0,001	1
	0,001	1
	0,001	1
	0,001	1
	0,001	1
PROMEDIO	0,001	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,007	
LÍMITE DE DETECCIÓN	0,047	
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	0,099	

Tabla 11. Respuesta equipo absorción para el cadmio en función del límite de detección y cuantificación

Para hallar el dato de **0,001** se tomaron los resultados obtenidos en la lectura de absorbancia para la curva de calibración incluyendo 1 que fue el valor leído en el espectrofotómetro de absorción atómica con llama para una concentración estándar de 0,025 mgCd/L, obteniendo su límite de detección y de cuantificación.

➤ **Análisis de varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza se utilizó con el fin de separar y estimar las diferentes causas de variación. En éste proceso se emplearon los patrones de las curvas de calibración para determinar los parámetros de ANOVA así:

Concentraciones estándar	Absorbancias medidas *	Media
	1000	
0,05	2,3,4	3
0,1	6,7,6	6
0,25	14,15,16	15
0,5	27,28,29	28
	Media global	13,0

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad
Entre muestras	$n \sum (X_i - \bar{X})^2 = 1134$	$h - 1 = 3$
Dentro de muestras	$\sum \sum (X_{ij} - \bar{X}_i)^2 = 8$	$h (n - 1) = 8$
Total	$\sum \sum (X_{ij} - \bar{X})^2 = 1142$	$hn - 1 = 11$

ANOVA: de un factor

RESUMEN

Grupos	Frecuencia	Suma	Promedio	Varianza
0,05	3	9	3	1
0,1	3	18	6	1/2
0,25	3	45	15	1
0,5	3	84	28	1

ANOVA

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	F crit
Entre grupos	1134	3	378	126	5,318
Dentro de grupos	8	8	1		
Total	1142	11			

Tabla 12. Concentraciones estándar para el cadmio por absorción atómica con llama.

El valor crítico $F_{1, 8} = 5,318$ ($P=0,05$). Ya que el valor calculado es mayor que éste se rechaza la hipótesis nula: la media muestral difiere significativamente, es decir los valores tomados de 1 y 8 se determinaron de acuerdo al cuadrado medio (estimación dentro de muestras) y a los grados de libertad (estimación de cada muestra tiene 2 g.l y hay cuatro (4) muestras lo que me indica ocho (8)) y así se reporta este dato para un 95% de límite de confianza.

Donde:

h: promedio de varianzas muestrales

(n-1): varianza de cada muestra

SC: suma de cuadrados

gl : grados de libertad

CM: cuadrado medio

F: contraste (una o dos colas)

F crítico: valor del número de grados de libertad del denominador VS número de grados de libertad del numerador.

6.9.8 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al obtener los resultados experimentales en la validación del cadmio método de espectrofotometría de absorción atómica con llama no se evidenciaron errores sistemáticos, ni resultados erróneos; aunque hubo presencia de errores aleatorios, que es algo impredecible pues hay resultados que difieren uno del otro en el análisis. Dentro de los parámetros estadísticos calculados durante este proceso se analizó lo siguiente:

➤ Precisión

El parámetro estadístico “precisión”, definiéndolo como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por replicas de una misma muestra, se expresa en términos de la desviación estándar o del coeficiente de variación para concentraciones de soluciones estándares preparadas menores de 0,5 mg Cd/L está por debajo del 7%.

De acuerdo al intervalo de concentración que se tuvo en cuenta para el proceso de validación (0,05 – 0,5 mg Cd/L) se pudo observar que la precisión o reproducibilidad se afecta por los errores aleatorios que provoca de una manera u otra los resultados cambien, aunque sean pequeños.

El obtener un resultado por debajo del 4% indica que el grado de concordancia entre la muestra y su respectiva replica es buena, pues hay reproducibilidad en el ensayo, así la desviación estándar o su coeficiente de variación que en este caso fue: 0,004 para 0,05 mg Cd/L; 0,003 para 0,10 mg Cd/L; 0,009 para 0,25 mg Cd/L y 0,004 para 0,5 mg Cd/L, nos da el ejemplo de un error relativo que no es más que la comparación de la precisión de estos resultados obtenidos con la definición dada anteriormente.

➤ Exactitud

Respecto al parámetro estadístico de “exactitud”, definiéndolo como el grado de aproximación entre el valor obtenido experimental y el valor real o aceptado; se expresa en términos de porcentaje de error relativo, para los estándares de concentraciones menores de 0,5 mg Cd/L utilizadas en este proceso de validación se puede decir que este porcentaje de error esta en el rango de 0,660 y 4,800%.

Este porcentaje de error relativo tan bajo revela y confirma la buena exactitud de la técnica para la determinación de cadmio por el método de absorción atómica con llama.

Curva de calibración

➤ Curva de Ringbom

La curva de Ringbom obtenida (**GRÁFICO No.1**) muestra la tendencia sigmoideal aplicada a las cuatro (4) concentraciones estándar de 0,05; 0,10; 0,25 y 0,5 mg Cd/L, principalmente en el intervalo de concentración de 0,25 a 0,5 mg Cd/L en el que se cumple la ley de Beer, al no tener desvíos esto quiere decir que no se presentaron desvíos según la ley de Beer, los desvíos enunciados en dicha ley se deben a factores físicos, químicos e instrumentales, llegando a ocurrir el caso el más frecuente es el factor instrumental que es atribuido a la radiación policromática, selección inadecuada de la longitud de onda, fuente de radiación inestable, detectores deficientes y defectos en la parte óptica para la espectrofotometría de absorción atómica con llama, lo que significa que para el proceso de cadmio está dentro de las especificaciones requeridas.

➤ **Curva de Crawford**

La medida de la transmitancia esta sujeta a una incerteza llamada error relativo de concentración.

El intervalo en que los resultados producen menor error relativo están entre 0,4 a 0,7 o del 20 al 60% de T (Transmitancia). Para la curva de Crawford obtenida no se aprecia muy bien pues su tendencia es en forma de U, que se debió a los pocos datos de concentración estándar de la muestra tomados para el proceso de validación.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Se puede notar que no hay una buena concordancia entre los cinco (5) días consecutivos, de la validación (**Gráfica No 3 y Tabla No 4**), que obedeció posiblemente a elementos que afectaron la sensibilidad como:

- Paso óptico (ajuste de la longitud de onda, lámpara, amplitud de abertura del diafragma).
- Llama (ajuste de nebulizador, de gases, de quemador rotacional, de profundidad del quemador).
- Absorbancia (velocidad de aspiración del material por la llama).

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad se calcula como el promedio de las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.

La sensibilidad resulta del promedio de la pendiente de la curva de calibración \pm desviación estándar ($0,05779 \pm 0,00298$). El valor a reportar es de 0,05779, lo que significa que este valor corresponde al factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

➤ **Límite de detección**

El límite de detección (LOD) de una analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del "blanco" o "ruido de fondo". En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que puede leer el espectrofotómetro Perkin Elmer 2380 de acuerdo con las concentraciones estándar que

se escogieron para la validación, se tomo la menor y se leyó. Se determino de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de cadmio por el método de absorción atómica con llama, utilizando el equipo del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** Perkin Elmer modelo 2380 con base a los patrones de la curva de calibración, se estableció el límite en 0,047 mg Cd/L, para una concentración de 0,025 mgCd/L, obteniéndose una absorbancia de uno (1) en la lectura de las respectivas muestras para esta concentración; esto significa que es lo mínimo que puede leer el equipo a esta concentración para el cadmio.

➤ Límite de cuantificación

El “límite de cuantificación” (o límite de determinación”), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleo para el límite de detección, solo que esta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración cuantificable del estándar

S_B : Desviación estándar

Se determinó para la validación del cadmio método de absorción atómica por llama el límite de cuantificación en 0,099 mg Cd/L, para 0,025 mg Cd/L lo que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, este valor obtenido nos indica que a esta concentración dada el equipo lo puede cuantificar, de ahí en adelante se hace más difícil apreciar y valorar este dato, pues de una manera u otra lo que se busca es minimizar los errores que el método presente en cuanto a la precisión y la exactitud.

➤ Linealidad

Hace referencia a la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento. Para la determinación de la linealidad se necesito de la tabla de valores de la distribución T para calcular LC 95%, después de haber calculado ANOVA para la variación dentro y entre muestras, reportándose 2,78 para P= 0,05.

Este valor se toma de acuerdo a los grados de libertad (n-1), es decir cuatro (4) concentraciones estándar tratadas en el proceso de validación, se determina según el contraste (una cola o dos colas), en este caso fue contraste de una cola, pues se utilizo

un solo método absorción atómica con llama lo que significa que 2,78 es el dato que se reporta como lineal en la señal que muestra el instrumento para un 95% de confianza.

➤ **Análisis de varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza se define como una técnica estadística muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación.

La hipótesis nula se rechaza cuando la variación entre muestras es mayor que la variación dentro de las muestras.

Normalmente la hipótesis nula se rechaza cuando la probabilidad de que dicha diferencia observada ocurra por azar es menor que 1 en 20 veces (es decir, 0,05 ó 5%). En este caso se dice que la diferencia **es significativa al nivel 0,05 (ó 5%)**. Esto significa que se realiza con un límite de confianza del 95% que es con lo que se trabajo en el proceso de validación.

6.9.9 CONCLUSIONES

- La longitud de onda óptima para realizar la determinación de cadmio por el método espectrofotométrico de absorción atómica con llama es de 228,7-228,8 nm.
- Según la curva de Ringbom los datos óptimos, se encuentran en la sección recta correspondiente al ciclo logarítmico entre concentraciones de 0,25 y 0,5mg/L.
- La curva de calibración comparativa para concentraciones de 0,05 a 0,5 mg Cd/L presenta un coeficiente de correlación de 0,99830 confirmando una buena relación entre la concentración y la absorbancia.
- El método presenta una sensibilidad de 0,05779, la cual corresponde a la pendiente de la curva de calibración que puede producir un resultado significativo.
- El límite de detección para la determinación de cadmio por el método de absorción atómica con llama es 0,047 mg Cd/L. Este límite es la concentración mínima que pudo ser medida con una exactitud aceptable, para una concentración estándar de 0,025 mg Cd/L.
- El límite de cuantificación que se determinó para el cadmio fue de 0,099 mg Cd/L siendo esta la menor cantidad de analito que pudo determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, para una concentración estándar de 0,025 mg Cd/L.
- La linealidad que registra el método en base de la tabla de limite de confianza para un 95% es 2,78 para $P=0,05$, con $n-1$ grados de libertad. Este dato se tomo como valor crítico de t para contraste de una cola, pues se empleo un solo método para llevar a cabo el proceso de validación y es el único dato que se reporta pues es específico para cuatro (4) muestras (concentraciones estándar).
- El análisis de varianza (ANOVA) para la determinación de cadmio por el método de absorción atómica con llama, bajo la hipótesis nula se estimo de dos formas: una la variación dentro de muestras y la otra la variación entre muestras obteniéndose lo siguiente: cuadrado medio dentro de las muestras = 1 con 8 g.l ; cuadrado medio entre muestras = 378 con 3 g.l con un valor de 5,318 para el

contraste de una cola, lo que significa que la hipótesis nula se rechaza porque la variación entre muestras es mayor que la variación dentro de las muestras tomándose 1 con 8 g.l para la posible ubicación del dato a reportar, esto se hizo con el fin de separar y estimar las diferentes causas de variación que pueden conducir a diferencias significativas entre los valores medios obtenidos.

6.10 VALIDACIÓN DE COBRE MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA

6.10.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y análisis de varianza (ANOVA), que servirán como criterios de confianza para la determinación de cobre por el método de absorción atómica con llama.

6.10.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

El cobre se encuentra normalmente en el agua potable. En bajos niveles (generalmente por debajo de 20 µg/L), puede derivar del desgaste de las rocas y alguna contaminación industrial que se produzca, pero las principales fuentes en los suministros de agua son la corrosión de las tuberías de cobre y bronce de los accesorios y de la adición de sales de cobre durante el tratamiento de agua para el control de las algas. El Decreto 475 de 1998 del Ministerio de Salud “NORMAS TÉCNICAS DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE” da un valor de 1,0 mg/L para cobre en agua potable y de 1,0 mg/L para agua segura.

6.10.3 REACTIVOS

La concentración de ácido no es crítica en la concentración final en la muestra:

- **Solución patrón de cobre de 1000 µg/mL:** preferiblemente un titrisol y/o fizanal con certificado de pureza de la firma fabricante.
- Soluciones estándares de 0,25; 0,5; 1,0 y 2,5 µg Cu/mL.
- Ácido nítrico HNO_{3 conc} y Ácido perclórico HClO_{4 conc}.
- Agua destilada – desmineralizada

6.10.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer modelo 2380
- Lámpara de cátodo hueco para cobre (Cu)
- Gases (aire-acetileno grado absorción atómica) suministrado por Cryogas S.A.
- Balones aforados de 25, 50 y 100 mL marca Brand.

- Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 25 mL marca Brand
- Vasos volumétricos de 100 mL marca Brand
- Probetas de 50 y 100 mL marca Brand
- Balones fondo redondo marca Brand
- Filtros
- Embudos filtrantes

6.10.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de aguas, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th Edition de 1995".

Se deben de tener en cuenta las siguientes condiciones para el trabajo con el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 2380:

- El Mechero o quemador de 10 cm: debidamente alineado con el haz
- Longitud de onda: 324,8 nm
- Slit o rendija del monocromador: 0,7 nm
- Corriente de la lámpara : 25 mA
- Voltaje del fototubo: 70-75 mV
- Relación de gases: aire-acetileno (30 : 20)
- Serie de la lámpara de cátodo hueco y su respectiva marca: 435620 PERKIN ELMER
- Supresor de interferencia: no presenta interferencias.
- Eliminar de la muestra, partículas flotantes grandes o aglomerados dispersos de material no homogéneo.
- Usar frascos de vidrio resistente o plástico, lavados con una solución de ácido nítrico (HNO_3) 1:1, en los que el material en suspensión no se adhiera a las paredes del recipiente.
- Filtrar inmediatamente para metales disueltos y añadir ácido nítrico (HNO_3) hasta $\text{pH} < 2$.
- Refrigerar la muestra a 4°C hasta el momento del análisis para minimizar la descomposición microbiológica de los sólidos. Antes de iniciar el análisis, llevar las muestras a temperatura ambiente.

- Alinear el haz emitido por la lámpara de cátodo hueco sobre el quemador o mechero.
- Considerar la respuesta de la lámpara de cátodo hueco, así como la corriente con respecto al voltaje del fototubo.

- Seleccionar la máxima longitud de onda con respecto al voltaje del fototubo.
- Aspiración correcta del capilar ubicado en la parte externa de la cámara de nebulización.
- Tipo de llama obtenida al mezclar los gases (Para el cobre (Cu) debe ser oxidante: aire-acetileno). **Llama obtenida azul.**
- Volumen mínimo de muestra por análisis de 500mL

6.10.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de cobre se siguió el procedimiento 3500 (A-B) descrito en el protocolo para análisis de aguas Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 19. El siguiente fue el grupo básico de muestras que se leyó durante 5 ensayos con su respectiva réplica de los que consta el proceso de validación.

Bk: Blanco de agua

Eb: Estándar de cobre de concentración baja = 0,25 mg Cu/L

Emb: Estándar de cobre de concentración media baja = 0,5 mg Cu/L

Ema: Estándar de cobre de concentración media alta = 1,0 mg Cu/L

Ea: Estándar de cobre de concentración alta = 2,5 mg Cu/L

El proceso de validación se inició el día veintisiete (27) de febrero a las 14 h: 50min, los estándares de concentración baja, media y alta se prepararon el primer día; a partir de una solución patrón de 1000 ppm de cobre.

6.10.7 RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la validación de cobre método de absorción atómica con llama se muestra a continuación:

Cálculo para muestras líquidas (metal disuelto o soluble)

- Expresión matemática:

$$\mu\text{g/mL} = C_0 \frac{V_f}{V_0} \frac{V_1}{V_a}$$

Donde:

C_0 = Concentración en $\mu\text{g/mL}$ dado por la curva de calibración

V_0 = Volumen de muestra inicial, mL

V_f = Volumen de muestra final después de ser concentrada, mL

V_a = Volumen de alícuota tomada a partir de V_f , mL

V_1 = Volumen al cual se llevó la alícuota V_a , mL.

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	mg Cu/L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	1	0,00	0,215	0,551	0,999	2,494
		0,00	0,251	0,513	0,999	2,497
	2	0,00	0,252	0,527	0,999	2,494
		0,00	0,241	0,514	0,983	2,505
	3	0,00	0,266	0,519	0,987	2,499
		0,00	0,239	0,555	1,011	2,485
	4	0,00	0,229	0,558	0,996	2,492
		0,00	0,229	0,558	0,996	2,492
	5	0,00	0,248	0,528	1,018	2,452
		0,00	0,257	0,546	0,980	2,498
Promedio		-	0,243	0,537	0,997	2,491
Desviación estándar		-	0,015	0,019	0,012	0,015
Número de datos		10	10	10	10	10
Mínimo		-	0,215	0,513	0,980	2,452
Máximo		-	0,266	0,558	1,018	2,505
Intervalo		-	0,051	0,045	0,038	0,053
Tbajo		-	1,818	1,289	1,434	2,655
Talto		-	1,529	1,138	1,809	0,972
T teórico		2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: La **TABLA 1.** Presenta los parámetros estadísticos de los resultados analíticos antes de aplicar el criterio de rechazo de datos, se eliminan los datos resaltados con negrilla.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para n=10, donde n es el número de muestras. El valor reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	mg Cu/L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
mg Cu/L teórico		0,0	0,25	0,5	1,0	2,5
	1	0,00	0,215	0,551	0,999	2,494
		0,00	0,251	0,513	0,999	2,497
	2	0,00	0,252	0,527	0,999	2,494
		0,00	0,241	0,514	0,983	2,505
	3	0,00	0,266	0,519	0,987	2,499
		0,00	0,239	0,555	1,011	2,485
	4	0,00	0,229		0,996	2,492
		0,00	0,229		0,996	2,492
	5	0,00	0,248	0,528	1,018	2,452
		0,00	0,257	0,546	0,980	2,498
Promedio		-	0,243	0,473	0,997	2,491
Desviación estándar		-	0,015	0,017	0,012	0,015
%CV		-	6,279	3,559	1,175	0,587
%Error		-	2,920	5,489	0,320	0,368

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

➤ Respuesta del instrumento en función de la concentración de cobre

La tabla que se muestra a continuación, representa los datos obtenidos al realizar la curva de calibración del cobre en un intervalo de concentración entre 0,0 y 2,5 mgCu/L.

Concentración mg/L	Abs	% T	log C	Abst	T	($\Delta C/C$)/ ΔT ¹
0,0	0,00	100,00		0,00	1,00	
0,25	0,007	98,401	-0,602	1,599	0,984	63,007
0,5	0,015	96,605	-0,301	3,395	0,966	29,950
1,0	0,027	93,972	0,000	6,028	0,940	17,105
2,5	0,068	85,507	0,398	14,493	0,855	7,464

Tabla 3. Respuesta del Instrumento en Función de la concentración del Cobre

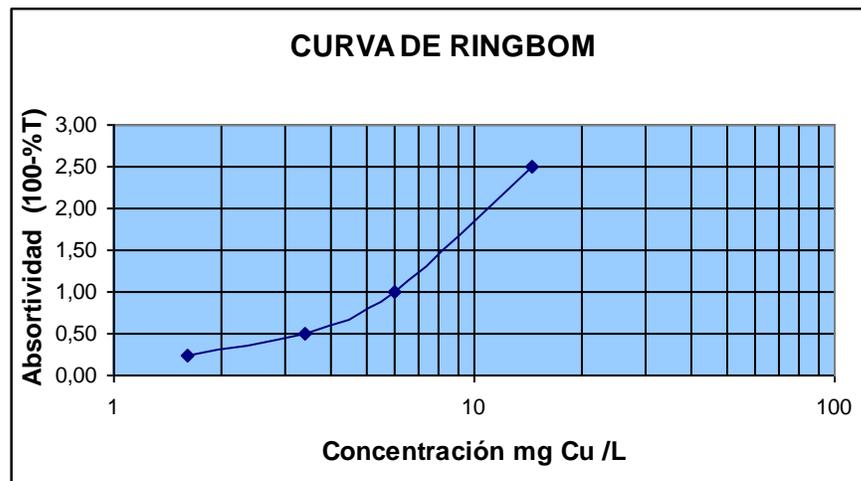
¹ Error relativo considerado para 1% de error de transmitancia

Abs : Absorbancia
%T : Porcentaje de transmitancia
Log C : Logaritmo de la concentración
Abs. : Absortividad
T : Transmitancia.

$$\begin{aligned} \%T &= 10^{(2 - Abs)} \\ T &= \%T/100 \\ Abst &= 100 - \%T \\ (\Delta C/C)/\Delta T &= 0,434 / (T \log T) \end{aligned}$$

➤ Curva de Ringbom

A partir de los datos de absorbancia en función de la concentración se construyó la curva de Ringbom:

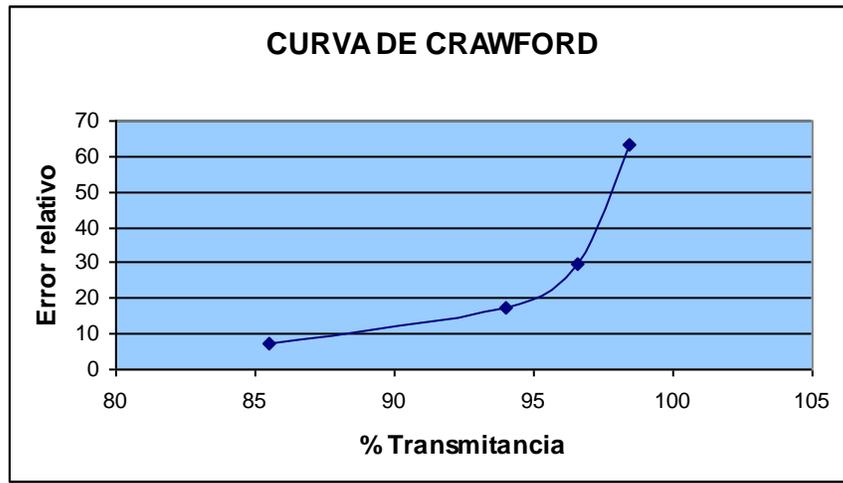


Gráfica 1. Curva de Ringbom

La **Gráfica 1** muestra la absortividad o porcentaje de absorción en función de la concentración donde se obtiene una curva de forma sigmoide llamada la curva de Ringbom, que es usada para definir el intervalo de concentración donde se cumpla la ley de Beer.

La ley de Lambert Beer nos dice que cuando un eje de radiación monocromático atraviesa una solución que contiene una especie absorbente, una parte de la radiación es absorbida en cuanto que la otra es transmitida por el medio.

➤ Curva de Crawford

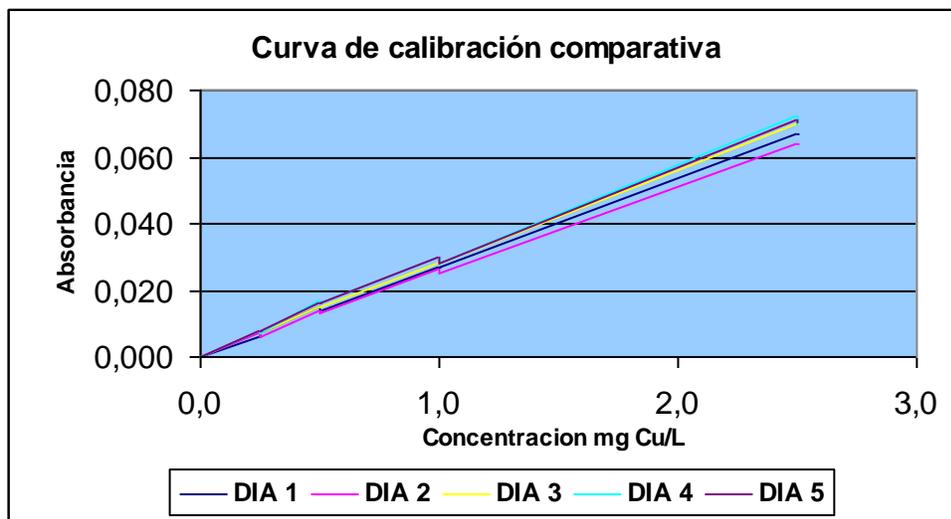


Gráfica 2. Curva de Crawford

La curva de Crawford permite el cálculo del intervalo de mínimo error relativo analítico en concentración, considerando un error de 1% en transmitancia.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Teniendo en cuenta la parte lineal de la curva de Ringbom se construyó la curva de calibración comparativa con un coeficiente de correlación promedio de 0,99951 y una pendiente promedio de 0,02719. Se reporta el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de validación y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.



Gráfica 3. Curva de calibración comparativa

Se puede observar las cinco (5) curvas de calibración, cada una de estas elaboradas en días diferentes.

Los coeficientes de correlación de cada una de las gráficas se puede observar en la siguiente tabla:

No. DE ENSAYO Y FECHA	COEFICIENTE DE CORRELACION (r)
No. 1 – 2006 – 02 – 27	0,99970
No. 2 – 2006 – 02 – 28	0,99978
No. 3 – 2006 – 03 – 01	0,99985
No. 4 – 2006 – 03 – 02	0,99880
No. 5 – 2006 – 03 – 03	0,99944

Tabla 4. Resumen de coeficientes de correlación

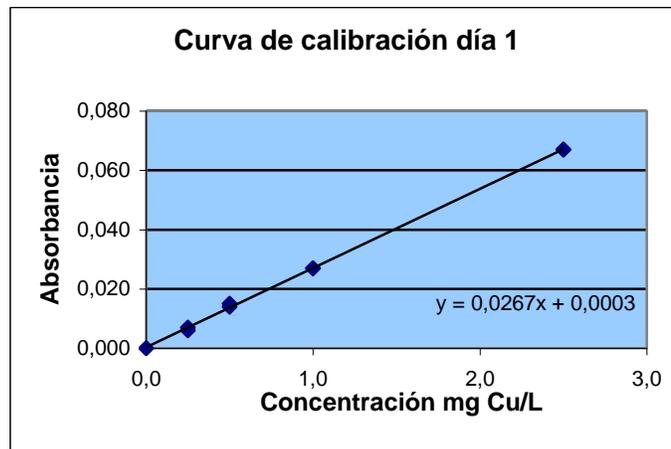
Se observa la concordancia entre cada uno mostrando tendencia al valor de 1 que corresponde a la pendiente de un ángulo de 45°.

➤ **Curvas de calibración por días**

Ensayo No. 1 / 2006– 02 – 27

No.	mg Cu/L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
1	0,00	0,006	0,015	0,027	0,067
	0,00	0,007	0,014	0,027	0,067
Pendiente	0,02674				
Intercepto	0,00021				
Correlación	0,99970				

Tabla 5. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 1

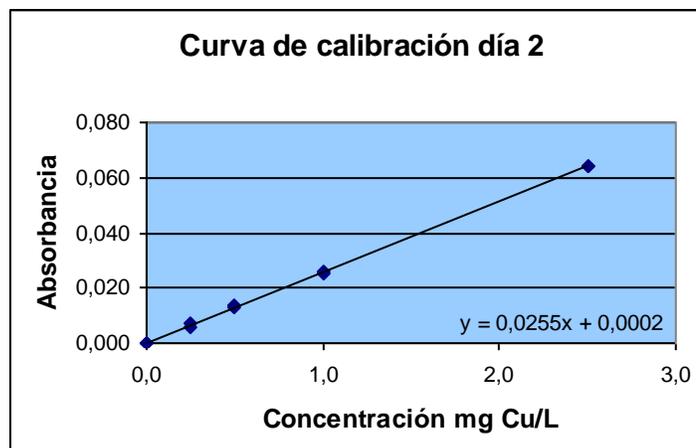


Gráfica 4. Curva de calibración día 1

Ensayo No. 2 / 2006– 02 – 28

No.	mg Cu/L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
2	0,00	0,007	0,014	0,026	0,064
	0,00	0,006	0,013	0,025	0,064
Pendiente	0,02552				
Intercepto	0,00021				
Correlación	0,99978				

Tabla 6. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 2

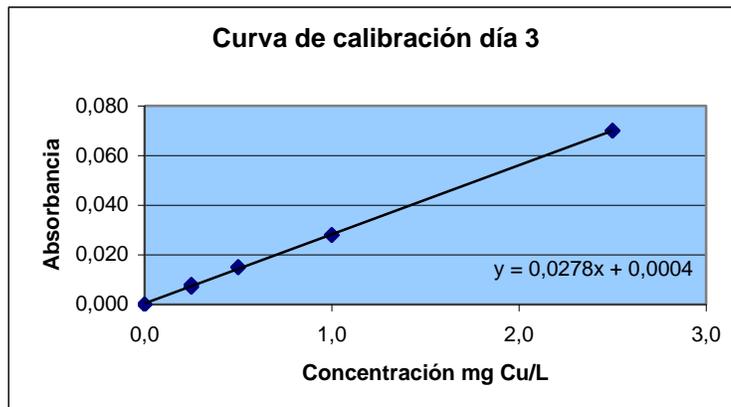


Gráfica 5. Curva de calibración día 2

Ensayo No. 3 / 2006 – 03 – 01

No.	mg Cu/L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
3	0,00	0,008	0,015	0,028	0,070
	0,00	0,007	0,015	0,028	0,070
Pendiente	0,02784				
Intercepto	0,00044				
Correlación	0,99985				

Tabla 7. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 3

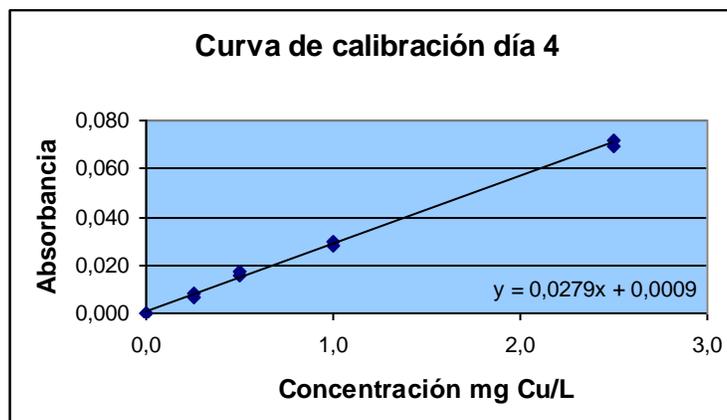


Gráfica 6. Curva de calibración día 3

Ensayo No. 4 / 2006 – 03 – 02

No.	mg Cu/L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
4	0,00	0,008	0,017	0,030	0,072
	0,00	0,007	0,016	0,028	0,069
Pendiente		0,02795			
Intercepto		0,00094			
Correlación		0,99880			

Tabla 8. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 4

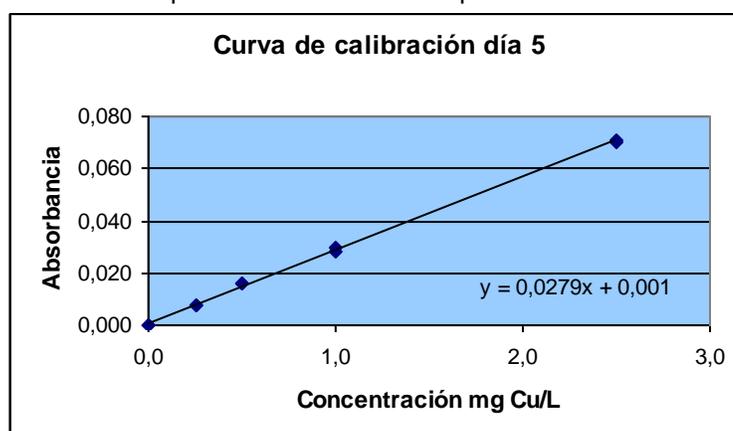


Gráfica 7. Curva de calibración día 4

Ensayo N° 5 / 2006 – 02 – 03

No.	mg Cu/L				
Ensa yo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
5	0,00	0,008	0,016	0,030	0,071
	0,00	0,008	0,016	0,028	0,070
Pendiente	0,02792				
Intercepto	0,00097				
Correlación	0,99944				

Tabla 9. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 5



Gráfica 8. Curva de calibración día 5

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad del método es la pendiente promedio de las curvas de calibración (curvas de trabajo). En este proceso el valor obtenido fué 0,02719 de sensibilidad de calibración lo que significa que este valor es el factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

Fecha	Pendiente	Coefficiente de correlación
03/09/2009	0,02674	0,99970
08/09/2009	0,02552	0,99978
04/09/2009	0,02784	0,99995
09/09/2009	0,02705	0,99990
02/09/2009	0,02709	0,99944
Promedio	0,02719	0,99951
Desviación estándar	0,00095	0,00043
Sensibilidad calibración	0,02719	

Tabla 10. Parámetros estadísticos de sensibilidad

➤ **Límite de detección y cuantificación**

En la siguiente tabla se muestran los valores de la respuesta del equipo de absorción atómica con llama para cobre en función del límite de detección y de cuantificación:

CONCENTRACIONES ESTÁNDAR	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (concentración)	ABSORBANCIAS MEDIDAS*1000
0,10	0,04	2
	0,04	2
	0,04	2
	0,04	2
	0,04	2
	0,04	2
	0,04	2
	0,04	2
	0,04	2
	0,04	2
PROMEDIO	0,04	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,02	
LÍMITE DE DETECCIÓN	0,16	
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	0,29	

Tabla 11. Respuesta equipo absorción para el cobre en función del límite de detección y cuantificación.

Para hallar el dato de **0,04** se tomaron los resultados obtenidos en la lectura de absorbancia para la curva de calibración incluyendo 2 que fue el valor leído en el espectrofotómetro de absorción atómica con llama para una concentración estándar de 0,10 mgCu/L, obteniendo su límite de detección y de cuantificación.

➤ **Análisis de varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza se utilizó con el fin de separar y estimar las diferentes causas de variación. En éste proceso se emplearon los patrones de las curvas de calibración para determinar los parámetros de ANOVA así:

Concentraciones estándar	Absorbancias medidas / 1000	Media
0,25	6,7,8	7
0,50	15,16,17	16
1,0	28,29,30	29
2,5	69,70,71	70
	Media global	31

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad
Entre muestras	$n \sum (X_i - \bar{X})^2 = 6978$	$h - 1 = 3$
Dentro de muestras	$\sum \sum (X_{ij} - X_i)^2 = 8$	$h (n - 1) = 8$
Total	$\sum \sum (X_{ij} - \bar{X})^2 = 6986$	$hn - 1 = 11$

ANOVA: de factor único

RESUMEN

Grupos	Frecuencia	Suma	Promedio	Varianza
0,05	3	9	3	1
0,1	3	18	6	1
0,25	3	45	15	1
0,5	3	84	28	1

ANOVA

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	F crit
Entre grupos	6978	3	2326	775	5,318
Dentro de grupos	8	8	1		
Total	6986	11			

Tabla 12. Concentraciones estándar para el cobre por absorción atómica con llama.

El valor crítico $F_{1, 8} = 5,318$ ($P=0,05$). Ya que el valor calculado es mayor que éste se rechaza la hipótesis nula: la media muestral difiere significativamente. Es decir los valores tomados de 1 y 8 se determinaron de acuerdo al cuadrado medio (estimación dentro de muestras) y a los grados de libertad (estimación de cada muestra tiene 2 g.l y hay cuatro (4) muestras lo que me indica ocho (8)) y así se reporta este dato para un 95% de límite de confianza.

Donde:

h: promedio de varianzas muestrales

(n-1): varianza de cada muestra

SC: suma de cuadrados

gl : grados de libertad

CM: cuadrado medio

F: contraste (una o dos colas)

F crítico: valor del número de grados de libertad del denominador VS número de grados de libertad del numerador.

6.10.8 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al obtener los resultados experimentales en la validación del cobre método de espectrofotometría de absorción atómica con llama no se evidenciaron errores sistemáticos, ni resultados erróneos; aunque hubo presencia de errores aleatorios, que es algo impredecible pues hay resultados que difieren uno del otro en el análisis. Dentro de los parámetros estadísticos calculados durante este proceso se analizó lo siguiente:

➤ Precisión

El parámetro estadístico “precisión”, definiéndolo como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por replicas de una misma muestra, se expresa en términos de la desviación estándar o del coeficiente de variación para concentraciones de soluciones estándares preparadas menores de 2,5mg Cu/L está por debajo del 6%.

De acuerdo al intervalo de concentración que se tuvo en cuenta para el proceso de validación (0,25 – 2,5 mg Cu/L) se pudo observar que la precisión o reproducibilidad se afecta por los errores aleatorios que provoca de una manera u otra los resultados cambien, aunque sean pequeños.

El obtener un resultado por debajo del 6% indica que el grado de concordancia entre la muestra y su respectiva replica es buena, pues hay reproducibilidad en el ensayo, así la desviación estándar o su coeficiente de variación que en este caso fue: 0,015 para 0,25 mg

Cu/L; 0,017 para 0,5 mg Cu/L; 0,012 para 1,0 mg Cu/L y 0,015 para 2,5 mg Cu/L, nos da el ejemplo de un error relativo que no es más que la comparación de la precisión de estos resultados obtenidos con la definición dada anteriormente.

➤ Exactitud

Respecto al parámetro estadístico de “exactitud”, definiéndolo en términos de porcentaje de error relativo, para los estándares de concentraciones menores de 2,5 mg Cu/L utilizadas en este proceso de validación se puede decir que este porcentaje de error esta en el rango de 0,320 y 5,489%.

Este porcentaje de error relativo tan bajo revela y confirma la buena exactitud de la técnica para la determinación de cobre por el método de absorción atómica con llama.

Curva de calibración

➤ Curva de Ringbom

La curva de Ringbom obtenida (**GRÁFICO No.1**) muestra la tendencia sigmoideal aplicada a las cuatro (4) concentraciones estándar de 0,25; 0,5; 1,0 y 2,5 mg Cu/L, principalmente en el intervalo de concentración de 1,0 a 2,5 mg Cu/L en el que se cumple la ley de Beer, al no tener desvíos esto quiere decir que no se presentaron desvíos según la ley de Beer, los desvíos enunciados en dicha ley se deben a factores físicos, químicos e instrumentales, llegando a ocurrir el caso el más frecuente es el factor instrumental que es atribuido a la radiación policromática, selección inadecuada de la longitud de onda, fuente de radiación inestable, detectores deficientes y defectos en la parte óptica para la espectrofotometría de absorción atómica con llama, lo que significa que para el proceso de cobre está dentro de las especificaciones requeridas.

➤ **Curva de Crawford**

La medida de la transmitancia esta sujeta a una incerteza llamada error relativo de concentración.

El intervalo en que los resultados producen menor error relativo están entre 0,4 a 0,7 o del 20 al 60% de T (Transmitancia). Para la curva de Crawford obtenida no se aprecia muy bien pues su tendencia es en forma de U, que se debió a los pocos datos de concentración estándar de la muestra tomados para el proceso de validación.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Se puede notar una buena concordancia entre ellas, aunque se observa diferencia entre el día 2 y 4, (**Gráfica No 3 y Tabla No 4**), que obedeció posiblemente a elementos que afectaron la sensibilidad como:

- Paso óptico (ajuste de la longitud de onda, lámpara, amplitud de abertura del diafragma).
- Llama (ajuste de nebulizador, de gases, de quemador rotacional, de profundidad del quemador).
- Absorbancia (velocidad de aspiración del material por la llama).

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad se calcula como el promedio de las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.

La sensibilidad resulta del promedio de la pendiente de la curva de calibración \pm desviación estándar ($0,002719 \pm 0,00095$). El valor a reportar es de 0,02719, lo que significa que este valor corresponde al factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

➤ **Límite de detección**

El límite de detección (LOD) de una analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del "blanco" o "ruido de fondo". En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que puede leer el espectrofotómetro Perkin Elmer 2380 de acuerdo con las concentraciones estándar que

se escogieron para la validación, se tomo la menor y se leyó. Se determino de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de cobre por el método de absorción atómica con llama, utilizando el equipo del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** Perkin Elmer modelo 2380 con base a los patrones de la curva de calibración, se estableció el límite en 0,16 mg Cu/L, para una concentración de 0,10 mgCu/L, obteniéndose una absorbancia de dos (2) en la lectura de las respectivas muestras para esta concentración; esto significa que es lo mínimo que puede leer el equipo a esta concentración para el cobre.

➤ Límite de cuantificación

El “límite de cuantificación” (o límite de determinación), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleo para el límite de detección, solo que esta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración cuantificable del estándar

S_B : Desviación estándar

Se determinó para la validación del cobre método de absorción atómica por llama el límite de cuantificación en 0,29 mg Cu/L, para 0,10 mg Cu/L lo que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, este valor obtenido nos indica que a esta concentración dada el equipo puede cuantificarlo, de ahí en adelante se hace más difícil apreciar y valorar este dato, pues de una manera u otra lo que se busca es minimizar los errores que el método presenta en cuanto a la precisión y la exactitud.

➤ Linealidad

Hace referencia a la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento. Para la determinación de la linealidad se necesito de la tabla de valores de la distribución T para calcular LC 95%, después de haber calculado ANOVA para la variación dentro y entre muestras, reportándose 2,78 para P= 0,05.

Este valor se toma de acuerdo a los grados de libertad (n-1), es decir cuatro (4) concentraciones estándar tratadas en el proceso de validación, se determina según el contraste (una cola o dos colas), en este caso fue contraste de una cola, pues se utilizo

un solo método absorción atómica con llama lo que significa que 2,78 es el dato que se reporta como lineal en la señal que muestra el instrumento para un 95% de confianza.

➤ **Análisis de varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza se define como una técnica estadística muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación.

La hipótesis nula se rechaza cuando la variación entre muestras es mayor que la variación dentro de las muestras.

Normalmente la hipótesis nula se rechaza cuando la probabilidad de que dicha diferencia observada ocurra por azar es menor que 1 en 20 veces (es decir, 0,05 ó 5%). En este caso se dice que la diferencia **es significativa al nivel 0,05 (ó 5%)**. Esto significa que se realiza con un límite de confianza del 95% que es con lo que se trabajo en el proceso de validación.

2.11.9. CONCLUSIONES

- La longitud de onda óptima para realizar la determinación de cobre por el método espectrofotométrico de absorción atómica con llama es de 324,8 nm.
- Según la curva de Ringbom los datos óptimos, se encuentran en la sección recta correspondiente al ciclo logarítmico entre concentraciones de 1,0 y 2,5 mg/L.
- La curva de calibración comparativa para concentraciones de 0,0 a 2,5 mg Cu/L presenta un coeficiente de correlación de 0,99951 confirmando una buena relación entre la concentración y la absorbancia.
- El método presenta una sensibilidad de 0,02719 la cual corresponde a la pendiente de la curva de calibración que puede producir un resultado significativo.
- El límite de detección para la determinación de cobre por el método de absorción atómica con llama es 0,16 mg Cu/L. Este límite es la concentración mínima que pudo ser medida con una exactitud aceptable, para una concentración estándar de 0,10 mg Cu/L.
- El límite de cuantificación que se determinó para el cobre fue de 0,29 mg Cu/L siendo esta la menor cantidad de analito que pudo determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, para una concentración estándar de 0,10 mg Cu/L.
- La linealidad que registra el método en base de la tabla de limite de confianza para un 95% es 2,78 para $P=0,05$, con $n-1$ grados de libertad. Este dato se tomo como valor crítico de t para contraste de una cola, pues se empleo un solo método para llevar a cabo el proceso de validación y es el único dato que se reporta pues es específico para cuatro (4) muestras (concentraciones estándar).
- El análisis de varianza (ANOVA) para la determinación de cobre por el método de absorción atómica con llama, bajo la hipótesis nula se estimo de dos formas: una la variación dentro de muestras y la otra la variación entre muestras obteniéndose lo siguiente: cuadrado medio dentro de las muestras = 1 con 8 g.l ; cuadrado

medio entre muestras = con 3 g.l con un valor de 5,318 para el contraste de una cola, lo que significa que la hipótesis nula se rechaza porque la variación entre muestras es mayor que la variación dentro de las muestras tomándose 1 con 8 g.l para la posible ubicación del dato a reportar, esto se hizo con el fin de separar y estimar las diferentes causas de variación que pueden conducir a diferencias significativas entre los valores medios obtenidos.

6.11 VALIDACIÓN DE CROMO HEXAVALENTE CON DIFENILCARBACIDA MÉTODO DE COLORIMETRÍA

6.11.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad que servirán como criterios de confianza para la determinación de cromo hexavalente con difenilcarbacida por el método de colorimetría.

6.11.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

En solución ligeramente ácida, el cromo hexavalente reacciona con la difenilcarbacida para dar una coloración rojo-violeta susceptible de una determinación colorimétrica.

El cromo hexavalente que ya existe en la muestra se reduce a cromo trivalente por la acción del sulfito sódico en presencia de ácido sulfúrico. El cromo total transformado en cromo trivalente se oxida con solución de permanganato potásico y se determina colorimétricamente en forma hexavalente. Este método se recomienda para aguas que contengan materias orgánicas. El Decreto 475 de 1998 del Ministerio de Salud "NORMAS TÉCNICAS DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE" da un valor de 0,01 mg/L para cromo hexavalente en agua potable y de 0,025 mg/L para agua segura.

6.11.3 REACTIVOS

- Solución patrón de cromo de 1,0mg/L
- Solución estándar de cromo de 5,0 µg/ML
- Ácido sulfúrico, H₂SO₄, 6N
- Ácido sulfúrico, H₂SO₄, 0,2N
- Solución ácida de difenilcarbacida
-

6.11.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- Espectrofotómetro con región visible marca Milton Roy Spectronic 20 D modelo 333175
- Balones aforados de 25, 50 y 100 mL marca Brand

- Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 25 mL marca Brand
- Vasos volumétricos de 100 mL marca Brand
- Probetas de 50 y 100 mL marca Brand
- Balones fondo redondo marca Brand.

6.11.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de aguas, J. Rodier. Ediciones Omega, S.A., Barcelona 1981.

- **Solución patrón de cromo de 1,0mg/L:** tomar 10 mL de la solución patrón en agua y diluir a 1000 mL con agua bidestilada.
- **Solución estándar de cromo de 5,0 µg/mL:** diluir 1,0 mL de la solución patrón en 100 mL de agua desmineralizada. 1,0 mL = 5,0 µgCr/L.
- **Ácido sulfúrico, H₂SO₄, 6N:** diluir 2 volúmenes de ácido y 1 volumen de agua desmineralizada.
- **Ácido sulfúrico, H₂SO₄, 0.2N:** diluir 17 mL de la solución de H₂SO₄ 6N en 500 mL de agua desmineralizada.
- **Solución ácida de difenilcarbácida:** disolver 0,2 g de 1,5-difenilcarbácida (1,5-difenilcarbohidracida) en 100 mL de alcohol etílico de 95° y 400 mL de solución de ácido sulfúrico 0,2 N. Almacenar en una botella ámbar y bien tapada. **Descartar esta solución cuando comienza a decolorar.** Revisión exhaustiva de la calidad y pureza de los reactivos a utilizar.
- Debe realizarse como mínimo 5 ensayos cada uno con su respectiva replica, dando así 10 datos para el posterior tratamiento estadístico.
- Eliminar de la muestra, partículas flotantes grandes o aglomerados dispersados de material no homogéneo.
- Volumen de la muestra para cada análisis 50 mL

6.11.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de cromo hexavalente se siguió el procedimiento 3500-Cr (A-D) descrito en el protocolo para análisis de aguas J. Rodier. Ediciones Omega, S.A., Barcelona 1981. El siguiente fue el grupo básico de muestras que se leyó durante 5 ensayos con su respectiva réplica de los que consta el proceso de validación.

Bk: Blanco de reactivos

Eb: Estándar de cromo hexavalente de concentración baja = 0,020 mg Cr⁶⁺/L

Emb: Estándar de cromo hexavalente de concentración media baja = 0,050 mg Cr⁶⁺/L

Ema: Estándar de cromo hexavalente de concentración media alta = 0,100 mg Cr⁶⁺/L

Ea: Estándar de cromo hexavalente de concentración alta = 0,250 mg Cr⁶⁺/L

El proceso de validación se inició el día veintinueve (29) de marzo a las 10 h: 40min, los estándares de concentración baja, media y alta se prepararon el primer día; a partir de una solución patrón de 1000 ppm de cromo hexavalente.

6.11.7 RESULTADOS

El cálculo de la determinación de cromo hexavalente es hallado por la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm de cada estándar o patrón incluyendo la curva de calibración se procede a determinar la concentración de la muestra.

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	mg Cr ⁶⁺ /L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	1	0,00	0,014	0,051	0,102	0,249
		0,00	0,010	0,055	0,110	0,246
	2	0,00	0,017	0,051	0,098	0,251
		0,00	0,027	0,046	0,091	0,254
	3	0,00	0,018	0,052	0,095	0,252
		0,00	0,023	0,047	0,094	0,253
	4	0,00	0,017	0,052	0,097	0,251
		0,00	0,021	0,045	0,097	0,254
	5	0,00	0,016	0,050	0,105	0,248
		0,00	0,021	0,049	0,097	0,251
Promedio		-	0,018	0,050	0,099	0,251
Desviación estándar		-	0,005	0,003	0,006	0,003
Número de datos		10	10	10	10	10
Mínimo		-	0,010	0,045	0,091	0,246
Máximo		-	0,027	0,055	0,110	0,254
Intervalo		-	0,017	0,010	0,019	0,008
Tbajo		-	1,746	1,556	1,357	1,884
Talto		-	1,787	1,686	2,035	1,192
T teórico		2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: La **TABLA 1.** Presenta los parámetros estadísticos de los resultados analíticos antes de aplicar el criterio de rechazo de datos, se eliminan los datos resaltados con negrilla.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para n=10, donde n es el número de muestras. El valor

reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	mg Cr ⁶⁺ /L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
mg Cr ⁶⁺ /L teórico		0	0,02	0,05	0,10	0,25
	1	0,00	0,014	0,051	0,102	0,249
		0,00	0,010		0,110	0,246
	2	0,00	0,017	0,051	0,098	0,251
		0,00	0,027	0,046	0,091	0,254
	3	0,00	0,018	0,052	0,095	0,252
		0,00	0,023	0,047	0,094	0,253
	4	0,00	0,017	0,052	0,097	0,251
		0,00	0,021	0,045	0,097	0,254
	5	0,00	0,016	0,050	0,105	0,248
		0,00	0,021	0,049	0,097	0,251
Promedio		-	0,018	0,049	0,099	0,251
Desviación estándar		-	0,005	0,003	0,006	0,003
%CV		-	26,15 2	5,354	5,681	1,037
%Error		-	8,000	1,556	1,400	0,360

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

- **Respuesta del instrumento en función de la concentración de cromo hexavalente**

La tabla que se muestra a continuación, representa los datos obtenidos al realizar la curva de calibración de cromo hexavalente en un intervalo de concentración entre 0,0 y 0,25mg Cr⁶⁺/L.

Concentración mg/L	Abs	% T	log C	Abst	T	$(\Delta C/C)/\Delta T^{-1}$ Error relativo
0,000	0,00	100,00		0,00	1,00	
0,02	0,004	99,083	-1,619	0,917	0,991	109,504
0,05	0,009	97,949	-1,301	2,051	0,979	49,232
0,10	0,019	95,719	-1,000	4,281	0,957	23,864
0,25	0,051	88,920	-0,602	11,080	0,889	9,570

Tabla 3. Respuesta del Instrumento en Función de la concentración del Cromo hexavalente

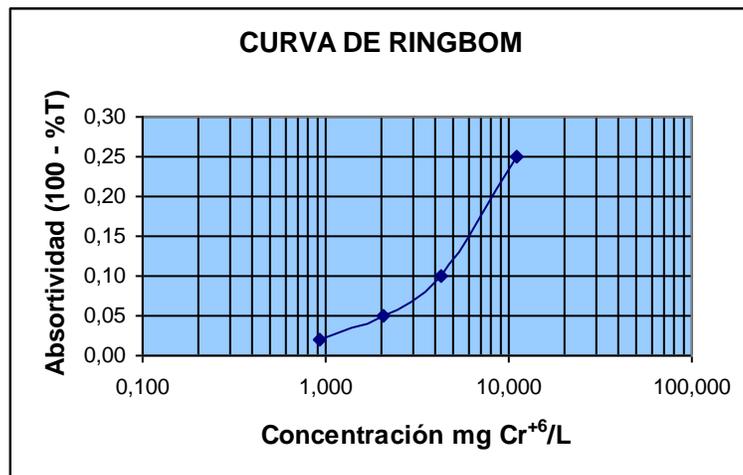
¹ Error relativo considerado para 1% de error de transmitancia

Abs : Absorbancia
%T : Porcentaje de transmitancia
Log C : Logaritmo de la concentración
Abs. : Absortividad
T : Transmitancia.

$$\begin{aligned} \%T &= 10^{(2 - Abs)} \\ T &= \%T/100 \\ Abst &= 100 - \%T \\ (\Delta C/C)/\Delta T &= 0,434 / (T \log T) \end{aligned}$$

➤ Curva de Ringbom

A partir de los datos de absorbancia en función de la concentración se construyó la curva de Ringbom:

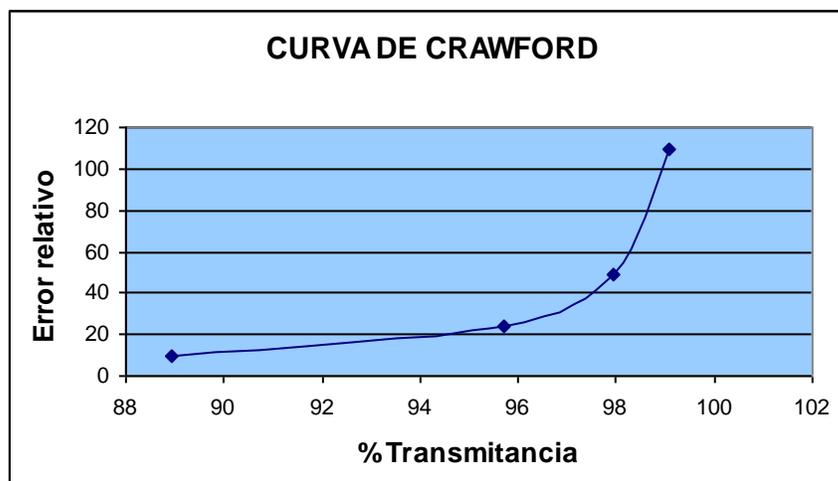


Gráfica 1. Curva de Ringbom

La **Gráfica 1** muestra la absorptividad o porcentaje de absorción en función de la concentración donde se obtiene una curva de forma sigmoideal llamada la curva de Ringbom, que es usada para definir el intervalo de concentración donde se cumpla la ley de Beer.

La ley de Lambert Beer nos dice que cuando un eje de radiación monocromático atraviesa una solución que contiene una especie absorbente, una parte de la radiación es absorbida en cuanto que la otra es transmitida por el medio.

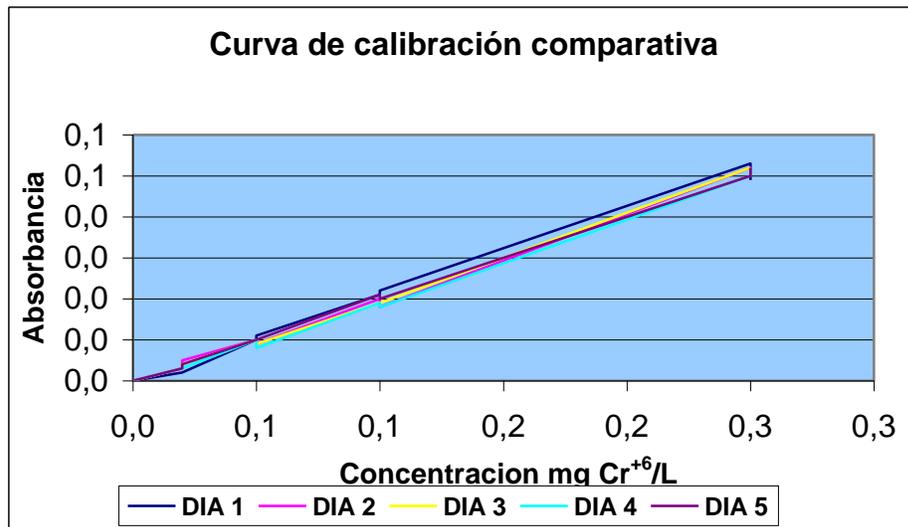
➤ **Curva de Crawford**



Gráfica 2. Curva de Crawford

6.6 Curva de calibración comparativa

Teniendo en cuenta la parte lineal de la curva de Ringbom se construyó la curva de calibración comparativa con un coeficiente de correlación promedio de 0,99869 y una pendiente promedio de 0,20679. Se reporta el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de validación y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.



Gráfica 3. Curva de calibración comparativa

Se puede observar las cinco (5) curvas de calibración, cada una de estas elaboradas en días diferentes.

Los coeficientes de correlación de cada una de las gráficas se puede observar en la siguiente tabla:

No. DE ENSAYO Y FECHA	COEFICIENTE DE CORRELACION (r)
No. 1 – 2006 – 03 – 29	0,99720
No. 2 – 2006 – 03 – 30	0,99870
No. 3 – 2006 – 03 – 31	0,99924
No. 4 – 2006 – 04 – 01	0,99859
No. 5 – 2006 – 04 – 02	0,99948

Tabla 4. Resumen de coeficientes de correlación

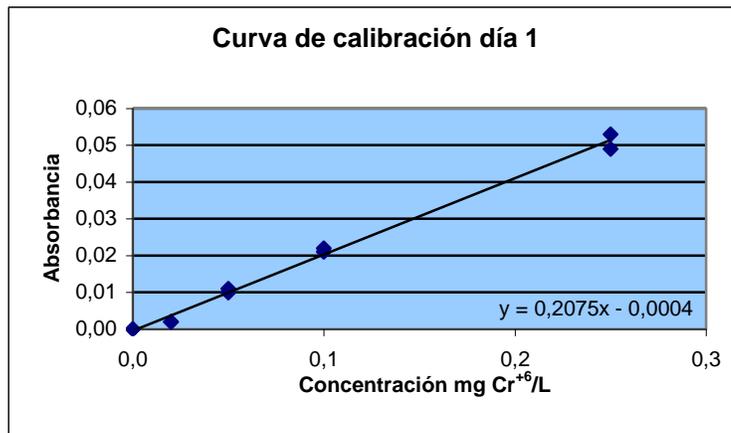
Se observa la concordancia entre cada uno mostrando tendencia al valor de 1 que corresponde a la pendiente de un ángulo de 45° .

➤ **Curvas de calibración por días**

Ensayo No. 1 / 2006 – 03 – 29

No. Ensayo	mg Cr^{6+}/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
1	0,00	0,002	0,010	0,021	0,053
	0,00	0,002	0,011	0,022	0,049
Pendiente	0,20750				
Intercepto	-0,00043				
Correlación	0,99720				

Tabla 5. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 1

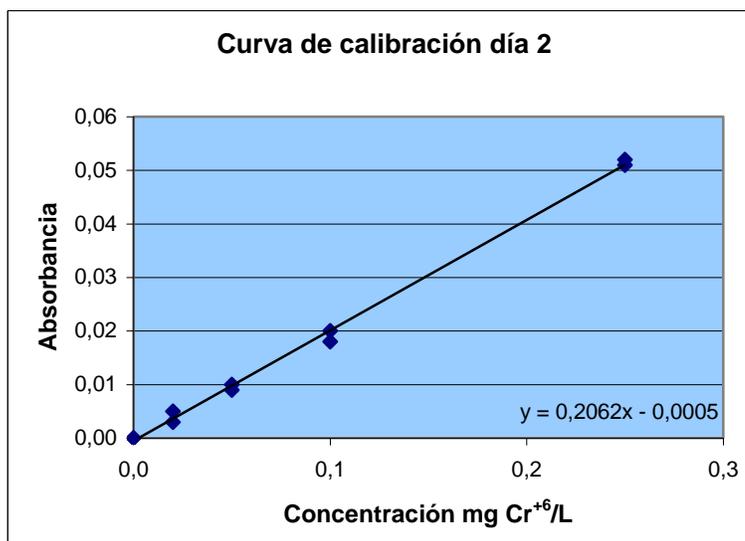


Gráfica 4. Curva de calibración día 1

Ensayo No. 2 / 2006 – 03 – 30

No.	mg Cr ⁶⁺ /L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
2	0,00	0,003	0,010	0,020	0,052
	0,00	0,005	0,009	0,018	0,051
Pendiente	0,20623				
Intercepto	-0,00052				
Correlación	0,99870				

Tabla 6. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 2

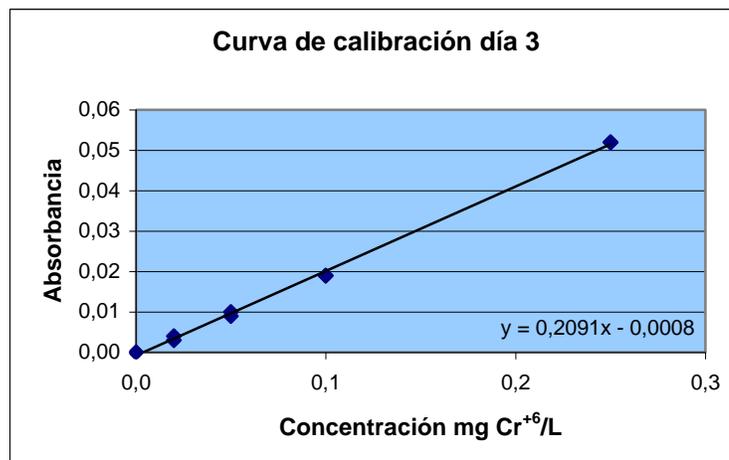


Gráfica 5. Curva de calibración día 2

Ensayo No. 3 / 2006 – 03 – 31

No.	mg Cr ⁶⁺ /L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
3	0,00	0,003	0,010	0,019	0,052
	0,00	0,004	0,009	0,019	0,052
Pendiente	0,20910				
Intercepto	-0,00076				
Correlación	0,99924				

Tabla 7. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 3

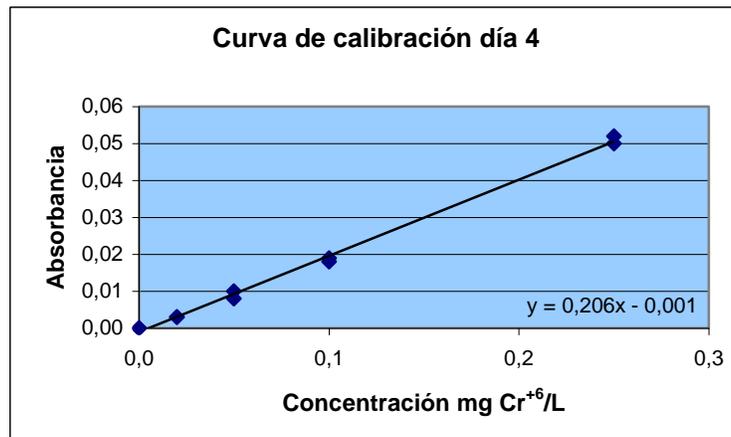


Gráfica 6. Curva de calibración día 3

Ensayo No. 4 / 2006 – 04 – 01

No.	mg Cr ⁶⁺ /L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
4	0,00	0,003	0,010	0,019	0,050
	0,00	0,003	0,008	0,018	0,052
Pendiente	0,20598				
Intercepto	-0,00100				
Correlación	0,99859				

Tabla 8. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 4

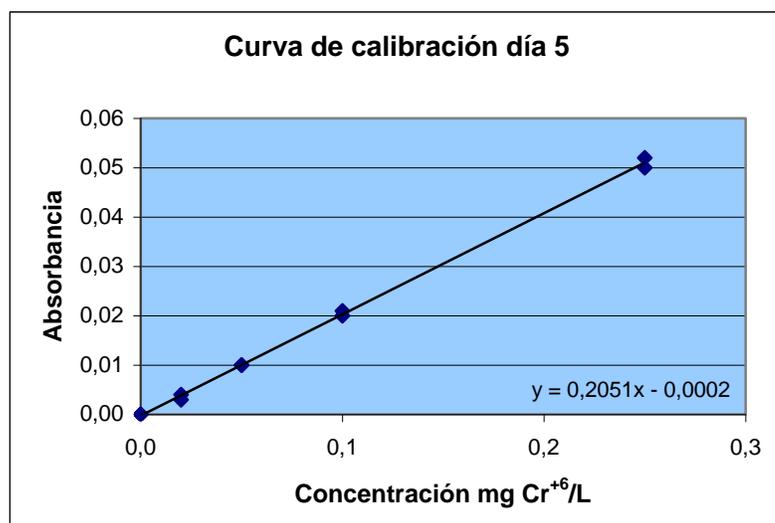


Gráfica 7. Curva de calibración día 4

Ensayo N° 5 / 2006 – 04 – 02

No.	mg Cr ⁶⁺ /L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
5	0,00	0,003	0,010	0,021	0,050
	0,00	0,004	0,010	0,020	0,052
Pendiente		0,20513			
Intercepto		-0,00023			
Correlación		0,99948			

Tabla 9. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 5



Gráfica 8. Curva de calibración día 5

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad del método es la pendiente promedio de las curvas de calibración (curvas de trabajo). En este proceso el valor obtenido fue 0,20679 de sensibilidad de calibración lo

que significa que este valor es el factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

Fecha	Pendiente	Coefficiente de correlación
20/02/2006	0,20750	0,99720
20/02/2006	0,20622	0,99870
21/02/2006	0,20010	0,99924
01/04/2006	0,20508	0,99850
09/04/2006	0,20510	0,99840
Promedio	0,20679	0,99864
Desviación estándar	0,00138	0,00089
Sensibilidad calibración	0,20679	

Tabla 10. Parámetros estadísticos de sensibilidad

➤ **Límite de detección y cuantificación**

En la siguiente tabla se muestran los valores de la respuesta del colorímetro para cromo hexavalente en función del límite de detección y de cuantificación:

CONCENTRACIÓN ESTÁNDAR	ABSORBANCIAS MEDIDAS
0,02	0,002
	0,003
	0,002
	0,002
	0,002
	0,002
	0,002
	0,003
	0,003
	0,003
PROMEDIO	0,003
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,005
LÍMITE DE DETECCIÓN	0,036
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	0,073

Tabla 11. Respuesta colorímetro para cromo hexavalente en función del límite de detección y de cuantificación.

El colorímetro me da las lecturas obtenidas por cada muestra de la cual los resultados dados se incluye el promedio en la curva de calibración es decir **0,003** hallando de esta forma así el límite de detección y de cuantificación.

6.11.8 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al obtener los resultados experimentales en la validación del cromo hexavalente con difenilcarbocida método de colorimetría no se evidenciaron errores sistemáticos, ni resultados erróneos; aunque hubo presencia de errores aleatorios, que es algo impredecible pues hay resultados que difieren uno del otro en el análisis.

➤ **Precisión**

El parámetro estadístico “precisión”, definiéndolo como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por replicas de una misma muestra, se expresa en términos de la desviación estándar o del coeficiente de variación para concentraciones de soluciones estándares preparadas menores de 0,25 mg Cr⁶⁺/L está por debajo del 26%.

De acuerdo al intervalo de concentración que se tuvo en cuenta para el proceso de validación (0,02 – 0,25 mg Cr⁶⁺/L) se observó que la precisión o reproducibilidad se afecta por los errores aleatorios que provoca de una manera u otra los resultados cambien, aunque sean pequeños.

➤ **Exactitud**

Respecto al parámetro estadístico de “exactitud”, definiéndolo en términos de porcentaje de error relativo, para los estándares de concentraciones menores de 0,25 mg Cr⁶⁺/L utilizadas en este proceso de validación se puede decir que este porcentaje de error está en el rango de 0,360 y 8,000%.

Este porcentaje de error relativo nos demuestra que el grado de aproximación entre el valor obtenido experimental y el valor real o aceptado no está tan lejos de los valores obtenidos por el espectrofotómetro para la determinación de cromo hexavalente por el método de colorimetría.

Curva de calibración

➤ **Curva de Ringbom**

La curva de Ringbom obtenida (**GRÁFICO No.1**) muestra la tendencia sigmoideal aplicada a las cuatro (4) concentraciones estándar de 0,02; 0,05; 0,10 y 0,25 mg Cr⁶⁺/L, principalmente en el intervalo de concentración de 0,10 a 0,25 mg Cr⁶⁺/L en el que se cumple la ley de Beer, al no tener desvíos esto quiere decir que no se presentaron desvíos según la ley de Beer, los desvíos enunciados en dicha ley se deben a factores físicos, químicos e instrumentales, llegando a ocurrir el caso el más frecuente es el factor instrumental que es atribuido a la radiación policromática, selección inadecuada de la longitud de onda, fuente de radiación inestable, detectores deficientes y defectos en la parte óptica para el colorímetro, lo que significa que para el proceso de cromo hexavalente está dentro de las especificaciones requeridas.

➤ **Curva de Crawford**

La medida de la transmitancia está sujeta a una incerteza llamada error relativo de concentración.

El intervalo en que los resultados producen menor error relativo están entre 0,4 a 0,7 o del 20 al 60% de T (Transmitancia). Para la curva de Crawford obtenida no se aprecia

muy bien pues su tendencia es en forma de U, que se debió a los pocos datos de concentración estándar de la muestra tomados para el proceso de validación.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Se puede notar una buena concordancia entre ellas, aunque se observa diferencia entre los días 1 y 2 (**Gráfica No 3 y Tabla No 4**), ya que el método es muy sensible, poco estable debido a la coloración roja-violeta que no se desarrolla completamente.

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad se calcula como el promedio de las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.

La sensibilidad resulta del promedio de la pendiente de la curva de calibración \pm desviación estándar (0,20679 \pm 0,00138). El valor a reportar es de 0,20679, lo que significa que este valor corresponde al factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

➤ **Límite de detección**

El límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que puede leer el espectrofotómetro Spectronic 20D modelo 333175 de acuerdo con las concentraciones estándar que se escogieron para la validación, se tomó la menor y se leyó. Se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de cromo hexavalente por el método de colorimetría, utilizando el equipo del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** espectrofotómetro Spectronic 20D modelo 333175 con base a los patrones de la curva de calibración, se estableció el límite en 0,036 mg Cr⁶/L, para una concentración de 0,02 mg Cr⁶/L, obteniéndose unas lecturas de absorbancia que oscilaban entre 0,002 y 0,003 de las respectivas muestras para esta concentración; esto significa que es lo mínimo que puede leer el equipo a esta concentración para cromo hexavalente.

➤ **Límite de cuantificación**

El “límite de cuantificación” (o límite de determinación), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleo para el límite de detección, solo que esta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración cuantificable del estándar

S_B : Desviación estándar

Se determinó para la validación de cromo hexavalente método de colorimetría el límite de cuantificación en 0,073 mg Cr⁺⁶/L, para 0,02 mg Cr⁺⁶/L lo que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, este valor obtenido nos indica que a esta concentración dada el equipo puede cuantificarlo, de ahí en adelante se hace más difícil apreciar y valorar este dato, pues de una manera u otra lo que se busca es minimizar los errores que el método presenta en cuanto a la precisión y la exactitud.

➤ **Linealidad**

Hace referencia a la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento. Para la determinación de la linealidad se necesitó de la tabla de valores de la distribución T para calcular LC 95%, después de haber calculado ANOVA para la variación dentro y entre muestras, reportándose 2,78 para P = 0,05.

Este valor se toma de acuerdo a los grados de libertad (n-1), es decir cuatro (4) concentraciones estándar tratadas en el proceso de validación, se determina según el contraste (una cola o dos colas), en este caso fue contraste de una cola, pues se utilizó un solo método absorción atómica con llama lo que significa que 2,78 es el dato que se reporta como lineal en la señal que muestra el instrumento para un 95% de confianza.

6.11.9 CONCLUSIONES

- La longitud de onda óptima para realizar la determinación de cromo hexavalente con difenilcarbocida por el método colorimétrico es de 540nm.
- Según la curva de Ringbom los datos óptimos, se encuentran en la sección recta correspondiente al ciclo logarítmico entre concentraciones de 0,10 y 0,25mg/L.
- La curva de calibración comparativa para concentraciones de 0,0 a 0,25 mg Cr⁶⁺/L presenta un coeficiente de correlación de 0,99864 confirmando una buena relación entre la concentración y la absorbancia.
- El método presenta una sensibilidad de calibración de 0,20679, la cual corresponde a la pendiente de la curva de calibración de cromo hexavalente que puede producir un resultado significativo.
- El límite de detección para la determinación de cromo hexavalente con difenilcarbocida por el método colorimétrico es 0,036 mg Cr⁶⁺/L. Este límite es la concentración mínima que pudo ser medida con una exactitud aceptable, para una concentración estándar de 0,02 mg Cr⁺⁶/L.

- El límite de cuantificación que se determinó para el Cromo hexavalente fue de 0,073 mg Cr⁺⁶/L siendo esta la menor cantidad de analito que pudo determinarse y cuantificarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, para una concentración estándar de 0,02 mg Cr⁺⁶/L.

6.12 VALIDACIÓN DE MANGANESO MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA

6.12.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y análisis de varianza (ANOVA), que servirán como criterios de confianza para la determinación de manganeso por el método de absorción atómica con llama.

6.12.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

Aunque el manganeso en aguas subterráneas esta presente en la forma soluble divalente iónica por la ausencia de oxígeno parte de todo el manganeso en una planta de tratamiento de agua puede estar en estado de valencia alta. La determinación de manganeso total no se diferencia de los varios estados de valencia.

Hay evidencia de que el manganeso ocurre en aguas superficiales ambos en suspensión en el estado tetravalente y en el estado trivalente en un complejo soluble relativamente estable.

La determinación del manganeso debe practicarse inmediatamente después de tomar la muestra, pues tiene tendencia a oxidarse rápidamente, a precipitar y a fijarse sobre las paredes del recipiente. En el caso contrario, acidificar la muestra en el momento de tomarla.

El Decreto 475 de 1998 del Ministerio de Salud "NORMAS TÉCNICAS DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE" da un valor de 0,1 mg/L para manganeso en agua potable y de 0,15 mg/L para agua segura.

6.12.3 REACTIVOS

La concentración de ácido no es crítica en la concentración final en la muestra.

- **Solución patrón de manganeso de 1000 µg/mL:** preferiblemente un titrisol y/o fizanal con certificado de pureza de la firma fabricante.
- Soluciones estándares de 0,1 ; 0,25 ; 0,5 y 1,0 µg Mn/mL
- Ácido nítrico HNO_{3 conc} y Ácido perclórico HClO_{4 conc}.
- Agua destilada – desmineralizada

6.12.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer modelo 2380
- Lámpara de cátodo hueco para manganeso (Mn)
- Gases (aire-acetileno grado absorción atómica)
- Balones aforados de 25, 50 y 100 mL marca Brand
- Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 25 mL marca Brand
- Vasos volumétricos de 100 mL marca Brand
- Probetas de 50 y 100 mL marca Brand
- Balones fondo redondo marca Brand.
- Filtros
- Embudos filtrantes

6.12.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de aguas, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th Edition de 1995".

Se deben de tener en cuenta las siguientes condiciones para el trabajo con el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 2380:

- El Mechero o quemador de 10 cm: debidamente alineado con el haz
- Longitud de onda: 279,4 nm
- Slit o rendija del monocromador: 0,2 nm
- Corriente de la lámpara : 25 mA
- Voltaje del fototubo: 70-75
- Relación de gases: aire-acetileno (30 : 20)
- Serie de la lámpara de cátodo hueco y su respectiva marca: 175450 PERKIN ELMER
- Supresor de interferencia: no presenta interferencias.
- Eliminar de la muestra, partículas flotantes grandes o aglomerados dispersos de material no homogéneo.
- Usar frascos de vidrio resistente o plástico, lavados con una solución de ácido nítrico (HNO₃) 1:1, en los que el material en suspensión no se adhiera a las paredes del recipiente.

- Filtrar inmediatamente para metales disueltos y añadir ácido nítrico (HNO₃) hasta pH < 2.
- Refrigerar la muestra a 4°C hasta el momento del análisis para minimizar la descomposición microbológica de los sólidos. Antes de iniciar el análisis, llevar las muestras a temperatura ambiente.
- Alinear el haz emitido por la lámpara de cátodo hueco sobre el quemador o mechero.
- Tener en cuenta la respuesta de la lámpara de cátodo hueco con respecto al voltaje del fototubo y la corriente de la lámpara de cátodo hueco.
- Selección máxima de la longitud de onda con respecto al voltaje del fototubo
- Aspiración correcta del capilar ubicado en la parte externa de la cámara de nebulización.
- Tipo de llama obtenida al mezclar los gases (Para el manganeso (Mn) debe ser oxidante: aire-acetileno). **Llama obtenida azul.**
- Volumen mínimo de muestra por análisis de 500mL

6.12.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de manganeso se siguió el procedimiento 3500 (A-B) descrito en el protocolo para análisis de aguas Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 19. El siguiente fue el grupo básico de muestras que se leyó durante 5 ensayos con su respectiva réplica de los que consta el proceso de validación.

Bk: Blanco de agua

Eb: Estándar de manganeso de concentración baja = 0,1 mg Mn/L

Emb: Estándar de manganeso de concentración media baja = 0,25 mg Mn/L

Ema: Estándar de manganeso de concentración media alta = 0,5 mg Mn/L

Ea: Estándar de manganeso de concentración alta = 1,0 mg Mn/L

El proceso de validación se inició el día siete (7) de marzo a las 12 h: 00min, los estándares de concentración baja, media y alta se prepararon el primer día; a partir de una solución patrón de 1000 ppm de manganeso.

6.12.7 RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la validación de manganeso método de absorción atómica con llama se muestra a continuación:

Cálculo para muestras líquidas (metal disuelto o soluble)

- Expresión matemática:

$$\mu\text{g/mL} = C_0 \frac{V_f}{V_0} \frac{V_1}{V_a}$$

Donde:

C_0 = Concentración en $\mu\text{g/mL}$ dado por la curva de calibración

V_0 = Volumen de muestra inicial, mL

V_f = Volumen de muestra final después de ser concentrada, mL

V_a = Volumen de alícuota tomada a partir de V_f , mL

V_1 = Volumen al cual se llevó la alícuota V_a , mL.

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	mg Mn/L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	1	0,00	0,109	0,231	0,533	0,987
		0,00	0,086	0,251	0,548	0,977
	2	0,00	0,117	0,244	0,496	1,002
		0,00	0,094	0,244	0,514	0,995
	3	0,00	0,104	0,252	0,518	0,990
		0,00	0,107	0,260	0,505	0,995
	4	0,00	0,110	0,255	0,485	1,005
		0,00	0,100	0,257	0,539	0,979
	5	0,00	0,106	0,249	0,508	0,996
		0,00	0,104	0,252	0,518	0,990
Promedio		-	0,104	0,250	0,516	0,992
Desviación estándar		-	0,009	0,008	0,019	0,009
Número de datos		10	10	10	10	10
Mínimo		-	0,086	0,231	0,485	0,977
Máximo		-	0,117	0,260	0,548	1,005
Intervalo		-	0,031	0,029	0,063	0,028
Tbajo		-	2,033	2,239	1,616	1,623
Talto		-	1,528	1,271	1,626	1,490
T teórico		2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: La **TABLA 1.** Presenta los parámetros estadísticos de los resultados analíticos antes de aplicar el criterio de rechazo de datos, se eliminan los datos resaltados con negrilla.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para $n=10$, donde n es el número de muestras. El valor reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	mg Mn/L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
mg Mn/L teórico		0	0,1	0,25	0,5	1,0
	1	0,00	0,109	0,231	0,533	0,987
		0,00	0,086	0,251	0,548	0,977
	2	0,00	0,117	0,244	0,496	1,002
		0,00	0,094	0,244	0,514	0,995
	3	0,00	0,104	0,252	0,518	0,990
		0,00	0,107	0,260	0,505	0,995
	4	0,00	0,110	0,255	0,485	1,005
		0,00	0,100	0,257	0,539	0,979
	5	0,00	0,106	0,249	0,508	0,996
		0,00	0,104	0,252	0,518	0,990
Promedio		-	0,104	0,248	0,516	0,992
Desviación estándar		-	0,009	0,008	0,019	0,009
%CV		-	8,395	3,158	3,763	0,907
%Error		-	3,700	0,667	3,280	0,840

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

➤ Respuesta del instrumento en función de la concentración de manganeso

La tabla que se muestra a continuación, representa los datos obtenidos al realizar la curva de calibración del manganeso en un intervalo de concentración entre 0,0 y 2,5 mgCu/L.

Concentración mg/L	Abs	% T	log C	Abst	T	$(\Delta C/C)/\Delta T^1$
0,0	0,00	100,00		0,00	1,00	
0,1	0,004	99,083	-1,000	0,917	0,991	109,504
0,25	0,009	97,949	-0,602	2,051	0,979	49,232
0,5	0,017	96,161	-0,301	3,839	0,962	26,549
1,0	0,032	92,897	0,000	7,103	0,929	14,600

Tabla 3. Respuesta del Instrumento en Función de la concentración del Manganeso

¹ Error relativo considerado para 1% de error de transmitancia

Abs : Absorbancia
%T : Porcentaje de transmitancia
Log C : Logaritmo de la concentración
Abs. : Absortividad
T : Transmitancia.

$$\%T = 10^{(2 - Abs)}$$

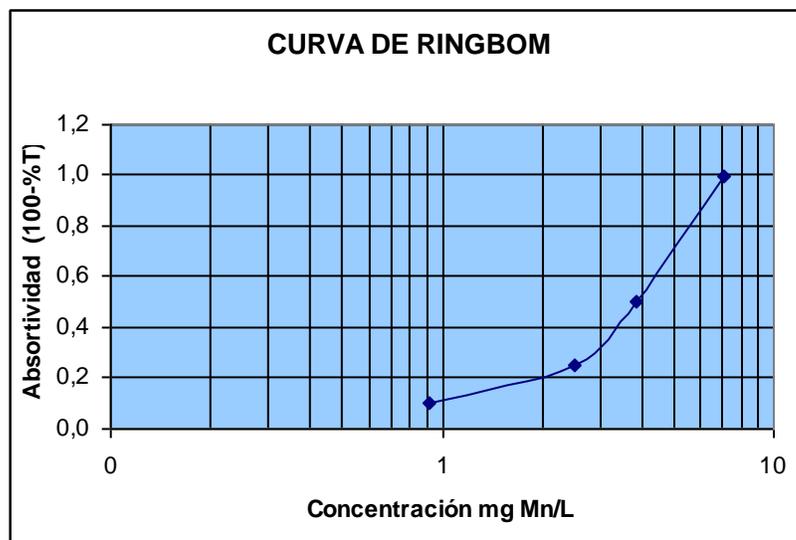
$$T = \%T/100$$

$$Abst = 100 - \%T$$

$$(\Delta C/C)/\Delta T = 0,434 / (T \log T)$$

➤ **Curva de Ringbom**

A partir de los datos de absorbancia en función de la concentración se construyó la curva de Ringbom:

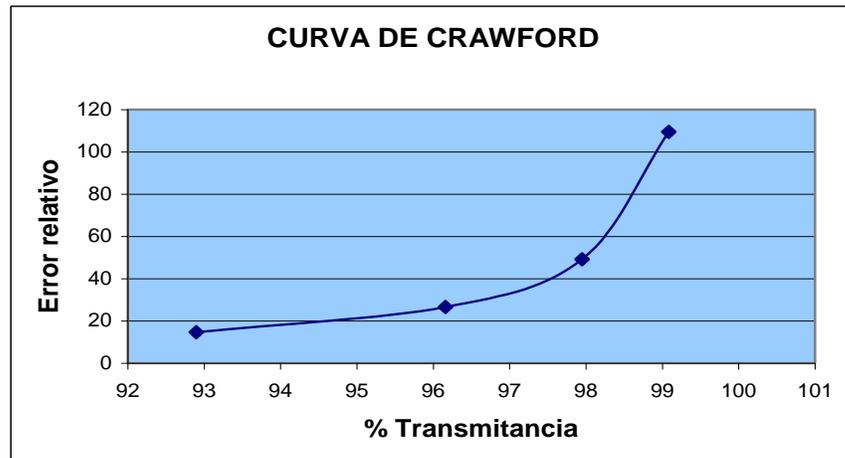


Gráfica 1. Curva de Ringbom

La **Gráfica 1** muestra la absortividad o porcentaje de absorción en función de la concentración donde se obtiene una curva de forma sigmoide llamada la curva de Ringbom, que es usada para definir el intervalo de concentración donde se cumpla la ley de Beer.

La ley de Lambert Beer nos dice que cuando un eje de radiación monocromático atraviesa una solución que contiene una especie absorbente, una parte de la radiación es absorbida en cuanto que la otra es transmitida por el medio.

➤ **Curva de Crawford**

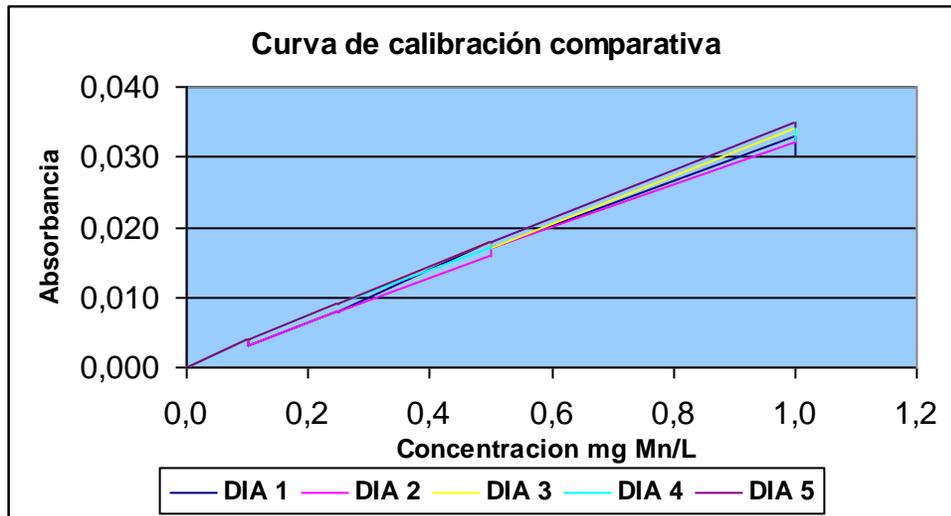


Gráfica 2. Curva de Crawford

La curva de Crawford permite el cálculo del intervalo de mínimo error relativo analítico en concentración, considerando un error de 1% en transmitancia.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Teniendo en cuenta la parte lineal de la curva de Ringbom se construyó la curva de calibración comparativa con un coeficiente de correlación promedio de 0,99845 y una pendiente promedio de 0,03300. Se reporta el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de validación y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.



Grafica 3. Curva de calibración comparativa

Se puede observar las cinco (5) curvas de calibración, cada una de estas elaboradas en días diferentes.

Los coeficientes de correlación de cada una de las gráficas se puede observar en la siguiente tabla:

No. DE ENSAYO Y FECHA	COEFICIENTE DE CORRELACION (r)
No. 1 – 2006 – 03 – 07	0,99617
No. 2 – 2006 – 03 – 08	0,99936
No. 3 – 2006 – 03 – 09	0,99928
No. 4 – 2006 – 03 – 10	0,99787
No. 5 – 2006 – 03 – 11	0,99955

Tabla 4. Resumen de coeficientes de correlación

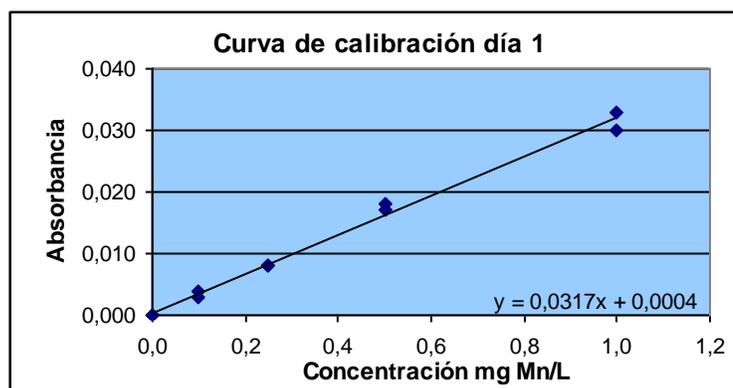
Se observa la concordancia entre cada uno mostrando tendencia al valor de 1 que corresponde a la pendiente de un ángulo de 45°.

➤ **Curvas de calibración por días**

Ensayo No. 1 / 2006 – 03 – 07

No. Ensayo	mg Mn/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
1	0,00	0,004	0,008	0,018	0,033
	0,00	0,003	0,008	0,017	0,030
Pendiente	0,03168				
Intercepto	0,00038				
Correlación	0,99617				

Tabla 5. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 1

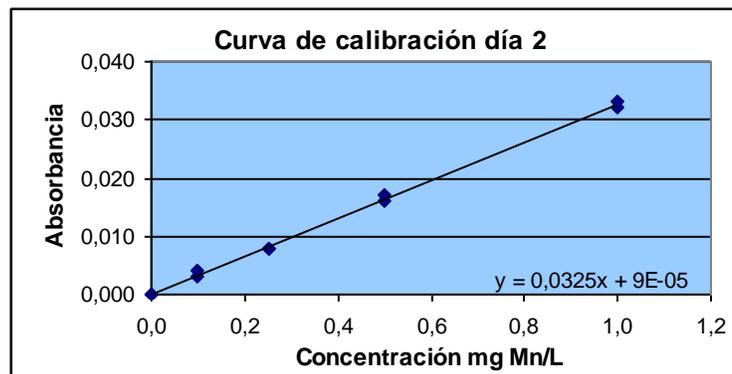


Gráfica 4. Curva de calibración día 1

Ensayo No. 2 / 2006 – 03 – 08

No.	mg Mn/L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
2	0,00	0,004	0,008	0,016	0,032
	0,00	0,003	0,008	0,017	0,033
Pendiente	0,03247				
Intercepto	0,00009				
Correlación	0,99936				

Tabla 6. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 2

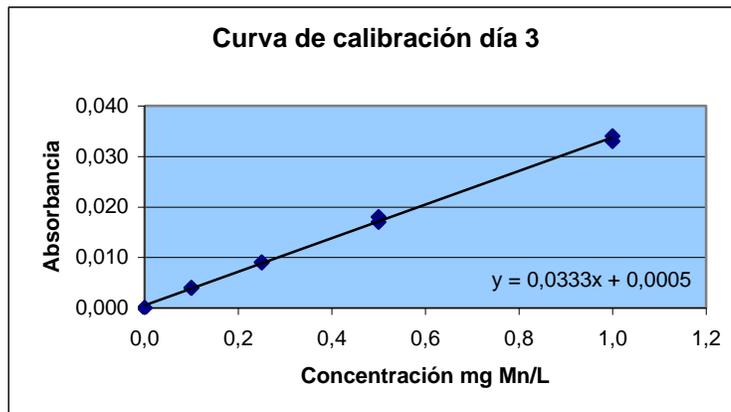


Gráfica 5. Curva de calibración día 2

Ensayo No. 3 / 2006 – 03 – 09

No.	mg Mn/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
3	0,00	0,004	0,009	0,018	0,034
	0,00	0,004	0,009	0,017	0,033
Pendiente	0,03326				
Intercepto	0,00049				
Correlación	0,99936				

Tabla 7. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 3

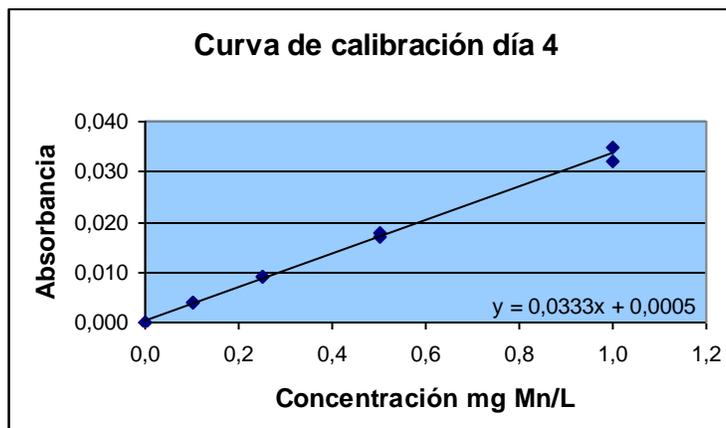


Gráfica 6. Curva de calibración día 3

Ensayo No. 4 / 2006 – 02 – 10

No.	mg Mn/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
1	0,00	0,004	0,009	0,017	0,035
2	0,00	0,004	0,009	0,018	0,032
Pendiente		0,03326			
Intercepto		0,00049			
Correlación		0,99787			

Tabla 8. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 4

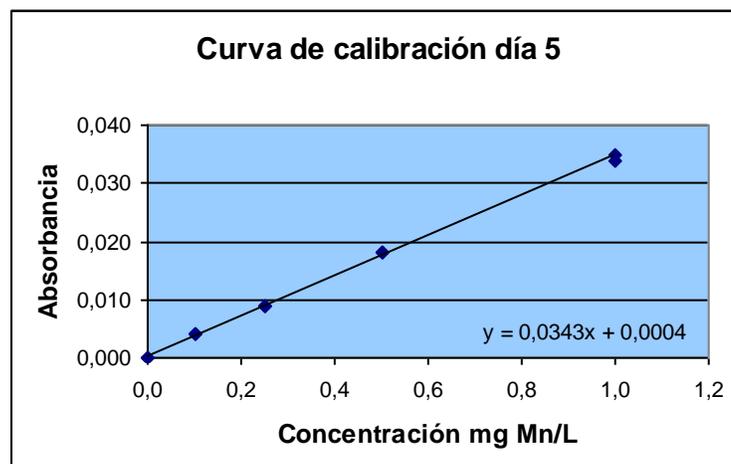


Gráfica 7. Curva de calibración día 4

Ensayo N° 5 / 2006 – 03 – 11

No.	mg Mn/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	0,00	0,004	0,009	0,018	0,035
	0,00	0,004	0,009	0,018	0,034
Pendiente	0,03435				
Intercepto	0,00039				
Correlación	0,99955				

Tabla 9. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 5



Gráfica 8. Curva de calibración día 5

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad del método es la pendiente promedio de las curvas de calibración (curvas de trabajo). En este proceso el valor obtenido fue 0,03300 de sensibilidad de calibración lo que significa que este valor es el factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

Fecha	Pendiente	Coefficiente de correlación
07/03/2008	0,03168	0,99617
08/03/2008	0,03247	0,99926
09/03/2008	0,03226	0,99938
10/03/2008	0,03226	0,99787
11/03/2008	0,03135	0,99955
Promedio	0,03300	0,99845
Desviación estándar	0,00089	0,00144
Sensibilidad calibración	0,03300	

Tabla 10. Parámetros estadísticos de sensibilidad

➤ **Límite de detección y cuantificación**

En la siguiente tabla se muestran los valores de la respuesta del equipo de absorción atómica con llama para manganeso en función del límite de detección y de cuantificación:

CONCENTRACIONES ESTÁNDAR	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (concentración)	ABSORBANCIAS MEDIDAS*1000
0,10	0,05	2
	0,05	2
	0,05	2
	0,05	2
	0,05	2
	0,05	2
	0,05	2
	0,05	2
	0,05	2
	0,05	2
PROMEDIO	0,05	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,02	
LÍMITE DE DETECCIÓN	0,15	
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	0,26	

Tabla 11. Respuesta equipo absorción para el manganeso en función del límite de detección y cuantificación.

Para hallar el dato de **0,05** se tomaron los resultados obtenidos en la lectura de absorbancia para la curva de calibración incluyendo dos (2) que fue el valor leído en el

espectrofotómetro de absorción atómica con llama para una concentración estándar de 0,10 mgMn/L, obteniendo su límite de detección y de cuantificación.

➤ **Análisis de varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza se utilizó con el fin de separar y estimar las diferentes causas de variación. En éste proceso se emplearon los patrones de las curvas de calibración para determinar los parámetros de ANOVA así:

Concentraciones estándar	Absorbancias medidas / 1000	Media
0,10	2,3,4	3
0,25	7,8,9	8
0,50	16,17,18	17
1,0	32,33,34	33
	Media global	15,3

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad
Entre muestras	$n \sum (X_i - \bar{X})^2 = 1563$	$h - 1 = 3$
Dentro de muestras	$\sum \sum (X_{ij} - X_i)^2 = 8$	$h (n - 1) = 8$
Total	$\sum \sum (X_{ij} - \bar{X})^2 = 1571$	$hn - 1 = 11$

ANOVA: de factor único

RESUMEN

Grupos	Frecuencia	Suma	Promedio	Varianza
0,10	3	9	3	1
0,25	3	18	6	1
0,50	3	45	15	1
1,0	3	84	28	1

ANOVA

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	F crit
Entre grupos	1563	3	521	174	5,318
Dentro de grupos	8	8	1		
Total	1571	11			

Tabla 12. Concentraciones estándar para el manganeso por absorción atómica con llama.

El valor crítico $F_{1, 8} = 5,318$ ($P=0,05$). Ya que el valor calculado es mayor que éste se rechaza la hipótesis nula: la media muestral difiere significativamente, es decir los valores tomados de 1 y 8 se determinaron de acuerdo al cuadrado medio (estimación dentro de muestras) y a los grados de libertad (estimación de cada muestra tiene 2 g.l y hay cuatro

(4) muestras lo que me indica ocho (8)) y así se reporta este dato para un 95% de límite de confianza.

Donde:

h: promedio de varianzas muestrales

(n-1): varianza de cada muestra

SC: suma de cuadrados

gl : grados de libertad

CM: cuadrado medio

F: contraste (una o dos colas)

F crítico: valor del número de grados de libertad del denominador VS número de grados de libertad del numerador.

6.12.8 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al obtener los resultados experimentales en la validación del manganeso método de espectrofotometría de absorción atómica con llama no se evidenciaron errores sistemáticos, ni resultados erróneos; aunque hubo presencia de errores aleatorios, que es algo impredecible pues hay resultados que difieren uno del otro en el análisis. Dentro de los parámetros estadísticos calculados durante este proceso se analizó lo siguiente:

➤ Precisión

El parámetro estadístico “precisión”, definiéndolo como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por replicas de una misma muestra, se expresa en términos de la desviación estándar o del coeficiente de variación para concentraciones de soluciones estándares preparadas menores de 1,0 mg Mn/L está por debajo del 8%.

De acuerdo al intervalo de concentración que se tuvo en cuenta para el proceso de validación (0,1 – 1,0 mg Mn/L) se pudo observar que la precisión o reproducibilidad se afecta por los errores aleatorios que provoca que de una manera u otra los resultados cambien, aunque sean pequeños.

El obtener un resultado por debajo del 3% indica que el grado de concordancia entre la muestra y su respectiva replica es buena, pues hay reproducibilidad en el ensayo, así la desviación estándar o su coeficiente de variación que en este caso fue: 0,009 para 0,1 mg Mn/L; 0,008 para 0,25 mg Mn/L; 0,019 para 0,5 mg Mn/L y 0,009 para 1,0 mg Mn/L, nos da el ejemplo de un error relativo que no es más que la comparación de la precisión de estos resultados obtenidos con la definición dada anteriormente.

➤ Exactitud

Respecto al parámetro estadístico de “exactitud”, definiéndolo en términos de porcentaje de error relativo, para los estándares de concentraciones menores de 1,0 mg Mn/L utilizadas en este proceso de validación se puede decir que este porcentaje de error esta en el rango de 0,667 y 3,700%.

Este porcentaje de error relativo tan bajo revela y confirma la buena exactitud de la técnica para la determinación de manganeso por el método de absorción atómica con llama.

Curva de calibración

➤ **Curva de Ringbom**

La curva de Ringbom obtenida (**GRÁFICO No.1**) muestra la tendencia sigmoideal aplicada a las cuatro (4) concentraciones estándar de 0,1; 0,25; 0,5 y 1,0 mg Mn/L, principalmente en el intervalo de concentración de 0,5 a 1,0 mg Mn/L en el que se cumple la ley de Beer, al no tener desvíos esto quiere decir que no se presentaron desvíos según la ley de Beer, los desvíos enunciados en dicha ley se deben a factores físicos, químicos e instrumentales, llegando a ocurrir el caso el más frecuente es el factor instrumental que es atribuido a la radiación policromática, selección inadecuada de la longitud de onda, fuente de radiación inestable, detectores deficientes y defectos en la parte óptica para la espectrofotometría de absorción atómica con llama, lo que significa que para el proceso de manganeso está dentro de las especificaciones requeridas.

➤ **Curva de Crawford**

La medida de la transmitancia esta sujeta a una incerteza llamada error relativo de concentración.

El intervalo en que los resultados producen menor error relativo están entre 0,4 a 0,7 o del 20 al 60% de T (Transmitancia). Para la curva de Crawford obtenida no se aprecia muy bien pues su tendencia es en forma de U, que se debió a los pocos datos de concentración estándar de la muestra tomados para el proceso de validación.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Se puede notar una buena concordancia entre ellas, aunque se observa diferencia entre los días 2 y 5 (**Gráfica No 3 y Tabla No 4**), que obedeció posiblemente a elementos que afectaron la sensibilidad como:

Paso óptico (ajuste de la longitud de onda, lámpara, amplitud de abertura del diafragma).

- Llama (ajuste de nebulizador, de gases, de quemador rotacional, de profundidad del quemador).
- Absorbancia (velocidad de aspiración del material por la llama).

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad se calcula como el promedio de las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.

La sensibilidad resulta del promedio de la pendiente de la curva de calibración \pm desviación estándar ($0,03300 \pm 0,00089$). El valor a reportar es de 0,03300, lo que significa que este valor corresponde al factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

➤ **Límite de detección**

El límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que puede leer el espectrofotómetro Perkin Elmer 2380 de acuerdo con las concentraciones estándar que se escogieron para la validación, se tomó la menor y se leyó. Se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de manganeso por el método de absorción atómica con llama, utilizando el equipo del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** Perkin Elmer modelo 2380 con base a los patrones de la curva de calibración, se estableció el límite en 0,15 mg Mn/L, para una concentración de 0,1 mg Mn/L, obteniéndose una absorbancia de dos (2) en la lectura de las respectivas muestras para esta concentración; esto significa que es lo mínimo que puede leer el equipo a esta concentración para el manganeso.

➤ **Límite de cuantificación**

El “límite de cuantificación” (o límite de determinación), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleó para el límite de detección, solo que esta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración cuantificable del estándar

S_B : Desviación estándar

Se determinó para la validación del manganeso método de absorción atómica por llama el límite de cuantificación en 0,26 mg Mn/L, para 0,1 mg Mn/L lo que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, este valor obtenido nos indica que a esta concentración dada el equipo puede cuantificarlo, de ahí en adelante se hace más difícil apreciar y valorar este dato, pues de una manera u otra lo que se busca es minimizar los errores que el método presenta en cuanto a la precisión y la exactitud.

➤ **Linealidad**

Hace referencia a la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento. Para la determinación de la linealidad se necesita de la tabla de valores de la

distribución T para calcular LC 95%, después de haber calculado ANOVA para la variación dentro y entre muestras, reportándose 2,78 para $P=0,05$.

Este valor se toma de acuerdo a los grados de libertad ($n-1$), es decir cuatro (4) concentraciones estándar tratadas en el proceso de validación, se determina según el contraste (una cola o dos colas), en este caso fue contraste de una cola, pues se utilizó un solo método absorción atómica con llama lo que significa que 2,78 es el dato que se reporta como lineal en la señal que muestra el instrumento para un 95% de confianza.

➤ **Análisis de varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza se define como una técnica estadística muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación.

La hipótesis nula se rechaza cuando la variación entre muestras es mayor que la variación dentro de las muestras.

Normalmente la hipótesis nula se rechaza cuando la probabilidad de que dicha diferencia observada ocurra por azar es menor que 1 en 20 veces (es decir, 0,05 ó 5%). En este caso se dice que la diferencia **es significativa al nivel 0,05 (ó 5%)**. Esto significa que se realiza con un límite de confianza del 95% que es con lo que se trabajó en el proceso de validación.

2.13.9. CONCLUSIONES

La longitud de onda óptima para realizar la determinación de manganeso por el método espectrofotométrico de absorción atómica con llama es de 279,4 nm.

- Según la curva de Ringbom los datos óptimos, se encuentran en la sección recta correspondiente al ciclo logarítmico entre concentraciones de 0,5 y 1,0 mg/L.
- La curva de calibración comparativa para concentraciones de 0,0 a 1,0 mg Mn/L presenta un coeficiente de correlación de 0,99845 confirmando una buena relación entre la concentración y la absorbancia.
- El método presenta una sensibilidad de 0,03300, la cual corresponde a la mínima cantidad de manganeso que puede producir un resultado significativo.
- El límite de detección para la determinación de manganeso por el método de absorción atómica con llama es 0,15 mg Mn/L. Este límite es la concentración mínima que pudo ser medida con una exactitud aceptable, para una concentración estándar de 0,1 mg Mn/L.
- El límite de cuantificación que se determinó para el manganeso fue de 0,26 mg Mn/L siendo esta la menor cantidad de analito que pudo determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, para una concentración estándar de 0,1mg Mn/L.
- La linealidad que registra el método en base de la tabla de límite de confianza para un 95% es 2,78 para $P=0,05$, con $n-1$ grados de libertad. Este dato se tomó como valor crítico de t para contraste de una cola, pues se empleó un solo método

para llevar a cabo el proceso de validación y es el único dato que se reporta pues es específico para cuatro (4) muestras (concentraciones estándar).

- El análisis de varianza (ANOVA) para la determinación de cadmio por el método de absorción atómica con llama, bajo la hipótesis nula se estimó de dos formas: una la variación dentro de muestras y la otra la variación entre muestras obteniéndose lo siguiente: cuadrado medio dentro de las muestras = 1 con 8 g.l ; cuadrado medio entre muestras = 521 con 3 g.l con un valor de 5,318 para el contraste de una cola, lo que significa que la hipótesis nula se rechaza porque la variación entre muestras es mayor que la variación dentro de las muestras tomándose 1 con 8 g.l para la posible ubicación del dato a reportar, esto se hizo con el fin de separar y estimar las diferentes causas de variación que pueden conducir a diferencias significativas entre los valores medios obtenidos.

6.13 VALIDACIÓN DE NIQUEL MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA

6.13.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y análisis de varianza (ANOVA), que servirán como criterios de confianza para la determinación de níquel por el método de absorción atómica con llama.

6.13.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

El níquel es común en el agua potable, poco tóxico.

El metal presente en soluciones es determinado usando la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica con llama. La muestra sólida (roca, mineral, aleación, tejido foliar, materia prima, etc.) o líquida (agua o soluciones) es tratada de manera especial ya sea con ácido nítrico (HNO_3) solamente o primeramente con ácido nítrico (HNO_3) para destruir completamente la materia orgánica y después con ácido perclórico (HClO_4) para solubilizar totalmente el metal presente, excepto la sílice, ya que ésta se solubiliza con ácido fluorhídrico (HF). Existen métodos o procedimientos para poner en solución diferentes tipos de matrices sólidas. El Decreto 475 de 1998 del Ministerio de Salud "NORMAS TÉCNICAS DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE" da un valor de 0,02 mg/L para níquel en agua potable y de 0,1 mg/L para agua segura.

6.13.3 REACTIVOS

La concentración de ácido no es crítica en la concentración final en la muestra.

- **Solución patrón de níquel de 1000 µg/mL:** preferiblemente un titrisol y/o fizanal con certificado de pureza de la firma fabricante.
- Soluciones estándares de 0,5; 1,0; 2,5 y 5,0 µg Ni/mL
- Ácido nítrico HNO_3 conc y Ácido perclórico HClO_4 conc.
- Agua destilada – desmineralizada
-

6.13.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer modelo 2380
- Lámpara de cátodo hueco para níquel (Ni)

- Gases (Aire – acetileno), suministrado por Cryogas S.A.
- Balones aforados de 25, 50 y 100 mL marca Brand
- Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 25 mL marca Brand
- Vasos volumétricos de 100 mL marca Brand
- Probetas de 50 y 100 mL marca Brand
- Balones fondo redondo marca Brand.
- Filtros
- Embudos filtrantes

6.13.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de aguas, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th Edition de 1995".

Se deben de tener en cuenta las siguientes condiciones para el trabajo con el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 2380:

- El Mechero o quemador de 10 cm: debidamente alineado con el haz
- Longitud de onda: 231,8 nm
- Slit o rendija del monocromador: 0,2nm
- Corriente de la lámpara : 33 mA
- Voltaje del fototubo: 70-75
- Relación de gases: aire-acetileno (30 : 20)

Serie de la lámpara de cátodo hueco y su respectiva marca: 359890 PERKIN ELMER.

Supresor de interferencia: no presenta interferencias.

- Eliminar de la muestra, partículas flotantes grandes o aglomerados dispersos de material no homogéneo.
- Usar frascos de vidrio resistente o plástico, lavados con una solución de ácido nítrico (HNO_3) 1:1, en los que el material en suspensión no se adhiera a las paredes del recipiente.
- Filtrar inmediatamente para metales disueltos y añadir ácido nítrico (HNO_3) hasta $\text{pH} < 2$.

- Refrigerar la muestra a 4°C hasta el momento del análisis para minimizar la descomposición microbiológica de los sólidos. Antes de iniciar el análisis, llevar las muestras a temperatura ambiente.
- Alinear el haz emitido por la lámpara de cátodo hueco sobre el quemador o mechero.
- Considerar la respuesta de la lámpara de cátodo hueco, así como la corriente con respecto al voltaje del fototubo.
- Seleccionar la máxima longitud de onda con respecto al voltaje del fototubo.
- Aspiración correcta del capilar ubicado en la parte externa de la cámara de nebulización.
- Tipo de llama obtenida al mezclar los gases (Para el níquel (Ni) debe ser oxidante: aire-acetileno). **Llama obtenida azul.**
- Volumen mínimo de muestra por análisis de 500mL

6.13.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de níquel se siguió el procedimiento 3500 (A-B) descrito en el protocolo para análisis de aguas Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 19. El siguiente fue el grupo básico de muestras que se leyó durante 5 ensayos con su respectiva réplica de los que consta el proceso de validación.

Bk: Blanco de agua

Eb: Estándar de níquel de concentración baja = 0,5 mg Ni/L

Emb: Estándar de níquel de concentración media baja = 1,0 mg Ni/L

Em: Estándar de níquel de concentración media alta = 2,5 mg Ni /L

Ea: Estándar de níquel de concentración alta = 5,0 mg Ni/L

El proceso de validación se inició el día siete (7) de marzo a las 10 h: 00min, los estándares de concentración baja, media y alta se prepararon el primer día; a partir de una solución patrón de 1000 ppm de níquel.

6.13.7 RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la validación de níquel método de absorción atómica con llama se muestra a continuación:

Cálculo para muestras líquidas (metal disuelto o soluble)

- Expresión matemática:

$$\mu\text{g/mL} = C_0 \frac{V_f}{V_0} \frac{V_1}{V_a}$$

Donde:

C_0 = Concentración en $\mu\text{g/mL}$ dado por la curva de calibración

V_0 = Volumen de muestra inicial, mL

V_f = Volumen de muestra final después de ser concentrada, mL

V_a = Volumen de alícuota tomada a partir de V_f , mL

V_1 = Volumen al cual se llevó la alícuota V_a , mL.

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	mg Ni/L				
		BF	Eb	Emb	Ema	Ea
	1	0,00	0,602	0,944	2,570	4,966
		0,00	0,643	0,914	2,541	4,982
	2	0,00	0,602	1,012	2,572	4,952
		0,00	0,581	0,894	2,613	4,957
	3	0,00	0,563	0,931	2,551	4,982
		0,00	0,604	0,982	2,497	4,995
	4	0,00	0,650	0,945	2,640	4,926
		0,00	0,682	0,984	2,495	4,987
	5	0,00	0,671	0,972	2,553	4,962
		0,00	0,667	0,978	2,607	4,934
Promedio		-	0,627	0,956	2,564	4,964
Desviación estándar		-	0,041	0,036	0,047	0,023
Número de datos		10	10	10	10	10
Mínimo		-	0,563	0,894	2,495	4,926
Máximo		-	0,682	1,012	2,640	4,995
Intervalo		-	0,119	0,118	0,145	0,069
Tbajo		-	1,538	1,699	1,455	1,679
Talto		-	1,345	1,555	1,607	1,346
T teórico		2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: La **TABLA 1.** Presenta los parámetros estadísticos de los resultados analíticos antes de aplicar el criterio de rechazo de datos, se eliminan los datos resaltados con negrilla.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para $n=10$, donde n es el número de muestras. El valor reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	mg Ni/L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
mg Ni/L teórico		0	0,5	1,0	2,5	5,0
	1	0,00	0,602	0,944	2,570	4,966
		0,00	0,643	0,914	2,541	4,982
	2	0,00	0,602		2,572	4,952
		0,00	0,581	0,894	2,613	4,957
	3	0,00	0,563	0,931	2,551	4,982
		0,00	0,604	0,982	2,497	4,995
	4	0,00	0,650	0,945	2,640	4,926
		0,00		0,984	2,495	4,987
	5	0,00		0,972	2,553	4,962
		0,00	0,667	0,978	2,607	4,934
Promedio		-	0,491	0,949	2,564	4,964
Desviación estándar		-	0,036	0,032	0,047	0,023
%CV		-	7,310	3,393	1,848	0,459
%Error		-	1,760	5,067	2,556	0,714

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

➤ Respuesta del instrumento en función de la concentración de níquel

La tabla que se muestra a continuación, representa los datos obtenidos al realizar la curva de calibración del níquel en un intervalo de concentración entre 0,0 y 5,0 mgNi /L.

Concentración mg/L	Abs	% T	log C	Abst	T	$(\Delta C/C)/\Delta T^1$
0,0	0,00	100,00		0,00	1,00	
0,5	0,009	97,949	-0,301	2,051	0,979	49,232
1,0	0,013	97,051	0,000	2,949	0,971	34,399
2,5	0,034	92,470	0,398	7,530	0,925	13,804
5,0	0,064	86,298	0,699	13,702	0,863	7,858

Tabla 3. Respuesta del Instrumento en Función de la concentración del Níquel

¹ Error relativo considerado para 1% de error de transmitancia

Abs : Absorbancia
%T : Porcentaje de transmitancia
Log C : Logaritmo de la concentración
Abs. : Absortividad
T : Transmitancia.

$$\%T = 10^{(2 - Abs)}$$

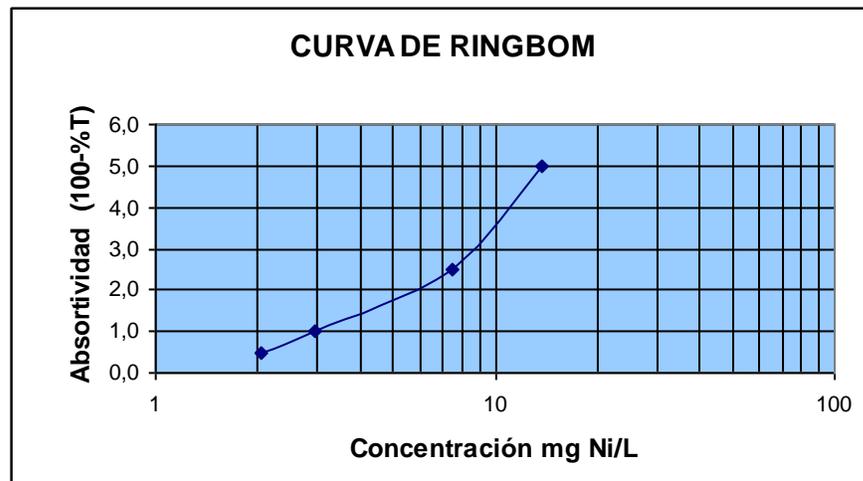
$$T = \%T/100$$

$$Abst = 100 - \%T$$

$$(\Delta C/C)/\Delta T = 0,434 / (T \log T)$$

➤ **Curva de Ringbom**

A partir de los datos de absorbancia en función de la concentración se construyó la curva de Ringbom:

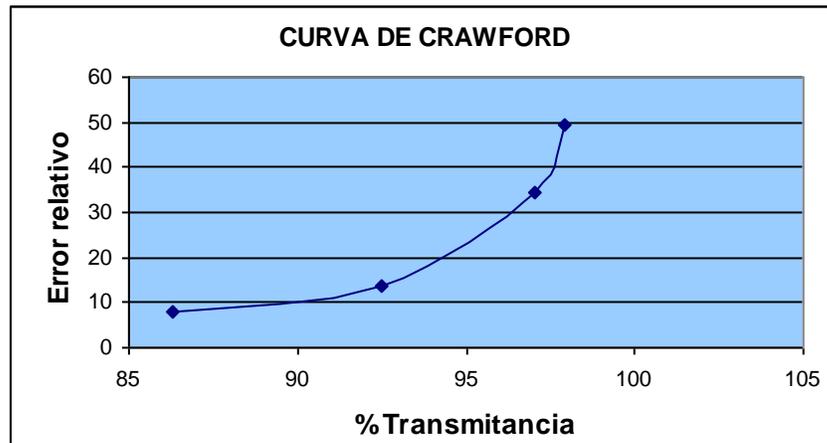


Gráfica 1. Curva de Ringbom

La **Gráfica 1** muestra la absortividad o porcentaje de absorción en función de la concentración donde se obtiene una curva de forma sigmoidal llamada la curva de Ringbom, que es usada para definir el intervalo de concentración donde se cumple la ley de Beer.

La ley de Lambert Beer nos dice que cuando un eje de radiación monocromático atraviesa una solución que contiene una especie absorbente, una parte de la radiación es absorbida en cuanto que la otra es transmitida por el medio.

➤ **Curva de Crawford**

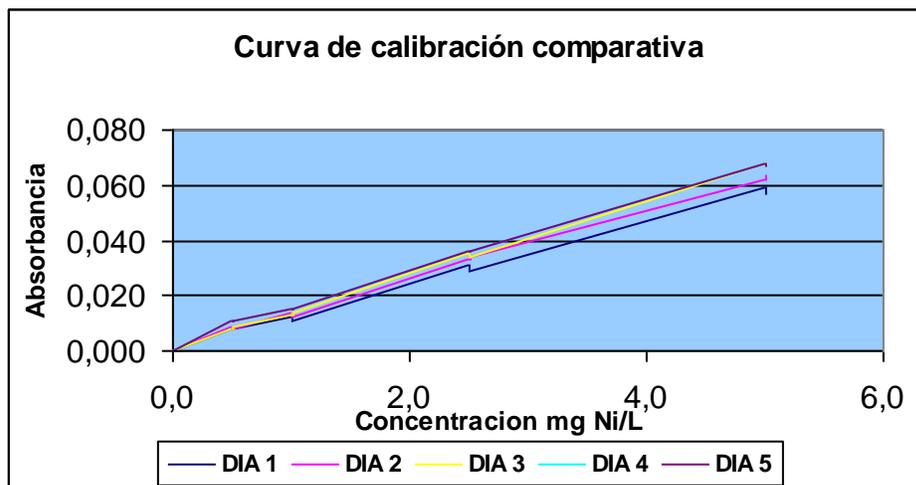


Gráfica 2. Curva de Crawford

La curva de Crawford permite el cálculo del intervalo de mínimo error relativo analítico en concentración, considerando un error de 1% en transmitancia.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Teniendo en cuenta la parte lineal de la curva de Ringbom se construyó la curva de calibración comparativa con un coeficiente de correlación promedio de 0,99837 y una pendiente promedio de 0,01270. Se reporta el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de validación y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.



Gráfica 3. Curva de calibración comparativa

Se puede observar las cinco (5) curvas de calibración, cada una de estas elaboradas en días diferentes.

Los coeficientes de correlación de cada una de las gráficas se puede observar en la siguiente tabla:

No. DE ENSAYO Y FECHA	COEFICIENTE DE CORRELACION (r)
No. 1 – 2006 – 03 – 07	0,99825
No. 2 – 2006 – 03 – 08	0,99861
No. 3 – 2006 – 03 – 09	0,99946
No. 4 – 2006 – 03 – 10	0,99776
No. 5 – 2006 – 03 – 11	0,99775

Tabla 4. Resumen de coeficientes de correlación

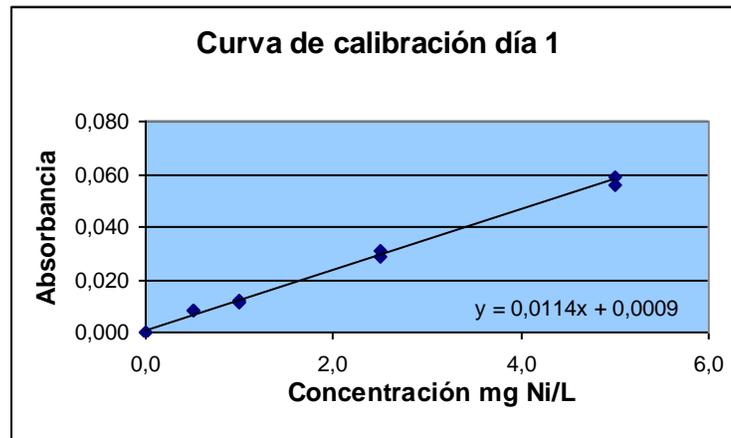
Se observa la concordancia entre cada uno mostrando tendencia al valor de 1 que corresponde a la pendiente de un ángulo de 45°.

➤ **Curvas de calibración por días**

Ensayo No. 1 / 2006 – 03 – 07

No.	mg Ni/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	0,00	0,008	0,012	0,031	0,059
	0,00	0,008	0,011	0,029	0,056
Pendiente	0,01137				
Intercepto	0,00093				
Correlación	0,99825				

Tabla 5. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 1

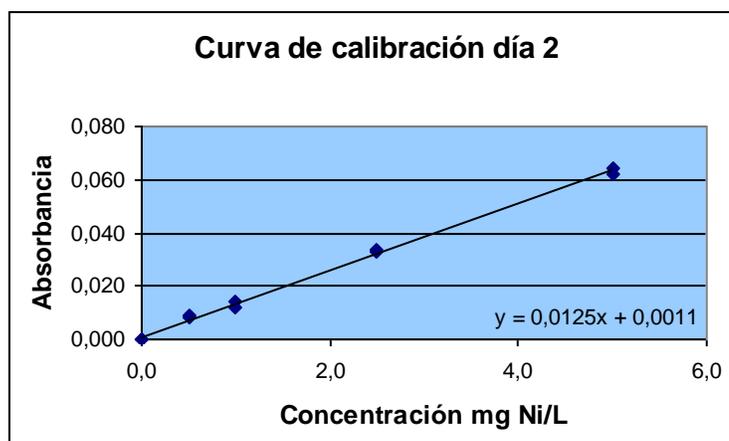


Gráfica 4. Curva de calibración día 1

Ensayo No. 2 / 2006 – 02 – 08

No.	mg Ni/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
2	0,00	0,009	0,014	0,033	0,062
	0,00	0,008	0,012	0,034	0,064
Pendiente	0,01249				
Intercepto	0,00112				
Correlación	0,99861				

Tabla 6. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 2

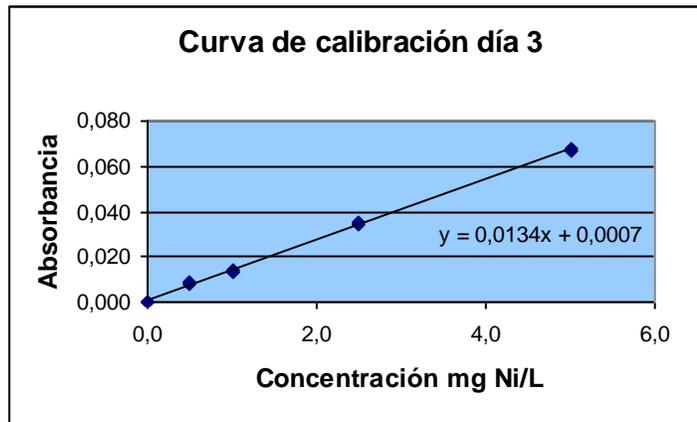


Gráfica 5. Curva de calibración día 2

Ensayo No. 3 / 2006 – 02 – 09

No.	mg Ni/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
3	0,00	0,008	0,013	0,035	0,068
	0,00	0,009	0,014	0,034	0,067
Pendiente	0,01339				
Intercepto	0,00069				
Correlación	0,99946				

Tabla 7. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 3

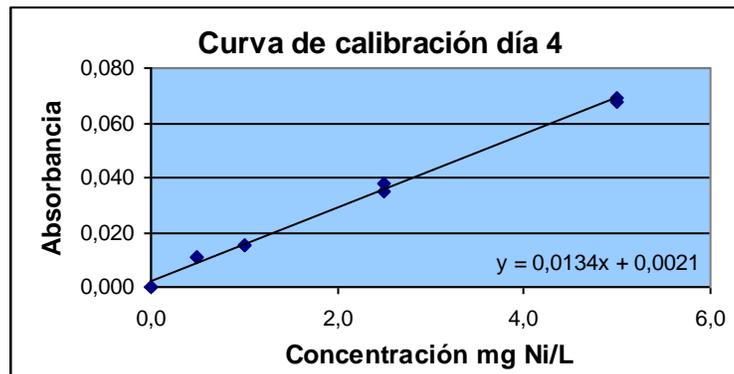


Gráfica 6. Curva de calibración día 3

Ensayo No. 4 / 2006 – 03 – 10

No.	mg Ni/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
1	0,00	0,011	0,015	0,038	0,069
2	0,00	0,011	0,015	0,035	0,068
Pendiente	0,01340				
Intercepto	0,00208				
Correlación	0,99776				

Tabla 8. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 4

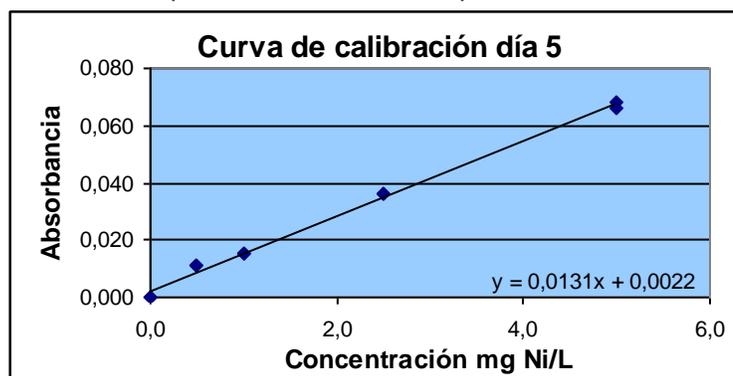


Gráfica 7. Curva de calibración día 4

Ensayo N° 5 / 2006 – 03 – 11

No.	mg Ni/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	0,00	0,011	0,015	0,036	0,068
	0,00	0,011	0,015	0,036	0,066
Pendiente	0,01309				
Intercepto	0,00225				
Correlación	0,99775				

Tabla 9. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 5



Gráfica 8. Curva de calibración día 5

➤ Sensibilidad del método

La sensibilidad del método es la pendiente promedio de las curvas de calibración (curvas de trabajo). En este proceso el valor obtenido fue 0,01275 de sensibilidad de calibración lo que significa que este valor es el factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

Fecha	Pendiente	Coefficiente de correlación
07/03/2006	0,01137	0,99825
08/03/2006	0,01249	0,99861
09/03/2006	0,01339	0,99946
10/03/2006	0,01340	0,99776
11/06/2006	0,01309	0,99775
Promedio	0,01275	0,99837
Desviación estándar	0,00076	0,00071
Sensibilidad calibración	0,01275	

Tabla 10. Parámetros estadísticos de sensibilidad

➤ **Límite de detección y cuantificación**

En la siguiente tabla se muestran los valores de la respuesta del equipo de absorción atómica con llama para níquel en función del límite de detección y de cuantificación:

CONCENTRACIONES ESTÁNDAR	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (concentración)	ABSORBANCIAS MEDIDAS*1000
0,2	0,07	2
	0,07	2
	0,07	2
	0,07	2
	0,07	2
	0,07	2
	0,07	2
	0,07	2
	0,07	2
	0,07	2
PROMEDIO	0,07	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,04	
LÍMITE DE DETECCIÓN	0,32	
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	0,59	

Tabla 11. Respuesta equipo absorción para el níquel en función del límite de detección y cuantificación.

Para hallar el dato de **0,07** se tomaron los resultados obtenidos en la lectura de absorbancia para la curva de calibración incluyendo 2 que fue el valor leído en el espectrofotómetro de absorción atómica con llama para una concentración estándar de 0,20 mgNi/L, obteniendo su límite de detección y de cuantificación.

➤ **Análisis de varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza se utilizó con el fin de separar y estimar las diferentes causas de variación. En éste proceso se emplearon los patrones de las curvas de calibración para determinar los parámetros de ANOVA así:

Concentraciones estándar	Absorbancias medidas / 1000	Media
0,50	7,8,9	8
1,0	13,14,15	14
2,5	33,34,35	34
5,0	66,67,68	67
	Media global	30,8

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad
Entre muestras	$n \sum (X_i - \bar{X})^2 = 14160$	$h - 1 = 3$
Dentro de muestras	$\sum \sum (X_{ij} - X_i)^2 = 8$	$h (n - 1) = 8$
Total	$\sum \sum (X_{ij} - \bar{X})^2 = 14168$	$hn - 1 = 11$

ANOVA: de factor único

RESUMEN					
Grupos	Frecuencia	Suma	Promedio	Varianza	
0,50	3	9	3	1	
1,0	3	18	6	1	
2,5	3	45	15	1	
5,0	3	84	28	1	
ANOVA					
Fuente de variación	SC	gl	CM	F	F crit
Entre grupos	14160	3	4720	708	5,318
Dentro de grupos	8	8	1		
Total	14168	11			

Tabla 12. Concentraciones estándar para el níquel por absorción atómica con llama.

El valor crítico $F_{1, 8} = 5,318$ ($P=0,05$). Ya que el valor calculado es mayor que éste se rechaza la hipótesis nula: la media muestral difiere significativamente, es decir los valores tomados de 1 y 8 se determinaron de acuerdo al cuadrado medio (estimación dentro de muestras) y a los grados de libertad (estimación de cada muestra tiene 2 g.l y hay cuatro (4) muestras lo que me indica ocho (8)) y así se reporta este dato para un 95% de límite de confianza.

Donde:

h: promedio de varianzas muestrales

(n-1): varianza de cada muestra

SC: suma de cuadrados

gl : grados de libertad

CM: cuadrado medio

F: contraste (una o dos colas)

F crítico: valor del número de grados de libertad del denominador VS número de grados de libertad del numerador.

6.13.8 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al obtener los resultados experimentales en la validación del níquel método de espectrofotometría de absorción atómica con llama no se evidenciaron errores sistemáticos, ni resultados erróneos; aunque hubo presencia de errores aleatorios, que es algo impredecible pues hay resultados que difieren uno del otro en el análisis. Dentro de los parámetros estadísticos calculados durante este proceso se analizó lo siguiente:

➤ Precisión

El parámetro estadístico "precisión", definiéndolo como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por replicas de una misma muestra, se expresa en términos de la

desviación estándar o del coeficiente de variación para concentraciones de soluciones estándares preparadas menores de 5,0 mg Ni/L está por debajo del 7%.

De acuerdo al intervalo de concentración que se tuvo en cuenta para el proceso de validación (0,5 – 5,0 mg Ni/L) se pudo observar que la precisión o reproducibilidad se afecta por los errores aleatorios que provoca que de una manera u otra los resultados cambien, aunque sean pequeños.

El obtener un resultado por debajo del 7% indica que el grado de concordancia entre la muestra y su respectiva replica es buena, pues hay reproducibilidad en el ensayo, así la desviación estándar o su coeficiente de variación que en este caso fue: 0,036 para 0,5 mg Ni/L; 0,032 para 1,0 mg Ni/L; 0,047 para 2,5 mg Ni/L y 0,023 para 5,0 mg Ni/L, nos da el ejemplo de un error relativo que no es más que la comparación de la precisión de estos resultados obtenidos con la definición dada anteriormente.

➤ **Exactitud**

Respecto al parámetro estadístico de “exactitud”, definiéndolo en términos de porcentaje de error relativo, para los estándares de concentraciones menores de 5,0 mg Ni/L utilizadas en este proceso de validación se puede decir que este porcentaje de error esta en el rango de 0,714 y 5,067%.

Este porcentaje de error relativo tan bajo revela y confirma la buena exactitud de la técnica para la determinación de níquel por el método de absorción atómica con llama.

Curva de calibración

➤ **Curva de Ringbom**

La curva de Ringbom obtenida (**GRÁFICO No.1**) muestra la tendencia sigmoideal aplicada a las cuatro (4) concentraciones estándar de 0,5; 1,0; 2,5 y 5,0 mg Ni/L, principalmente en el intervalo de concentración de 2,5 a 5,0 mg Ni/L en el que se cumple la ley de Beer, al no tener desvíos esto quiere decir que no se presentaron desvíos según la ley de Beer, los desvíos enunciados en dicha ley se deben a factores físicos, químicos e instrumentales, llegando a ocurrir el caso el más frecuente es el factor instrumental que es atribuido a la radiación policromática, selección inadecuada de la longitud de onda, fuente de radiación inestable, detectores deficientes y defectos en la parte óptica para la espectrofotometría de absorción atómica con llama, lo que significa que para el proceso de níquel está dentro de las especificaciones requeridas.

➤ **Curva de Crawford**

La medida de la transmitancia esta sujeta a una incerteza llamada error relativo de concentración.

El intervalo en que los resultados producen menor error relativo están entre 0,4 a 0,7 o del 20 al 60% de T (Transmitancia). Para la curva de Crawford obtenida no se aprecia

muy bien pues su tendencia es en forma de U, que se debió a los pocos datos de concentración estándar de la muestra tomados para el proceso de validación.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Se puede notar que no hay una buena concordancia entre los cinco (5) días consecutivos, de la validación (**Gráfica No 3 y Tabla No 4**), que obedeció posiblemente a elementos que afectaron la sensibilidad como:

Paso óptico (ajuste de la longitud de onda, lámpara, amplitud de abertura del diafragma).

- Llama (ajuste de nebulizador, de gases, de quemador rotacional, de profundidad del quemador).
- Absorbancia (velocidad de aspiración del material por la llama).

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad se calcula como el promedio de las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.

La sensibilidad resulta del promedio de la pendiente de la curva de calibración \pm desviación estándar ($0,01275 \pm 0,00076$). El valor a reportar es de 0,01275, lo que significa que este valor corresponde al factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

➤ **Límite de detección**

El límite de detección (LOD) de una analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que puede leer el espectrofotómetro Perkin Elmer 2380 de acuerdo con las concentraciones estándar que se escogieron para la validación, se tomo la menor y se leyó. Se determino de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de níquel por el método de absorción atómica con llama, utilizando el equipo del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** Perkin Elmer modelo 2380 con base a los patrones de la curva de calibración, se estableció el límite en 0,32 mg Ni/L, para una concentración de 0,2 mg Ni/L, obteniéndose una absorbancia de dos (2) en la lectura de las respectivas muestras para esta concentración; esto significa que es lo mínimo que puede leer el equipo a esta concentración para el níquel.

➤ **Límite de cuantificación**

El “límite de cuantificación” (o límite de determinación”), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleo para el límite de detección, solo que esta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración cuantificable del estándar

S_B : Desviación estándar

Se determinó para la validación del níquel método de absorción atómica por llama el límite de cuantificación en 0,59 mg Ni/L, para 0,2 mg Ni/L lo que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, este valor obtenido nos indica que a esta concentración dada el equipo puede cuantificarlo, de ahí en adelante se hace más difícil apreciar y valorar este dato, pues de una manera u otra lo que se busca es minimizar los errores que el método presente en cuanto a la precisión y la exactitud.

➤ **Linealidad**

Hace referencia a la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento. Para la determinación de la linealidad se necesito de la tabla de valores de la distribución T para calcular LC 95%, después de haber calculado ANOVA para la variación dentro y entre muestras, reportándose 2,78 para $P=0,05$.

Este valor se toma de acuerdo a los grados de libertad (n-1), es decir cuatro (4) concentraciones estándar tratadas en el proceso de validación, se determina según el contraste (una cola o dos colas), en este caso fue contraste de una cola, pues se utilizo un solo método absorción atómica con llama lo que significa que 2,78 es el dato que se reporta como lineal en la señal que muestra el instrumento para un 95% de confianza.

➤ **Análisis de varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza se define como una técnica estadística muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación.

La hipótesis nula se rechaza cuando la variación entre muestras es mayor que la variación dentro de las muestras.

Normalmente la hipótesis nula se rechaza cuando la probabilidad de que dicha diferencia observada ocurra por azar es menor que 1 en 20 veces (es decir, 0,05 ó 5%). En este caso se dice que la diferencia **es significativa al nivel 0,05 (ó 5%)**. Esto significa que se realiza con un límite de confianza del 95% que es con lo que se trabajo en el proceso de validación.

2.14.9. CONCLUSIONES

- La longitud de onda óptima para realizar la determinación de níquel por el método espectrofotométrico de absorción atómica con llama es de 248,3nm.
- Según la curva de Ringbom los datos óptimos, se encuentran en la sección recta correspondiente al ciclo logarítmico entre concentraciones de 2,5 y 5,0mg/L.
- La curva de calibración comparativa para concentraciones de 0,0 a 5,0 mg Ni/L presenta un coeficiente de correlación de 0,99837 confirmando una buena relación entre la concentración y la absorbancia.
- El método presenta una sensibilidad de 0,01275, la cual corresponde a la pendiente de la curva de calibración que puede producir un resultado significativo.
- El límite de detección para la determinación de níquel por el método de absorción atómica con llama es 0,32 mg Ni/L. Este límite es la concentración mínima que pudo ser medida con una exactitud aceptable, para una concentración estándar de 0,20 mg Ni/L.
- El límite de cuantificación que se determinó para el níquel fue de 0,59 mg Ni/L siendo esta la menor cantidad de analito que pudo determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, para una concentración estándar de 0,20 mg Ni/L.
- La linealidad que registra el método en base de la tabla de límite de confianza para un 95% es 2,78 para $P=0,05$, con $n-1$ grados de libertad. Este dato se tomo como valor crítico de t para contraste de una cola, pues se empleo un solo método para llevar a cabo el proceso de validación y es el único dato que se reporta pues es específico para cuatro (4) muestras (concentraciones estándar).
- El análisis de varianza (ANOVA) para la determinación de cadmio por el método de absorción atómica con llama, bajo la hipótesis nula se estimo de dos formas: una la variación dentro de muestras y la otra la variación entre muestras obteniéndose lo siguiente: cuadrado medio dentro de las muestras = 1 con 8 g.l ; cuadrado medio entre muestras = 4720 con 3 g.l con un valor de 5,318 para el contraste de una cola, lo que significa que la hipótesis nula se rechaza porque la variación entre muestras es mayor que la variación dentro de las muestras tomándose 1 con 8 g.l para la posible ubicación del dato a reportar, esto se hizo con el fin de separar y estimar las diferentes causas de variación que pueden conducir a diferencias significativas entre los valores medios obtenidos.

6.14 VALIDACIÓN DE PLOMO MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA

6.14.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y análisis de varianza (ANOVA), que servirán como criterios de confianza para la determinación de plomo por el método de absorción atómica con llama.

6.14.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

Aguas naturales contienen más de 5µg/L de plomo, este proviene de descargas industriales, mineras, de fundición o de disoluciones de tuberías viejas.

El plomo aparece principalmente en el agua potable a partir de la corrosión del tubo de plomo y de las soldaduras y grifos construidos con bronce o cobre emplomado, especialmente en zonas de agua blanda o ácida.

El Decreto 475 de 1998 del Ministerio de Salud "NORMAS TÉCNICAS DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE" da un valor de 0,01 mg/L para plomo en agua potable y de 0,02 mg/L para agua segura.

6.14.3 REACTIVOS

La concentración de ácido no es crítica en la concentración final en la muestra.

- **Solución patrón de plomo de 1000 µg/mL:** preferiblemente un titrisol y/o fizanal con certificado de pureza de la firma fabricante.
- Soluciones estándares de 0,5; 1,0; 2,5 y 5,0 µg Pb/mL
- Ácido nítrico HNO_{3 conc} y Ácido perclórico HClO_{4 conc}.
- Agua destilada – desmineralizada

6.14.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer modelo 2380
- Lámpara de cátodo hueco para plomo (Pb)
- Gases (aire-acetileno grado absorción atómica) suministrado por Cryogas S.A.
- Balones aforados de 25; 50 y 100 mL marca Brand

- Pipetas volumétricas de 1; 5; 10 y 25 mL marca Brand
- Vasos volumétricos de 100 mL marca Brand
- Probetas de 50 y 100 mL marca Brand
- Balones fondo redondo marca Brand.
- Filtros
- Embudos filtrantes

6.14.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de aguas, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th Edition de 1995".

Se deben de tener en cuenta las siguientes condiciones para el trabajo con el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 2380:

- El Mechero o quemador de 10 cm: debidamente alineado con el haz
- Longitud de onda: 283,3 nm
- Slit o rendija del monocromador: 0,7 nm
- Corriente de la lámpara : 11 mA
- Voltaje del fototubo: 70-75
- Relación de gases: aire-acetileno (30 : 20)
- Serie de la lámpara de cátodo hueco y su respectiva marca: 425463 PERKIN ELMER
- Supresor de interferencia: no presenta interferencias.
- Eliminar de la muestra, partículas flotantes grandes o aglomerados dispersos de material no homogéneo.
- Usar frascos de vidrio resistente o plástico, lavados con una solución de ácido nítrico (HNO₃) 1:1, en los que el material en suspensión no se adhiera a las paredes del recipiente.
- Filtrar inmediatamente para metales disueltos y añadir ácido nítrico (HNO₃) hasta pH < 2.
- Refrigerar la muestra a 4°C hasta el momento del análisis para minimizar la descomposición microbológica de los sólidos. Antes de iniciar el análisis, llevar las muestras a temperatura ambiente.

- Alinear el haz emitido por la lámpara de cátodo hueco sobre el quemador o mechero.
- Considerar la respuesta de la lámpara de cátodo hueco, así como la corriente con respecto al voltaje del fototubo.
- Seleccionar la máxima longitud de onda con respecto al voltaje del fototubo.
- Aspiración correcta del capilar ubicado en la parte externa de la cámara de nebulización.
- Tipo de llama obtenida al mezclar los gases (Para el plomo (Pb) debe ser oxidante: aire-acetileno). **Llama obtenida azul.**
- Volumen mínimo de muestra por análisis de 500mL

6.14.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de plomo se siguió el procedimiento 3500 (A-B) descrito en el protocolo para análisis de aguas Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 19. El siguiente fue el grupo básico de muestras que se leyó durante 5 ensayos con su respectiva réplica de los que consta el proceso de validación.

Bk: Blanco de agua

Eb: Estándar de plomo de concentración baja = 0,5 mg Pb/L

Emb: Estándar de plomo de concentración media baja = 1,0 mg Pb/L

Ema: Estándar de plomo de concentración media alta = 2,5 mg Pb/L

Ea: Estándar de plomo de concentración alta = 5,0 mg Pb/L

El proceso de validación se inició el día veintisiete (27) de febrero a las 15 h: 15min, los estándares de concentración baja, media y alta se prepararon el primer día; a partir de una solución patrón de 1000 ppm de plomo.

6.14.7 RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la validación de plomo método de absorción atómica con llama se muestra a continuación:

Cálculo para muestras líquidas (metal disuelto o soluble)

- Expresión matemática:

$$\mu\text{g/mL} = C_0 \frac{V_f}{V_0} \frac{V_1}{V_a}$$

Donde:

C_0 = Concentración en $\mu\text{g/mL}$ dado por la curva de calibración

V_0 = Volumen de muestra inicial, mL

V_f = Volumen de muestra final después de ser concentrada, mL

V_a = Volumen de alícuota tomada a partir de V_f , mL

V_1 = Volumen al cual se llevó la alícuota V_a , mL.

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	mg Pb/L				
		BF	Eb	Emb	Ema	Ea
	1	0,00	0,410	0,989	2,437	5,043
		0,00	0,496	0,822	2,452	5,060
	2	0,00	0,528	0,817	2,262	5,152
		0,00	0,410	0,989	2,437	5,043
	3	0,00	0,383	1,091	2,509	4,989
		0,00	0,477	0,825	2,566	5,004
	4	0,00	0,486	0,896	2,539	5,003
		0,00	0,486	0,896	2,539	5,003
	5	0,00	0,486	0,897	2,539	5,003
		0,00	0,525	0,980	2,346	5,078
Promedio		-	0,469	0,920	2,463	5,038
Desviación estándar		-	0,050	0,090	0,098	0,050
Número de datos		10	10	10	10	10
Mínimo		-	0,383	0,817	2,262	4,989
Máximo		-	0,528	1,091	2,566	5,112
Intervalo		-	0,145	0,274	0,304	0,163
Tbajo		-	1,709	1,144	2,057	0,979
Talto		-	1,182	1,893	1,060	2,291
T teórico		2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: La **TABLA 1.** Presenta los parámetros estadísticos de los resultados analíticos antes de aplicar el criterio de rechazo de datos, se eliminan los datos resaltados con negrilla.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para $n=10$, donde n es el número de muestras. El valor reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	mg Pb/L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
mg Pb/L teórico		0	0,5	1,0	2,5	5,0
	1	0,00	0,410	0,989	2,437	5,043
		0,00	0,496	0,822	2,452	5,060
	2	0,00	0,528	0,817	2,262	5,152
		0,00	0,410	0,989	2,437	5,043
	3	0,00	0,383	1,091	2,509	4,989
		0,00	0,477	0,825	2,566	5,004
	4	0,00	0,486	0,896	2,539	5,003
		0,00	0,486	0,896	2,539	5,003
	5	0,00	0,486	0,897	2,539	5,003
		0,00	0,525	0,980	2,346	5,078
Promedio		-	0,469	1,022	2,463	5,038
Desviación estándar		-	0,050	0,090	0,098	0,050
%CV		-	10,70 0	8,825	3,961	0,989
%Error		-	6,260	2,244	1,496	0,756

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

➤ Respuesta del instrumento en función de la concentración de plomo

La tabla que se muestra a continuación, representa los datos obtenidos al realizar la curva de calibración del plomo en un intervalo de concentración entre 0,0 y 5,0 Pb mg/L.

Concentración mg/L	Abs	% T	log C	Abst	T	$(\Delta C/C)/\Delta T^1$
0,0	0,00	100,00		0,00	1,00	
0,5	0,001	99,770	-0,301	0,230	0,957	435,000
1,0	0,002	99,541	0,000	0,459	0,912	218,002
2,5	0,007	98,401	0,398	1,599	0,809	63,007
5,0	0,014	96,828	0,699	3,172	0,658	32,016

Tabla 3. Respuesta del Instrumento en Función de la concentración del Plomo

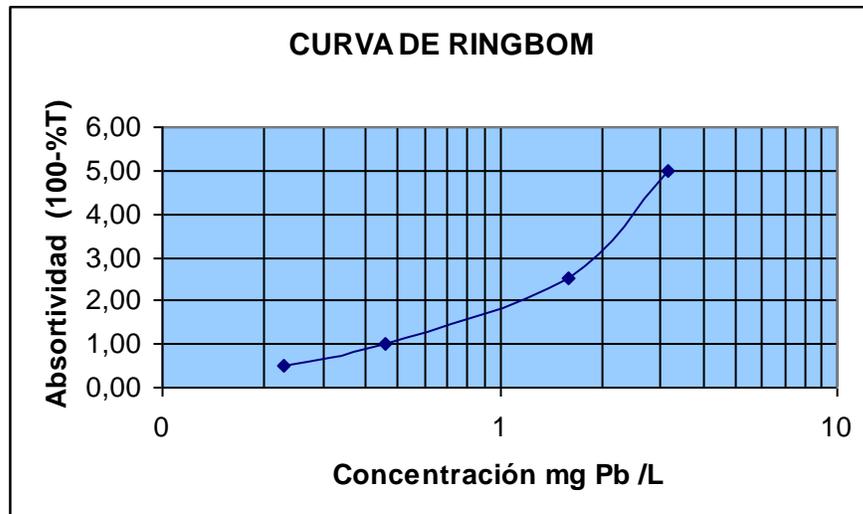
¹ Error relativo considerado para 1% de error de transmitancia

Abs : Absorbancia
%T : Porcentaje de transmitancia
Log C : Logaritmo de la concentración
Abs. : Absortividad
T : Transmitancia.

$$\begin{aligned} \%T &= 10^{(2 - Abs)} \\ T &= \%T/100 \\ Abst &= 100 - \%T \\ (\Delta C/C)/\Delta T &= 0,434 / (T \log T) \end{aligned}$$

➤ **Curva de Ringbom**

A partir de los datos de absorbancia en función de la concentración se construyó la curva de Ringbom:

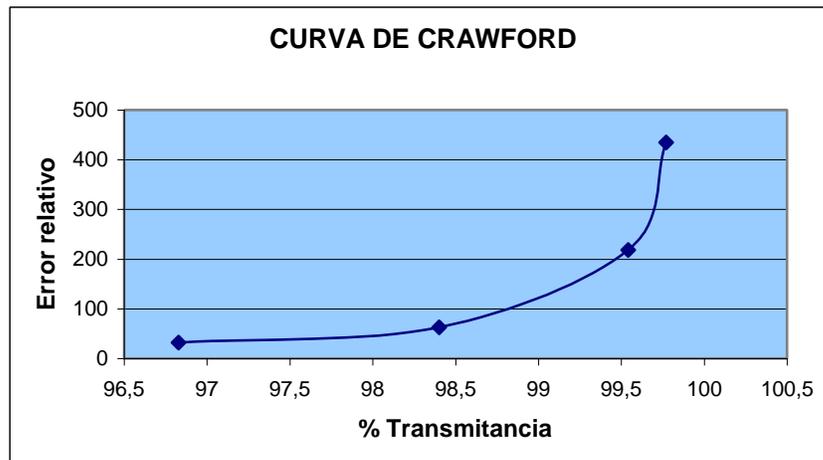


Gráfica 1. Curva de Ringbom

La **Gráfica 1** muestra la absortividad o porcentaje de absorción en función de la concentración donde se obtiene una curva de forma sigmoide llamada la curva de Ringbom, que es usada para definir el intervalo de concentración donde se cumpla la ley de Beer.

La ley de Lambert Beer nos dice que cuando un eje de radiación monocromático atraviesa una solución que contiene una especie absorbente, una parte de la radiación es absorbida en cuanto que la otra es transmitida por el medio.

➤ **Curva de Crawford**

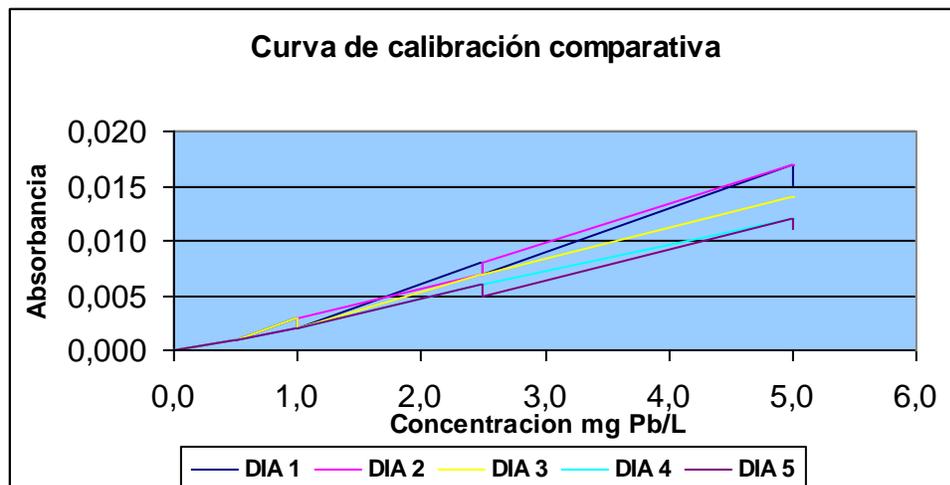


Gráfica 2. Curva de Crawford

La curva de Crawford permite el cálculo del intervalo de mínimo error relativo analítico en concentración, considerando un error de 1% en transmitancia.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Teniendo en cuenta la parte lineal de la curva de Ringbom se construyó la curva de calibración comparativa con un coeficiente de correlación promedio de 0,99717 y una pendiente promedio de 0,00287. Se reporta el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de validación y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.



Gráfica 3. Curva de calibración comparativa

Se puede observar las cinco (5) curvas de calibración, cada una de estas elaboradas en días diferentes.

Los coeficientes de correlación de cada una de las gráficas se puede observar en la siguiente tabla:

No. DE ENSAYO Y FECHA	COEFICIENTE DE CORRELACION (r)
No. 1 – 2006 – 02 – 27	0,99459
No. 2 – 2006 – 02 – 28	0,99644
No. 3 – 2006 – 03 – 01	0,99862
No. 4 – 2006 – 03 – 02	0,99945
No. 5 – 2006 – 03 – 03	0,99674

Tabla 4. Resumen de coeficientes de correlación

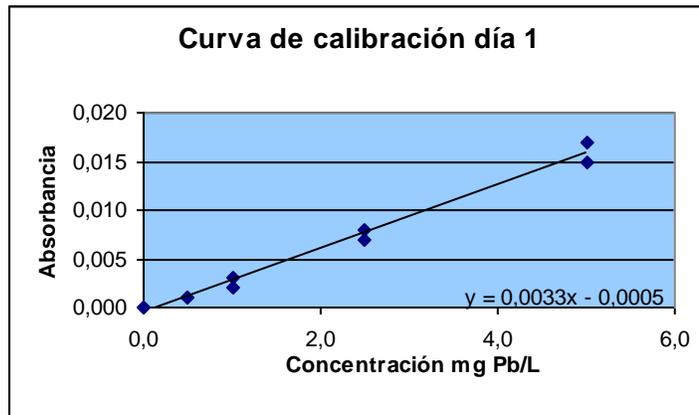
Se observa la concordancia entre cada uno mostrando tendencia al valor de 1 que corresponde a la pendiente de un ángulo de 45°.

➤ **Curvas de calibración por días**

Ensayo No. 1 / 2006 – 02 – 27

No.	mg Pb/L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
1	0,00	0,001	0,003	0,008	0,017
	0,00	0,001	0,002	0,007	0,015
Pendiente	0,00326				
Intercepto	-0,00047				
Correlación	0,99459				

Tabla 5. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 1

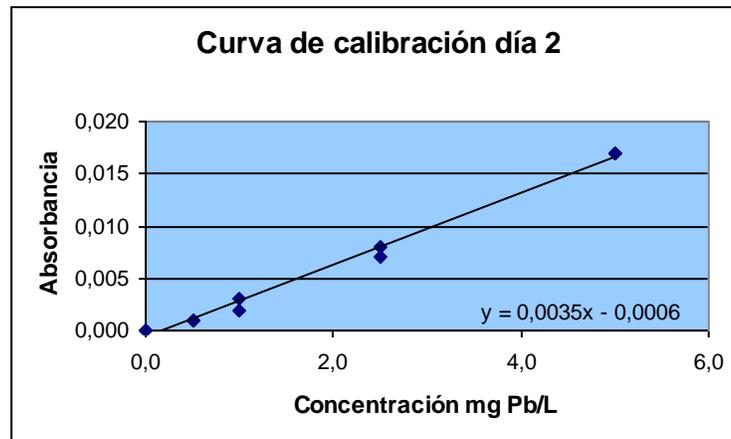


Gráfica 4. Curva de calibración día 1

Ensayo No. 2 / 2006 – 02 – 28

No.	mg Pb/L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
2	0,00	0,001	0,002	0,007	0,017
	0,00	0,001	0,003	0,008	0,017
Pendiente	0,00285				
Intercepto	-0,00022				
Correlación	0,99862				

Tabla 6. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 2

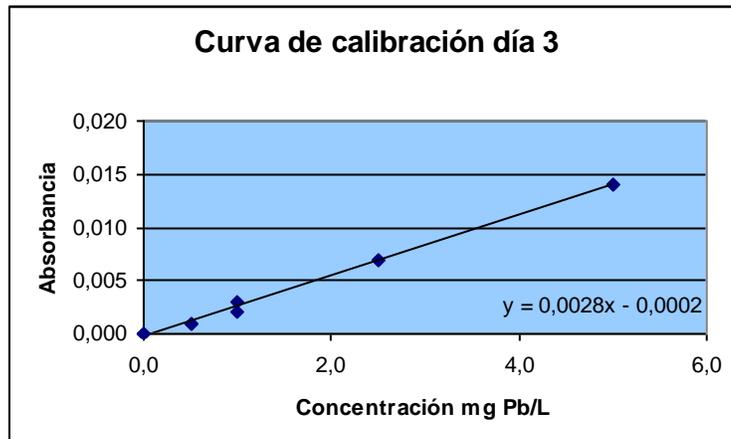


Gráfica 5. Curva de calibración día 2

Ensayo No. 3 / 2006 – 03 – 01

No.	mg Pb/L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
3	0,00	0,001	0,003	0,007	0,014
	0,00	0,001	0,002	0,007	0,014
Pendiente	0,00285				
Intercepto	-0,00022				
Correlación	0,99862				

Tabla 7. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 3

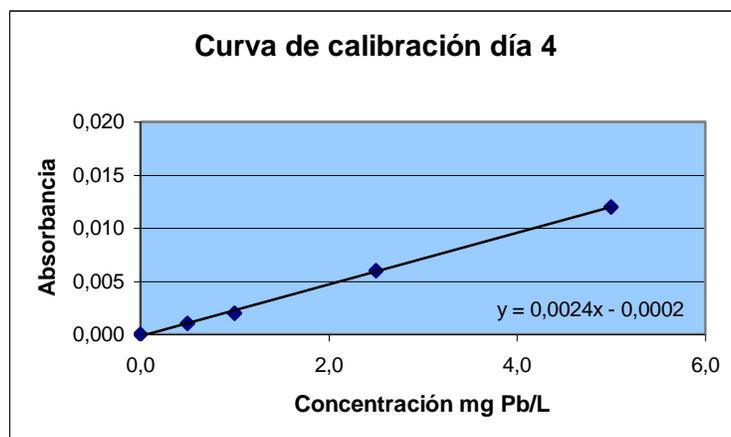


Gráfica 6. Curva de calibración día 3

Ensayo No. 4 / 2006 – 03 – 02

No.	mg Pb/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	0,00	0,001	0,002	0,006	0,012
	0,00	0,001	0,002	0,006	0,012
Pendiente	0,00244				
Intercepto	-0,00018				
Correlación	0,99945				

Tabla 8. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 4

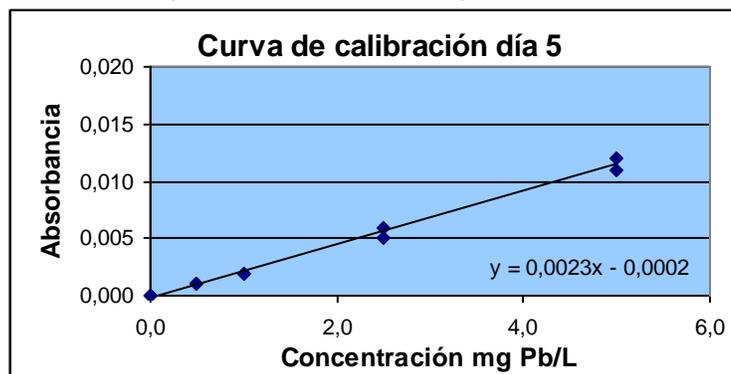


Gráfica 7. Curva de calibración día 4

Ensayo N° 5 / 2006 – 03 – 03

No.	mg Pb/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	0,00	0,001	0,002	0,006	0,012
	0,00	0,001	0,002	0,005	0,011
Pendiente	0,00232				
Intercepto	-0,00017				
Correlación	0,99674				

Tabla 9. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 5



Gráfica 8. Curva de calibración día 5

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad del método es la pendiente promedio de las curvas de calibración (curvas de trabajo). En este proceso el valor obtenido fue 0,00287 de sensibilidad de calibración lo que significa que este valor es el factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

Fecha	Pendiente	Coefficiente de correlación
27/02/2006	0,00326	0,99459
28/02/2006	0,00346	0,99644
01/03/2006	0,00285	0,99862
02/03/2006	0,00244	0,99945
03/03/2006	0,00232	0,99674
Promedio	0,00287	0,99717
Desviación estándar	0,00044	0,00192
Sensibilidad calibración	0,00287	

Tabla 10. Parámetros estadísticos de sensibilidad

➤ **Límite de detección y cuantificación**

En la siguiente tabla se muestran los valores de la respuesta del equipo de absorción atómica con llama para plomo en función del límite de detección y de cuantificación:

CONCENTRACIONES ESTÁNDAR	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (concentración)	ABSORBANCIAS MEDIDAS*1000
0,5	0,37	1
	0,37	1
	0,37	1
	0,37	1
	0,37	1
	0,37	1
	0,37	1
	0,37	1
	0,37	1
	0,37	1
PROMEDIO	0,37	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,04	
LÍMITE DE DETECCIÓN	0,62	
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	0,89	

Tabla 11. Respuesta equipo absorción para el plomo en función del límite de detección y cuantificación.

Para hallar el dato de **0,37** se tomaron los resultados obtenidos en la lectura de absorbancia para la curva de calibración incluyendo 1 que fue el valor leído en el espectrofotómetro de absorción atómica con llama para una concentración estándar de 0,50 mgPb/L, obteniendo su límite de detección y de cuantificación.

➤ **Análisis de varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza se utilizó con el fin de separar y estimar las diferentes causas de variación. En éste proceso se emplearon los patrones de las curvas de calibración para determinar los parámetros de ANOVA así:

Concentraciones estándar	Absorbancias medidas / 1000	Media
0,50	1,1,1	1
1,0	2,3,2	2
2,5	6,7,8	7
5,0	15,16,17	16
	Media global	7

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad
Entre muestras	$n \sum (X_i - \bar{X})^2 = 2943$	$h - 1 = 3$
Dentro de muestras	$\sum \sum (X_{ij} - \bar{X}_i)^2 = 8$	$h (n - 1) = 8$
Total	$\sum \sum (X_{ij} - \bar{X})^2 = 2951$	$hn - 1 = 11$

ANOVA: de factor único

RESUMEN

RESUMEN

Grupos	Frecuencia	Suma	Promedio	Varianza
0,5	3	9	3	0
1,0	3	18	6	1/2
2,5	3	45	15	1
5,0	3	84	28	1

ANOVA

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	F crit
Entre grupos	2943	3	981	47	5,318
Dentro de grupos	8	8	1		
Total	2951	11			

Tabla 12. Concentraciones estándar para el plomo por absorción atómica con llama.

El valor crítico $F_{1,8} = 5,318$ ($P=0,05$). Ya que el valor calculado es mayor que éste se rechaza la hipótesis nula: la media muestral difiere significativamente, es decir los valores tomados de 1 y 8 se determinaron de acuerdo al cuadrado medio (estimación dentro de muestras) y a los grados de libertad (estimación de cada muestra tiene 2 g.l y hay cuatro (4) muestras lo que me indica ocho (8)) y así se reporta este dato para un 95% de límite de confianza.

Donde:

h: promedio de varianzas muestrales

(n-1): varianza de cada muestra

SC: suma de cuadrados

gl : grados de libertad

CM: cuadrado medio

F: contraste (una o dos colas)

F crítico: valor del número de grados de libertad del denominador VS número de grados de libertad del numerador.

6.14.8 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al obtener los resultados experimentales en la validación del plomo método de espectrofotometría de absorción atómica con llama no se evidenciaron errores sistemáticos, ni resultados erróneos; aunque hubo presencia de errores aleatorios, que es algo impredecible pues hay resultados que difieren uno del otro en el análisis. Dentro de los parámetros estadísticos calculados durante este proceso se analizó lo siguiente:

➤ **Precisión**

El parámetro estadístico “precisión”, definiéndolo como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por replicas de una misma muestra, se expresa en términos de la desviación estándar o del coeficiente de variación para concentraciones de soluciones estándares preparadas menores de 5,0 mg Pb/L está por debajo del 10%.

De acuerdo al intervalo de concentración que se tuvo en cuenta para el proceso de validación (0,5 – 5,0 mg Pb/L) se pudo observar que la precisión o reproducibilidad se afecta por los errores aleatorios que provoca que de una manera u otra los resultados cambien, aunque sean pequeños.

El obtener un resultado por debajo del 10% indica que el grado de concordancia entre la muestra y su respectiva replica es buena, pues hay reproducibilidad en el ensayo, así la desviación estándar o su coeficiente de variación que en este caso fue: 0,050 para 0,5 mg Pb/L; 0,090 para 1,0 mg Ni/L; 0,098 para 2,5 mg Ni/L y 0,050 para 5,0 mg Ni/L, nos da el ejemplo de un error relativo que no es más que la comparación de la precisión de estos resultados obtenidos con la definición dada anteriormente.

➤ **Exactitud**

Respecto al parámetro estadístico de “exactitud”, definiéndolo en términos de porcentaje de error relativo, para los estándares de concentraciones menores de 5,0 mg Pb/L utilizadas en este proceso de validación se puede decir que este porcentaje de error esta en el rango de 0,756 y 6,260%.

Este porcentaje de error relativo tan bajo revela y confirma la buena exactitud de la técnica para la determinación de plomo por el método de absorción atómica con llama.

Curva de calibración

➤ **Curva de Ringbom**

La curva de Ringbom obtenida (**GRÁFICO No.1**) muestra la tendencia sigmoideal aplicada a las cuatro (4) concentraciones estándar de 0,5; 1,0; 2,5 y 5,0 mg Ni/L, principalmente en el intervalo de concentración de 2,5 a 5,0 mg Ni/L en el que se cumple la ley de Beer, al no tener desvíos esto quiere decir que no se presentaron desvíos según la ley de Beer, los desvíos enunciados en dicha ley se deben a factores físicos, químicos e instrumentales, llegando a ocurrir el caso el más frecuente es el factor instrumental que es atribuido a la radiación policromática, selección inadecuada de la longitud de onda, fuente de radiación inestable, detectores deficientes y defectos en la parte óptica para la espectrofotometría de absorción atómica con llama, lo que significa que para el proceso de plomo está dentro de las especificaciones requeridas.

➤ **Curva de Crawford**

La medida de la transmitancia esta sujeta a una incerteza llamada error relativo de concentración.

El intervalo en que los resultados producen menor error relativo están entre 0,4 a 0,7 o del 20 al 60% de T (Transmitancia). Para la curva de Crawford obtenida no se aprecia muy bien pues su tendencia es en forma de U, que se debió a los pocos datos de concentración estándar de la muestra tomados para el proceso de validación.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Se puede notar que no hay una buena concordancia entre los cinco (5) días consecutivos, de la validación (**Gráfica No 3 y Tabla No 4**), que obedeció posiblemente a elementos que afectaron la sensibilidad como:

- Paso óptico (ajuste de la longitud de onda, lámpara, amplitud de abertura del diafragma).
- Llama (ajuste de nebulizador, de gases, de quemador rotacional, de profundidad del quemador).
- Absorbancia (velocidad de aspiración del material por la llama).

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad se calcula como el promedio de las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.

La sensibilidad resulta del promedio de la pendiente de la curva de calibración \pm desviación estándar ($0,00287 \pm 0,00044$). El valor a reportar es de 0,00287, lo que significa que este valor corresponde al factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

➤ **Límite de detección**

El límite de detección (LOD) de una analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del "blanco" o "ruido de fondo". En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que puede leer el espectrofotómetro Perkin Elmer 2380 de acuerdo con las concentraciones estándar que se escogieron para la validación, se tomo la menor y se leyó. Se determino de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de plomo por el método de absorción atómica con llama, utilizando el equipo del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** Perkin Elmer modelo 2380 con base a los patrones de la curva de calibración, se estableció el límite en 0,62 mg Pb/L, para una concentración de 0,5 mg Pb/L, obteniéndose una absorbancia de uno (1) en la lectura de las respectivas muestras para esta concentración; esto significa que es lo mínimo que puede leer el equipo a esta concentración para el plomo.

➤ **Límite de cuantificación**

El “límite de cuantificación” (o límite de determinación”), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleo para el límite de detección, solo que esta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración cuantificable del estándar

S_B : Desviación estándar

Se determinó para la validación del plomo método de absorción atómica por llama el límite de cuantificación en 0,89 mg Pb/L, para 0,5 mg Pb/L lo que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, este valor obtenido nos indica que a esta concentración dada el equipo puede cuantificarlo, de ahí en adelante se hace más difícil apreciar y valorar este dato, pues de una manera u otra lo que se busca es minimizar los errores que el método presenta en cuanto a la precisión y la exactitud.

➤ **Linealidad**

Hace referencia a la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento. Para la determinación de la linealidad se necesito de la tabla de valores de la distribución T para calcular LC 95%, después de haber calculado ANOVA para la variación dentro y entre muestras, reportándose este dato 2,78 para $P= 0,05$.

Este valor se toma de acuerdo a los grados de libertad (n-1), es decir cuatro (4) concentraciones estándar tratadas en el proceso de validación, se determina según el contraste (una cola o dos colas), en este caso fue contraste de una cola, pues se utilizo un solo método absorción atómica con llama lo que significa que 2,78 es el dato que se reporta como lineal en la señal que muestra el instrumento para un 95% de confianza.

➤ **Análisis de varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza se define como una técnica estadística muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación.

La hipótesis nula se rechaza cuando la variación entre muestras es mayor que la variación dentro de las muestras.

Normalmente la hipótesis nula se rechaza cuando la probabilidad de que dicha diferencia observada ocurra por azar es menor que 1 en 20 veces (es decir, 0,05 ó 5%). En este caso se dice que la diferencia **es significativa al nivel 0,05 (ó 5%)**. Esto significa que se realiza con un límite de confianza del 95% que es con lo que se trabajo en el proceso de validación.

6.14.9 CONCLUSIONES

- La longitud de onda óptima para realizar la determinación de plomo por el método espectrofotométrico de absorción atómica con llama es de 248,3nm.
- Según la curva de Ringbom los datos óptimos, se encuentran en la sección recta correspondiente al ciclo logarítmico entre concentraciones de 2,5 y 5,0mg/L.
- La curva de calibración comparativa para concentraciones de 0,0 a 5,0 mg Pb/L presenta un coeficiente de correlación de 0,99717 confirmando una buena relación entre la concentración y la absorbancia.
- El método presenta una sensibilidad de 0,00287, la cual corresponde a la pendiente de la curva de calibración que puede producir un resultado significativo.
- El límite de detección para la determinación de plomo por el método de absorción atómica con llama es 0,62 mg Pb/L. Este límite es la concentración mínima que pudo ser medida con una exactitud aceptable, para una concentración estándar de 0,50 mg Pb/L.
- El límite de cuantificación que se determinó para el plomo fue de 0,89 mg Pb/L siendo esta la menor cantidad de analito que pudo determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, para una concentración estándar de 0,50 mg Pb/L.
- La linealidad que registra el método en base de la tabla de limite de confianza para un 95% es 2,78 para $P=0,05$, con $n-1$ grados de libertad. Este dato se tomo como valor crítico de t para contraste de una cola, pues se empleo un solo método para llevar a cabo el proceso de validación y es el único dato que se reporta pues es específico para cuatro (4) muestras (concentraciones estándar).
- El análisis de varianza (ANOVA) para la determinación de cadmio por el método de absorción atómica con llama, bajo la hipótesis nula se estimo de dos formas: una la variación dentro de muestras y la otra la variación entre muestras obteniéndose lo siguiente: cuadrado medio dentro de las muestras = 1 con 8 g.l ; cuadrado medio entre muestras = 981 con 3 g.l con un valor de 5,318 para el contraste de una cola, lo que significa que la hipótesis nula se rechaza porque la variación entre muestras es mayor que la variación dentro de las muestras tomándose 1 con 8 g.l para la posible ubicación del dato a reportar, esto se hizo con el fin de separar y estimar las diferentes causas de variación que pueden conducir a diferencias significativas entre los valores medios obtenidos.

6.15 VALIDACIÓN DE CINCO MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA

6.15.1 OBJETIVO

Determinar de manera experimental y para las condiciones del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA**, los valores de precisión, exactitud, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y análisis de varianza (ANOVA) que servirán como criterios de confianza para la determinación de cinc por el método de absorción atómica con llama.

6.15.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

El método de la absorción atómica permite medidas rápidas en buenas condiciones de sensibilidad.

El cinc más común entra en las aguas domésticas suministrando desde deterioro del hierro galvanizado y del mismo.

El cinc en agua también puede resultar desde desechos industriales de contaminación.

Se recomienda practicar el análisis en las 10 horas que siguen a la toma de la muestra.

El Decreto 475 de 1998 del Ministerio de Salud "NORMAS TÉCNICAS DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE" da un valor de 5 mg/L para cinc en agua potable y de 10 mg/L para agua segura.

6.15.3 REACTIVOS

La concentración de ácido no es crítica en la concentración final en la muestra.

- **Solución patrón de cinc de 1000 µg/mL:** preferiblemente un titrisol y/o fizaral con certificado de pureza de la firma fabricante.
- Soluciones estándares de 0,1; 0,25; 0,5 y 1,0 µg Zn/mL
- Ácido nítrico HNO_{3 conc} y Ácido perclórico HClO_{4 conc}.
- Agua destilada – desmineralizada

6.15.4 MATERIALES Y EQUIPOS

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer modelo 2380
- Lámpara de cátodo hueco para cinc (Zn)
- Gases (Aire – acetileno) suministrado por Cryogas S.A.
- Balones aforados de 25, 50 y 100 mL marca Brand

- Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 25 mL marca Brand
- Vasos volumétricos de 100 mL marca Brand
- Probetas de 50 y 100 mL marca Brand
- Balones fondo redondo marca Brand.
- Filtros
- Embudos filtrantes

6.15.5 CONDICIONES DE TRABAJO

Estas condiciones de trabajo se establecieron con base al protocolo para análisis de aguas, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th Edition de 1995".

Se deben de tener en cuenta las siguientes condiciones para el trabajo con el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 2380:

- El Mechero o quemador de 10 cm: debidamente alineado con el haz
- Longitud de onda: 213,7-213,9 nm
- Slit o rendija del monocromador: 0,7nm
- Corriente de la lámpara : 18 mA
- Voltaje del fototubo: 70-75 mV
- Relación de gases: aire-acetileno (30 : 20)
- Serie de la lámpara de cátodo hueco y su respectiva marca: 8783 PERKIN ELMER.
- Supresor de interferencia: no presenta interferencias.
- Eliminar de la muestra, partículas flotantes grandes o aglomerados dispersos de material no homogéneo.
- Usar frascos de vidrio resistente o plástico, lavados con una solución de ácido nítrico (HNO₃) 1:1, en los que el material en suspensión no se adhiera a las paredes del recipiente.
- Filtrar inmediatamente para metales disueltos y añadir ácido nítrico (HNO₃) hasta pH < 2.
- Refrigerar la muestra a 4°C hasta el momento del análisis para minimizar la descomposición microbiológica de los sólidos. Antes de iniciar el análisis, llevar las muestras a temperatura ambiente.

- Alinear el haz emitido por la lámpara de cátodo hueco sobre el quemador o mechero.
- Considerar la respuesta de la lámpara de cátodo hueco, así como la corriente con respecto al voltaje del fototubo.
- Seleccionar la máxima longitud de onda con respecto al voltaje del fototubo.
- Aspiración correcta del capilar ubicado en la parte externa de la cámara de nebulización.
- Tipo de llama obtenida al mezclar los gases (Para el cinc (Zn) debe ser oxidante: aire-acetileno). **Llama obtenida azul.**
- Volumen mínimo de muestra por análisis de 500mL

6.15.6 PROCEDIMIENTO

Para el análisis de cinc se siguió el procedimiento 3500 (A-B) descrito en el protocolo para análisis de aguas Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater edición 19. El siguiente fue el grupo básico de muestras que se leyó durante 5 ensayos con su respectiva réplica de los que consta el proceso de validación.

Bk: Blanco de agua

Eb: Estándar de cinc de concentración baja = 0,1 mg Zn/L

Emb: Estándar de cinc de concentración media baja = 0,25 mg Zn/L

Ema: Estándar de cinc de concentración media alta = 0,5 mg Zn/L

Ea: Estándar de cinc de concentración alta = 1,0 mg Zn/L

El proceso de validación se inició el día veintiuno (21) de febrero a las 12h: 40min, los estándares de concentración baja, media y alta se prepararon el primer día; a partir de una solución patrón de 1000 ppm de cinc.

6.15.7 RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la validación de cinc método de absorción atómica con llama se muestra a continuación:

Cálculo para muestras líquidas (metal disuelto o soluble)

- Expresión matemática:

$$\mu\text{g/mL} = C_0 \frac{V_f}{V_0} \frac{V_1}{V_a}$$

Donde:

C_0 = Concentración en $\mu\text{g/mL}$ dado por la curva de calibración

V_0 = Volumen de muestra inicial, mL

V_f = Volumen de muestra final después de ser concentrada, mL

V_a = Volumen de alícuota tomada a partir de V_f , mL

V_1 = Volumen al cual se llevó la alícuota V_a , mL.

Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

	No. Ensayo	mg Zn/L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	1	0,00	0,092	0,255	0,534	0,983
		0,00	0,095	0,255	0,494	0,983
	2	0,00	0,101	0,256	0,503	0,997
		0,00	0,106	0,249	0,496	1,001
	3	0,00	0,117	0,258	0,503	0,995
		0,00	0,117	0,234	0,515	0,995
	4	0,00	0,110	0,257	0,498	0,998
		0,00	0,099	0,264	0,491	1,001
	5	0,00	0,118	0,252	0,497	0,999
		0,00	0,110	0,263	0,503	0,994
Promedio		-	0,107	0,254	0,503	0,995
Desviación estándar		-	0,009	0,008	0,013	0,007
Número de datos		10	10	10	10	10
Mínimo		-	0,092	0,234	0,491	0,983
Máximo		-	0,118	0,264	0,534	1,001
Intervalo		-	0,026	0,030	0,043	0,018
Tbajo		-	1,532	2,407	0,981	1,766
Talto		-	1,215	1,150	2,420	0,974
T teórico		2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los resultados analíticos

Nota: La **TABLA 1.** Presenta los parámetros estadísticos de los resultados analíticos antes de aplicar el criterio de rechazo de datos, se eliminan los datos resaltados con negrilla.

El T teórico se obtiene de la tabla de valores críticos T para rechazo de datos para un 95% de intervalo de confianza y para n=10, donde n es el número de muestras. El valor reportado de 2,18 como T teórico es ubicado de acuerdo a la reproducibilidad del ensayo entre muestra y réplica.

Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

	No. Ensayo	mg Zn/L				
		Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
mg Zn/L teórico		0	0,1	0,25	0,5	1,0
	1	0,00	0,092	0,255	0,534	0,983
		0,00	0,095	0,255	0,494	0,983
	2	0,00	0,101	0,256	0,503	0,997
		0,00	0,106	0,249	0,496	1,001
	3	0,00	0,117	0,258	0,503	0,995
		0,00	0,117	0,234	0,515	0,995
	4	0,00	0,110	0,257	0,498	0,998
		0,00	0,099		0,491	1,001
	5	0,00		0,252	0,497	0,999
		0,00	0,110	0,263	0,503	0,994
Promedio		-	0,095	0,253	0,503	0,995
Desviación estándar		-	0,009	0,008	0,013	0,007
%CV		-	9,588	3,231	2,511	0,660
%Error		-	5,300	1,289	0,680	0,540

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los resultados definitivos

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

➤ Respuesta del instrumento en función de la concentración de cinc

La tabla que se muestra a continuación, representa los datos obtenidos al realizar la curva de calibración del cinc en un intervalo de concentración entre 0,0 y 1,0 mg Zn /L.

Concentración mg/L	Abs	% T	log C	Abst	T	$(\Delta C/C)/\Delta T^1$
0,0	0,00	100,00		0,00	1,00	
0,1	0,019	95,719	- 1,000	4,281	0,957	23,864
0,25	0,044	90,365	- 0,602	9,635	0,904	10,915
0,5	0,085	82,224	- 0,301	17,776	0,822	6,210
1,0	0,169	67,764	0,000	32,236	0,678	3,790

Tabla 3. Respuesta del Instrumento en Función de la concentración del Cinc

¹ Error relativo considerado para 1% de error de transmitancia

Abs : Absorbancia
%T : Porcentaje de transmitancia
Log C : Logaritmo de la concentración
Abs. : Absortividad
T : Transmitancia.

$$\%T = 10^{(2 - Abs)}$$

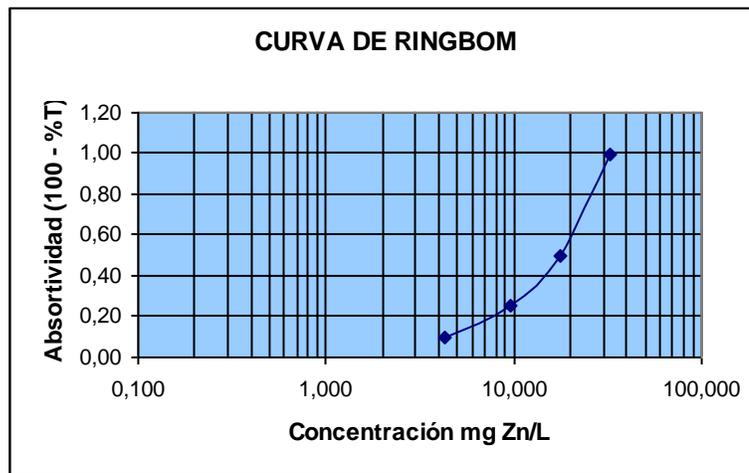
$$T = \%T/100$$

$$Abst = 100 - \%T$$

$$(\Delta C/C)/\Delta T = 0,434 / (T \log T)$$

➤ **Curva de Ringbom**

A partir de los datos de absorbancia en función de la concentración se construyó la curva de Ringbom:

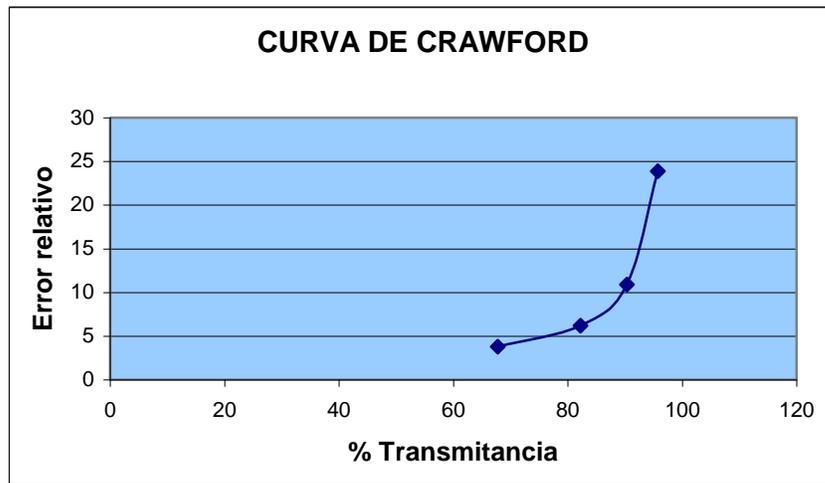


Gráfica 1. Curva de Ringbom

La **Gráfica 1** muestra la absortividad o porcentaje de absorción en función de la concentración donde se obtiene una curva de forma sigmoideal llamada la curva de Ringbom, que es usada para definir el intervalo de concentración donde se cumpla la ley de Beer.

La ley de Lambert Beer nos dice que cuando un eje de radiación monocromático atraviesa una solución que contiene una especie absorbente, una parte de la radiación es absorbida en cuanto que la otra es transmitida por el medio.

➤ **Curva de Crawford**

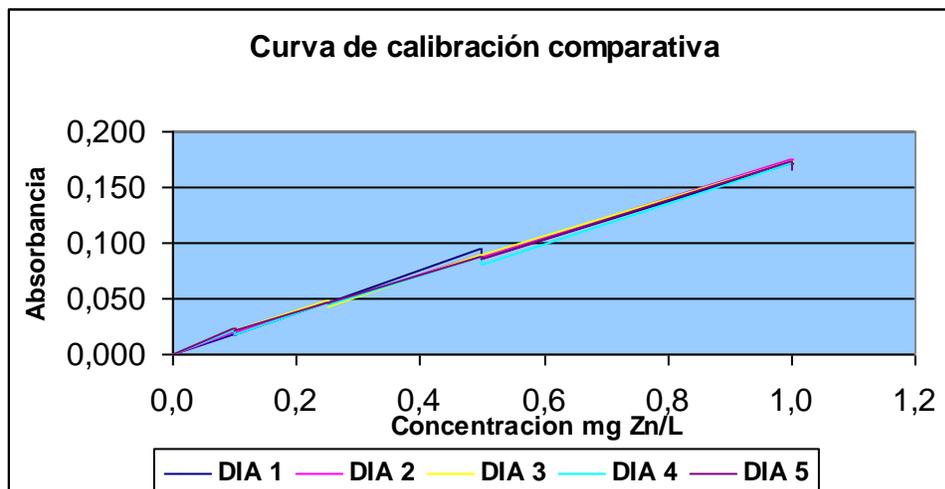


Gráfica 2. Curva de Crawford

La curva de Crawford permite el cálculo del intervalo de mínimo error relativo analítico en concentración, considerando un error de 1% en transmitancia.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Teniendo en cuenta la parte lineal de la curva de Ringbom se construyó la curva de calibración comparativa con un coeficiente de correlación promedio de 0,99918 y una pendiente promedio de 0,16995. Se reporta el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de validación y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.



Gráfica 3. Curva de calibración comparativa

Se puede observar las cinco (5) curvas de calibración, cada una de estas elaboradas en días diferentes.

Los coeficientes de correlación de cada una de las gráficas se puede observar en la siguiente tabla:

No. DE ENSAYO Y FECHA	COEFICIENTE DE CORRELACION (r)
No. 1 – 2006 – 02 – 21	0,99900
No. 2 – 2006 – 02 – 22	0,99991
No. 3 – 2006 – 02 – 23	0,99914
No. 4 – 2006 – 02 – 24	0,99896
No. 5 – 2006 – 02 – 25	0,99889

Tabla 4. Resumen de coeficientes de correlación

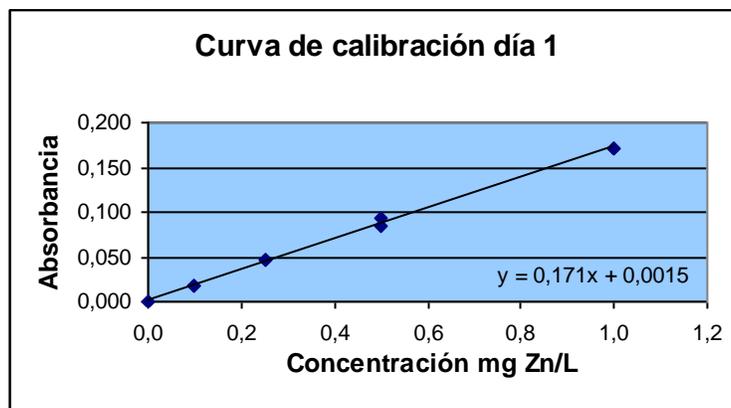
Se observa la concordancia entre cada uno mostrando tendencia al valor de 1 que corresponde a la pendiente de un ángulo de 45°.

➤ **Curvas de calibración por días**

Ensayo No. 1 / 2006 – 02 – 21

No.	mg Zn/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
1	0,00	0,018	0,046	0,094	0,171
2	0,00	0,017	0,046	0,085	0,171
Pendiente	0,17103				
Intercepto	0,00152				
Correlación	0,99900				

Tabla 5. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 1

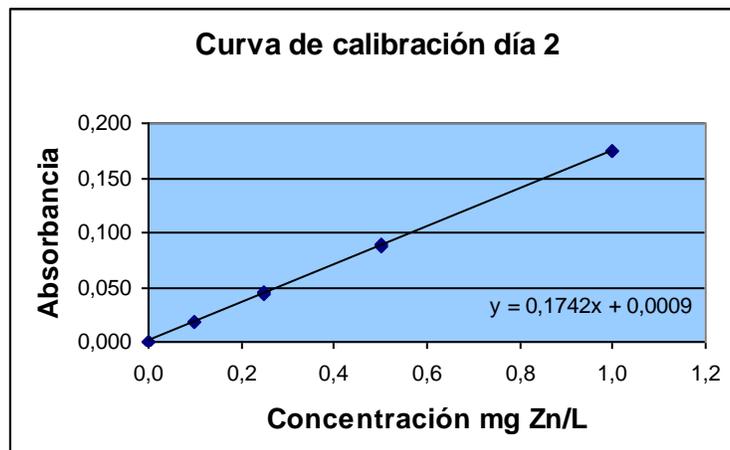


Gráfica 4. Curva de calibración día 1

Ensayo No. 2 / 2006 – 02 – 22

No.	mg Zn/L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
2	0,00	0,019	0,046	0,089	0,175
	0,00	0,019	0,044	0,087	0,175
Pendiente	0,17423				
Intercepto	0,00093				
Correlación	0,99991				

Tabla 6. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 2

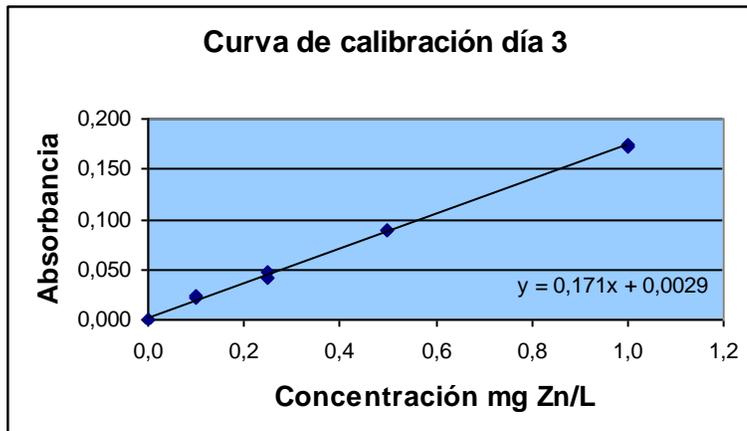


Gráfica 5. Curva de calibración día 2

Ensayo No. 3 / 2006 – 02 – 23

No.	mg Zn/L				
Ensayo	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
3	0,00	0,024	0,048	0,090	0,174
	0,00	0,022	0,042	0,090	0,172
Pendiente	0,17097				
Intercepto	0,00294				
Correlación	0,99914				

Tabla 7. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 3

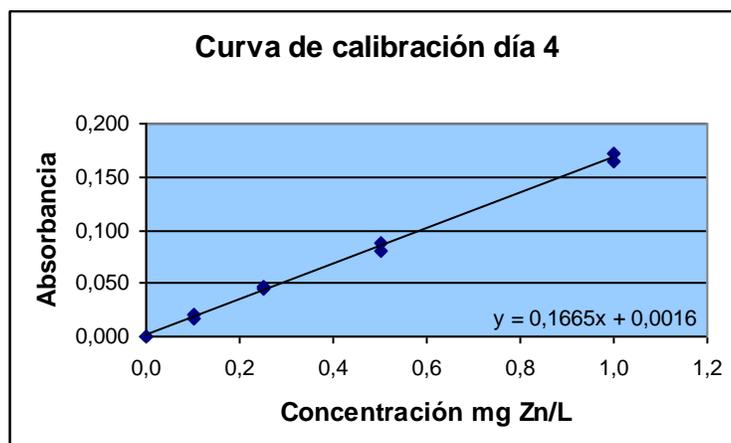


Gráfica 6. Curva de calibración día 3

Ensayo No. 4 / 2006- 02 - 24

No.	mg Zn/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
1	0,00	0,021	0,046	0,087	0,172
2	0,00	0,017	0,044	0,081	0,164
Pendiente		0,16650			
Intercepto		0,00159			
Correlación		0,99896			

Tabla 8. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 4

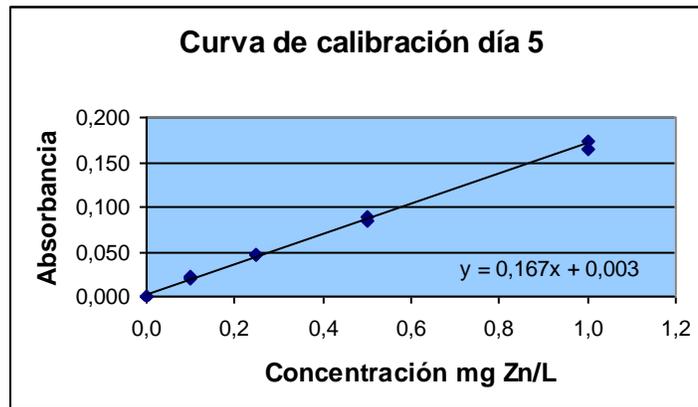


Gráfica 7. Curva de calibración día 4

Ensayo N° 5 / 2006 - 02 - 25

No.	mg Zn/L				
	Bk	Eb	Emb	Ema	Ea
	0,00	0,023	0,046	0,088	0,174
	0,00	0,021	0,046	0,085	0,165
Pendiente	0,16704				
Intercepto	0,00300				
Correlación	0,99889				

Tabla 9. Resumen de parámetros estadísticos para la curva de calibración día 5



Gráfica 8. Curva de calibración día 5

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad del método es la pendiente promedio de las curvas de calibración (curvas de trabajo). En este proceso el valor obtenido fué 0,16995 de sensibilidad de calibración lo que significa que este valor es el factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

Fecha	Pendiente	Coefficiente de correlación
21/02/2006	0,17103	0,99900
22/02/2006	0,17423	0,99991
23/02/2006	0,17097	0,99914
24/02/2006	0,16650	0,99896
25/02/2006	0,16704	0,99889
Promedio	0,16995	0,99918
Desviación estándar	0,00286	0,00042
Sensibilidad calibración	0,16995	

Tabla 10. Parámetros estadísticos de sensibilidad

➤ **Límite de detección y cuantificación**

En la siguiente tabla se muestran los valores de la respuesta del equipo de absorción atómica con llama para cinc en función del límite de detección y de cuantificación:

CONCENTRACIONES ESTÁNDAR	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (concentración)	ABSORBANCIAS MEDIDAS*1000
0,02	0,014	5
	0,014	5
	0,014	5
	0,014	5
	0,014	5
	0,014	5
	0,014	5
	0,014	5
	0,014	5
PROMEDIO	0,014	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,002	
LÍMITE DE DETECCIÓN	0,03	
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	0,04	

Tabla 11. Respuesta equipo absorción para el cinc en función del límite de detección y de cuantificación.

Para hallar el dato de **0,014** se tomaron los resultados obtenidos en la lectura de absorbancia para la curva de calibración incluyendo 5 que fue el valor leído en el espectrofotómetro de absorción atómica con llama para una concentración estándar de 0,02 mgZn/L, hallando de esta forma su límite de detección y de cuantificación.

➤ **Análisis de varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza se utilizó con el fin de separar y estimar las diferentes causas de variación. En éste proceso se emplearon los patrones de las curvas de calibración para determinar los parámetros de ANOVA así:

Concentraciones estándar	Absorbancias medidas / 1000	Media
0,10	21,22,23	22
0,25	47,48,49	48
0,50	89,90,91	90
1,0	174,175,176	175
	Media global	83,8

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad
Entre muestras	$n \sum (X_i - \bar{X})^2 = 40371$	$h - 1 = 3$
Dentro de muestras	$\sum \sum (X_{ij} - X_i)^2 = 8$	$h (n - 1) = 8$
Total	$\sum \sum (X_{ij} - \bar{X})^2 = 40379$	$hn - 1 = 11$

RESUMEN		ANOVA			
Grupos	Frecuencia	Suma	Promedio	Varianza	
0,10	3	9	3	1	
0,25	3	18	6	1	
0,50	3	45	15	1	
1,0	3	84	28	1	

ANOVA					
Fuente de variación	SC	gl	CM	F	F crit
Entre grupos	40371	3	13457	4486	5,318
Dentro de grupos	8	8	1		
Total	40379	11			

Tabla 12. Concentraciones estándar para el cinc por absorción atómica con llama.

El valor crítico $F_{1, 8} = 5,318$ ($P=0,05$). Ya que el valor calculado es mayor que éste se rechaza la hipótesis nula: la media muestral difiere significativamente, es decir los valores tomados de 1 y 8 se determinaron de acuerdo al cuadrado medio (estimación dentro de muestras) y a los grados de libertad (estimación de cada muestra tiene 2 g.l y hay cuatro (4) muestras lo que me indica ocho (8)) y así se reporta este dato para un 95% de límite de confianza.

Donde:

h: promedio de varianzas muestrales

(n-1): varianza de cada muestra

SC: suma de cuadrados

gl : grados de libertad

CM: cuadrado medio

F: contraste (una o dos colas)

F crítico: valor del número de grados de libertad del denominador VS número de grados de libertad del numerador.

6.15.8 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al obtener los resultados experimentales en la validación del cinc método de espectrofotometría de absorción atómica con llama no se evidenciaron errores sistemáticos, ni resultados erróneos; aunque hubo presencia de errores aleatorios, que es algo impredecible pues hay resultados que difieren uno del otro en el análisis. Dentro de los parámetros estadísticos calculados durante este proceso se analizó lo siguiente:

➤ Precisión

El parámetro estadístico “precisión”, definiéndolo como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por replicas de una misma muestra, se expresa en términos de la

desviación estándar o del coeficiente de variación para concentraciones de soluciones estándares preparadas menores de 0,1 mg Zn/L está por debajo del 9%.

De acuerdo al intervalo de concentración que se tuvo en cuenta para el proceso de validación (0,1 – 1,0 mg Zn/L) se pudo observar que la precisión o reproducibilidad se afecta por los errores aleatorios que provoca de una manera u otra los resultados cambien, aunque sean pequeños.

El obtener un resultado por debajo del 9% indica que el grado de concordancia entre la muestra y su respectiva replica es buena, pues hay reproducibilidad en el ensayo, así la desviación estándar o su coeficiente de variación que en este caso fue: 0,009 para 0,1mg Zn/L; 0,008 para 0,25 mg Zn/L; 0,013 para 0,5 mg Zn/L y 0,007 para 1,0 mg Zn/L, nos da el ejemplo de un error relativo que no es más que la comparación de la precisión de estos resultados obtenidos con la definición dada anteriormente.

➤ **Exactitud**

Respecto al parámetro estadístico de “exactitud”, definiéndolo como el grado de aproximación entre el valor obtenido experimental y el valor real o aceptado; se expresa en términos de porcentaje de error relativo, para los estándares de concentraciones menores de 0,1 mg Zn/L utilizadas en este proceso de validación se puede decir que este porcentaje de error esta en el rango de 0,540 y 5,300%.

Este porcentaje de error relativo tan bajo revela y confirma la buena exactitud de la técnica para la determinación de cinc por el método de absorción atómica con llama.

Curva de calibración

➤ **Curva de Ringbom**

La curva de Ringbom obtenida (**GRÁFICO No.1**) muestra la tendencia sigmoideal aplicada a las cuatro (4) concentraciones estándar de 0,1; 0,25; 0,5 y 1,0 mg Zn/L, principalmente en el intervalo de concentración de 0,5 a 1,0 mg Zn/L en el que se cumple la ley de Beer, al no tener desvíos esto quiere decir que no se presentaron desvíos según la ley de Beer, los desvíos enunciados en dicha ley se deben a factores físicos, químicos e instrumentales, llegando a ocurrir el caso el más frecuente es el factor instrumental que es atribuido a la radiación policromática, selección inadecuada de la longitud de onda, fuente de radiación inestable, detectores deficientes y defectos en la parte óptica para la espectrofotometría de absorción atómica con llama, lo que significa que para el proceso de cinc está dentro de las especificaciones requeridas.

➤ **Curva de Crawford**

La medida de la transmitancia esta sujeta a una incerteza llamada error relativo de concentración.

El intervalo en que los resultados producen menor error relativo están entre 0,4 a 0,7 o del 20 al 60% de T (Transmitancia). Para la curva de Crawford obtenida no se aprecia muy bien pues su tendencia es en forma de U, que se debió a los pocos datos de concentración estándar de la muestra tomados para el proceso de validación.

➤ **Curva de calibración comparativa**

Se puede notar que no hay una buena concordancia entre los cinco (5) días consecutivos, de la validación (**Gráfica No 3 y Tabla No 4**), que obedeció posiblemente a elementos que afectaron la sensibilidad como:

Paso óptico (ajuste de la longitud de onda, lámpara, amplitud de abertura del diafragma).

- Llama (ajuste de nebulizador, de gases, de quemador rotacional, de profundidad del quemador).
- Absorbancia (velocidad de aspiración del material por la llama).

➤ **Sensibilidad del método**

La sensibilidad se calcula como el promedio de las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.

La sensibilidad resulta del promedio de la pendiente de la curva de calibración \pm desviación estándar ($0,16995 \pm 0,00286$). El valor a reportar es de 0,16995, lo que significa que este valor corresponde al factor de respuesta del instrumento en función de la concentración.

➤ **Límite de detección**

El límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. En pocas palabras es la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptable.

Este límite de detección es calculado con la mínima concentración que puede leer el espectrofotómetro Perkin Elmer 2380 de acuerdo con las concentraciones estándar que se escogieron para la validación, se tomó la menor y se leyó. Se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_B + 3S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración mínima del estándar

S_B : Desviación estándar

En la determinación de cinc por el método de absorción atómica con llama, utilizando el equipo del **LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA** Perkin Elmer modelo 2380 con base a los patrones de la curva de calibración, se estableció el límite en 0,03 mg Zn/L, para una concentración de 0,02 mgZn/L, obteniéndose una absorbancia de cinco (5) en la lectura de las respectivas muestras para esta concentración; esto significa que es lo mínimo que puede leer el equipo a esta concentración para el cinc.

➤ **7.6. Límite de cuantificación**

El “límite de cuantificación” (o límite de determinación), el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

Este límite de cuantificación se calcula con la misma concentración que se empleo para el límite de detección, solo que esta difiere en el factor que multiplica a la desviación estándar, además el límite de detección no es cuantificable.

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_B + 10S_B^1$$

Donde:

y_B : Concentración cuantificable del estándar

S_B : Desviación estándar

Se determinó para la validación del cinc método de absorción atómica por llama el límite de cuantificación en 0,04 mg Zn/L, para 0,02 mg Zn/L. lo que corresponde a la menor cantidad de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, este valor obtenido nos indica que a esta concentración dada el equipo lo puede cuantificar, de ahí en adelante se hace más difícil apreciar y valorar este dato, pues de una manera u otra lo que se busca es minimizar los errores que el método presenta en cuanto a la precisión y la exactitud.

➤ **Linealidad**

Hace referencia a la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento. Para la determinación de la linealidad se necesito de la tabla de valores de la distribución T para calcular LC 95%, después de haber calculado ANOVA para la variación dentro y entre muestras, reportándose 2,78 para $P=0,05$.

Este valor se toma de acuerdo a los grados de libertad (n-1), es decir cuatro (4) concentraciones estándar tratadas en el proceso de validación, se determina según el contraste (una cola o dos colas), en este caso fue contraste de una cola, pues se utilizo un solo método absorción atómica con llama lo que significa que 2,78 es el dato que se reporta como lineal en la señal que muestra el instrumento para un 95% de confianza.

➤ **Análisis de varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza se define como una técnica estadística muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación.

La hipótesis nula se rechaza cuando la variación entre muestras es mayor que la variación dentro de las muestras.

Normalmente la hipótesis nula se rechaza cuando la probabilidad de que dicha diferencia observada ocurra por azar es menor que 1 en 20 veces (es decir, 0,05 ó 5%). En este caso se dice que la diferencia **es significativa al nivel 0,05 (ó 5%)**. Esto significa que se realiza con un límite de confianza del 95% que es con lo que se trabajo en el proceso de validación.

6.15.9 CONCLUSIONES

- La longitud de onda óptima para realizar la determinación de cinc por el método espectrofotométrico de absorción atómica con llama es de 213,7-213,9 nm.

- Según la curva de Ringbom los datos óptimos, se encuentran en la sección recta correspondiente al ciclo logarítmico entre concentraciones de 0,5 y 1,0 mg/L.
- La curva de calibración comparativa para concentraciones de 0,0 a 1,0 mg Zn/L presenta un coeficiente de correlación de 0,99918 confirmando una buena relación entre la concentración y la absorbancia.
- El método presenta una sensibilidad de 0,16995, la cual corresponde a la pendiente de la curva de calibración de cinc que puede producir un resultado significativo.
- El límite de detección para la determinación de cinc por el método de absorción atómica con llama es 0,03 mg Zn/L. Este límite es la concentración mínima que pudo ser medida con una exactitud aceptable, para una concentración estándar de 0,02 mg Zn/L.
- El límite de cuantificación que se determinó para el cinc fue de 0,04 mg Zn/L siendo esta la menor cantidad de analito que pudo determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas, para una concentración estándar de 0,02 mg Zn/L.
- La linealidad que registra el método en base de la tabla de límite de confianza para un 95% es 2,78 para $P=0,05$, con $n-1$ grados de libertad. Este dato se tomo como valor crítico de t para contraste de una cola, pues se empleo un solo método para llevar a cabo el proceso de validación y es el único dato que se reporta pues es específico para cuatro (4) muestras (concentraciones estándar).
- El análisis de varianza (ANOVA) para la determinación de cadmio por el método de absorción atómica con llama, bajo la hipótesis nula se estimo de dos formas: una la variación dentro de muestras y la otra la variación entre muestras obteniéndose lo siguiente: cuadrado medio dentro de las muestras = 1 con 8 g.l ; cuadrado medio entre muestras = 13457 con 3 g.l con un valor de 5,318 para el contraste de una cola, lo que significa que la hipótesis nula se rechaza porque la variación entre muestras es mayor que la variación dentro de las muestras tomándose 1 con 8 g.l para la posible ubicación del dato a reportar, esto se hizo con el fin de separar y estimar las diferentes causas de variación que pueden conducir a diferencias significativas entre los valores medios obtenidos.

6.16 VALIDACIÓN PROCESO DE CONCENTRACIÓN EN ALUMINIO MÉTODO ABSORCIÓN ATOMICA CON LLAMA

6.16.1 ACTIVIDADES REALIZADAS

- El día veintiuno (21) de marzo se inició la validación del proceso de concentración de muestras reales, los ensayos se llevaron a cabo durante cinco (5) días continuos.
- Se prepararon 1000 mL de una solución estándar de 2,5 ppm a partir de una solución patrón de 1000 ppm de aluminio.
- Llevar a concentración final de 15 mL, adicionando 1 mL de HNO₃ para la digestión ácida.
- Se diluyó la muestra 25 veces para lograr una absorbancia que estuviera dentro del rango de la curva de calibración.
- El factor final se expresó por la siguiente expresión matemática:

$$(F) = 15 / 1000 * 25 / 2,2 * 25 / 5,0$$

NOTA: Para el primero y cuarto día se tomó como primera dilución 25/2,2 y para el segundo, tercero y quinto día del proceso de validación se tomó como segunda dilución 25/5,0. Esto se hizo con el fin de observar en que rango se encontraba mejor la concentración a la que se llevó este proceso de concentración del aluminio.

Los cálculos se realizaron con base a:

- Las curvas de calibración.
- Las condiciones de análisis estipuladas en el Protocolo de la Técnica con código de calidad (CALIDAD ITD-PTAL-01)

RESULTADOS OBTENIDOS

No. Ensayo	Resultado mg/L
1	2,54
2	2,34
3	2,10
4	2,46
5	2,30
Promedio	2,35
Desviacion estandar	0,17

Como el tamaño de la muestra es pequeña (lote de muestra menor a diez), el límite de confianza al 95% de la media viene dado por la siguiente fórmula:

$$\bar{X} \pm t_{n-1} s / \sqrt{n}$$

Donde:

\bar{X} : media o promedio

t_{n-1} : (n-1) indica que t depende de esta cantidad, que se conoce como el número de **grados de libertad, g.l.** (cuyo símbolo habitual es v).

S: desviación estándar

n: número de muestras

El valor de t se toma de la tabla A.2¹, llamada La distribución t la cual da 2,78 para un 95% de intervalo de confianza y de un contraste de una cola (un solo método empleado).

Al reemplazar tenemos:

$$2,35 \pm 2,78 \times 0,17 / \sqrt{5} = 2,35 \pm 0,21$$

6.16.2 CONCLUSIÓN

Se puede concluir que el límite de confianza es útil para calcular la estimación de precisión, con base en la estimación de la cantidad medida y de la desviación estándar con el correspondiente número de cifras decimales. Así podemos detectar posibles errores sistemáticos en la validación proceso de concentración en aluminio, indicando que esta es la probabilidad de encontrar el intervalo de confianza al 95% para una concentración de 2,5 mg Al/L.

6.17 VALIDACIÓN PROCESO DE CONCENTRACIÓN EN CADMIO MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA

6.17.1 ACTIVIDADES REALIZADAS

- El día veintitrés (23) de febrero a las 10h: 05min se inició la validación del proceso de concentración de muestras reales, los ensayos se llevaron a cabo durante cinco (5) días continuos.
- Se prepararon 1000 mL de una solución estándar de 0,05 ppm a partir de una solución patrón de 1000 ppm de cadmio.
- Llevar a concentración final de 15 mL, adicionando 1 mL de HNO₃ para la digestión ácida.
- Se diluyó la muestra 25 veces para lograr una absorbancia que estuviera dentro del rango de la curva de calibración.
- El factor final esta dado por la siguiente expresión matemática:

$$(F) = 15 / 1000 \times 25 / 2,0$$

Los cálculos se realizaron con base a:

- Las curvas de calibración.
- Las condiciones de análisis estipuladas en el Protocolo de la Técnica con código de calidad (CALIDAD ITD-PTCD-01)

RESULTADOS OBTENIDOS

No. Ensayo	Resultado mg/L
1	0,05
2	0,04
3	0,04
4	0,04
5	0,05
Promedio	0,04
Desviación estandar	0,005

Como el tamaño de la muestra es pequeña (lote de muestra menor a diez), el límite de confianza al 95% de la media viene dado por la siguiente fórmula:

$$\bar{X} \pm t_{n-1} s / \sqrt{n}$$

Donde:

-

X: media o promedio

t_{n-1}: (n-1) indica que t depende de esta cantidad, que se conoce como el número de **grados de libertad, g.l.** (cuyo símbolo habitual es v).

S: desviación estándar

n: número de muestras

El valor de t se toma de la tabla A.2¹, llamada La distribución t la cual da 2,78 para un 95% de intervalo de confianza y de un contraste de una cola (un solo método empleado).

Al reemplazar tenemos:

$$0,04 \pm 2,78 \times 0,005 / \sqrt{5} = 0,04 \pm 0,006$$

6.17.2 CONCLUSIÓN

Se puede concluir que el límite de confianza es útil para calcular la estimación de precisión, con base en la estimación de la cantidad medida y de la desviación estándar con el correspondiente número de cifras decimales. Así podemos detectar posibles errores sistemáticos en la validación proceso de concentración en cadmio, indicando que esta es la probabilidad de encontrar el intervalo de confianza al 95% para una concentración de 0,05 mg Cd/L.

6.18 VALIDACIÓN PROCESO DE CONCENTRACIÓN EN COBRE MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA

6.18.1 ACTIVIDADES REALIZADAS

- El día veintitrés (23) de febrero a las 12h:05 min se inició la validación del proceso de concentración de muestras reales, los ensayos se llevaron a cabo durante cinco (5) días continuos.
- Se prepararon 1000 mL de una solución estándar de 1 ppm a partir de una solución patrón de 1000 ppm de cobre.
- Llevar a concentración final de 15 mL, adicionando 1 mL de HNO₃ para la digestión ácida.
- Se diluyó la muestra 25 veces (se realizó dos veces la dilución), para lograr una absorbancia que estuviera dentro del rango de la curva de calibración.
- El factor final está dado por la siguiente expresión matemática:

$$(F) = 15 / 1000 \times 25 / 2,2 \times 25 / 2,5$$

NOTA: Para el primer día del proceso de validación se tomó como primera dilución 25/2,2 y para los demás días se tomó como segunda dilución 25/2,5. Esto se hizo con el fin de observar en qué rango se encontraba mejor la concentración a la que se quería llevar este proceso de concentración del cobre.

Los cálculos se realizaron con base a:

- Las curvas de calibración.
- Las condiciones de análisis estipuladas en el Protocolo de la Técnica con código de calidad (CALIDAD ITD-PTCU-01)

RESULTADOS OBTENIDOS

No. Ensayo	Resultado mg/L
1	0,58
2	0,43
3	0,66
4	0,60
5	0,68
Promedio	0,59
Desviación estándar	0,10

Como el tamaño de la muestra es pequeña (lote de muestra menor a diez), el límite de confianza al 95% de la media viene dado por la siguiente fórmula:

$$\bar{X} \pm t_{n-1} s / \sqrt{n}$$

Donde:

-

\bar{X} : media o promedio

t_{n-1} : (n-1) indica que t depende de esta cantidad, que se conoce como el número de **grados de libertad, g.l.** (cuyo símbolo habitual es ν).

S: desviación estándar

n: número de muestras

El valor de t se toma de la tabla A.2¹, llamada La distribución t la cual da 2,78 para un 95% de intervalo de confianza y de un contraste de una cola (un solo método empleado).

Al reemplazar tenemos:

$$0,59 \pm 2,78 \times 0,10 / \sqrt{5} = 0,59 \pm 0,12$$

6.18.2 CONCLUSIÓN

Se puede concluir que el límite de confianza es útil para calcular la estimación de precisión, con base en la estimación de la cantidad medida y de la desviación estándar con el correspondiente número de cifras decimales; esto con el fin de detectar posibles errores sistemáticos en la validación proceso de concentración en cobre, lo que indica que esta es la probabilidad de encontrar el intervalo de confianza al 95% para una concentración de 1,0 mgCu/L.

6.19 VALIDACIÓN PROCESO DE CONCENTRACIÓN EN MANGANESO MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA

6.19.1 ACTIVIDADES REALIZADAS

- El día veintiuno (21) de marzo se inició la validación del proceso de concentración de muestras reales, los ensayos se llevaron a cabo durante cinco (5) días continuos.
- Se prepararon 1000 mL de una solución estándar de 2,5 ppm a partir de una solución patrón de 1000 ppm de aluminio.
- Llevar a concentración final de 15 mL, adicionando 1 mL de HNO₃ para la digestión ácida.
- Se diluyó la muestra 25 veces para lograr una absorbancia que estuviera dentro del rango de la curva de calibración.
- El factor final esta dado por la siguiente expresión matemática:

$$(F) = 15 / 1000 \times 25 / 2,2$$

NOTA: El primer día del proceso de validación se tomo como primera dilución 25/2,0, para los demás días se tomo como dilución 25/2,2. Esto se hizo con el fin de observar en que rango se encontraba mejor la concentración a la que se quería llevar este proceso de concentración del manganeso.

Los cálculos se realizaron con base a:

- Las curvas de calibración.
- Las condiciones de análisis estipuladas en el Protocolo de la Técnica con código de calidad (CALIDAD ITD-PTMN-01)

RESULTADOS OBTENIDOS

No. Ensayo	Resultado mg/L
1	0,20
2	0,24
3	0,20
4	0,20
5	0,22
Promedio	0,21
Desviación estandar	0,02

Como el tamaño de la muestra es pequeña (lote de muestra menor a diez), el límite de confianza al 95% de la media viene dado por la siguiente fórmula:

$$\bar{X} \pm t_{n-1} s / \sqrt{n}$$

Donde:

-

X: media o promedio

t_{n-1}: (n-1) indica que t depende de esta cantidad, que se conoce como el número de **grados de libertad, g.l.**(cuyo símbolo habitual es v).

S: desviación estándar

n: número de muestras

El valor de t se toma de la tabla A.2¹, llamada La distribución t la cual da 2,78 para un 95% de intervalo de confianza y de un contraste de una cola (un solo método empleado).

Al reemplazar tenemos:

$$0,21 \pm 2,78 \times 0,02 / \sqrt{5} = 0,21 \pm 0,02$$

6.19.2 CONCLUSIÓN

Se puede concluir que el límite de confianza es útil para calcular la estimación de precisión, con base en la estimación de la cantidad medida y de la desviación estándar con el correspondiente número de cifras decimales; esto con el fin de detectar posibles errores sistemáticos en la validación proceso de concentración en aluminio, lo que indica que esta es la probabilidad de encontrar el intervalo de confianza al 95% para una concentración de

2,5 mg Mn/L.

6.20 VALIDACIÓN PROCESO DE CONCENTRACIÓN EN NÍQUEL MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA

6.20.1 ACTIVIDADES REALIZADAS

- El día siete (7) de marzo a las 10 h: 00 min se inició la validación del proceso de concentración de muestras reales, los ensayos se llevaron a cabo durante cinco (5) días continuos.
- Se prepararon 1000 mL de una solución estándar de 1 ppm a partir de una solución patrón de 1000 ppm de níquel.
- Llevar a concentración final de 15 mL, adicionando 1 mL de HNO₃ para la digestión ácida.
- Se diluyó la muestra 25 veces para lograr una absorbancia que estuviera dentro del rango de la curva de calibración.
- El factor final está dado por la siguiente expresión matemática:

$$(F) = 15/500 \times 25/2,0$$

Los cálculos se realizaron con base a:

- Las curvas de calibración.
- Las condiciones de análisis estipuladas en el Protocolo de la Técnica con código de calidad (CALIDAD ITD-PTNI-01)

RESULTADOS OBTENIDOS

No. Ensayo	Resultado mg/L
1	0,75
2	1,00
3	0,86
4	0,85
5	0,96
Promedio	0,88
Desviación estandar	0,10

Como el tamaño de la muestra es pequeña (lote de muestra menor a diez), el límite de confianza al 95% de la media viene dado por la siguiente fórmula:

$$\bar{X} \pm t_{n-1} s / \sqrt{n}$$

Donde:

-

X: media o promedio

t_{n-1}: (n-1) indica que t depende de esta cantidad, que se conoce como el número de **grados de libertad, g.l.**(cuyo símbolo habitual es v).

S: desviación estándar

n: número de muestras

El valor de t se toma de la tabla A.2¹, llamada La distribución t la cual da 2,78 para un 95% de intervalo de confianza y de un contraste de una cola (un solo método empleado).

Al reemplazar tenemos:

$$0,88 \pm 2,78 \times 0,10 / \sqrt{5} = 0,88 \pm 0,12$$

6.20.2 CONCLUSIÓN

Se puede concluir que el límite de confianza es útil para calcular la estimación de precisión, con base en la estimación de la cantidad medida y de la desviación estándar con el correspondiente número de cifras decimales; esto con el fin de detectar posibles errores sistemáticos en la validación proceso de concentración en níquel, lo que indica que esta es la probabilidad de encontrar el intervalo de confianza al 95% para una concentración de 1,0 mg Ni/L.

6.21 VALIDACIÓN PROCESO DE CONCENTRACIÓN EN PLOMO MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA

6.21.1 ACTIVIDADES REALIZADAS

- El día veintitrés (23) de febrero a las 10 h: 35 min se inició la validación del proceso de concentración de muestras reales, los ensayos se llevaron a cabo durante cinco (5) días continuos.
- Se prepararon 1000 mL de una solución estándar de 1 ppm a partir de una solución patrón de 1000 ppm de plomo.
- Llevar a concentración final de 15 mL, adicionando 1 mL de HNO₃ para la digestión ácida.
- Se diluyó la muestra 25 veces para lograr una absorbancia que estuviera dentro del rango de la curva de calibración.
- El factor final está dado por la siguiente expresión matemática:

$$(F) = 15 / 500 \times 25 / 2,2$$

Los cálculos se realizaron con base a:

- Las curvas de calibración.
- Las condiciones de análisis estipuladas en el Protocolo de la Técnica con código de calidad (CALIDAD ITD-PTPB-01)

RESULTADOS OBTENIDOS

No. Ensayo	Resultado mg/L
1	0,71
2	0,80
3	1,16
4	1,09
5	1,25
Promedio	1,00
Desviación estándar	0,24

Como el tamaño de la muestra es pequeña (lote de muestra menor a diez), el límite de confianza al 95% de la media viene dado por la siguiente fórmula:

$$\bar{X} \pm t_{n-1} s / \sqrt{n}$$

Donde:

-

\bar{X} : media o promedio

t_{n-1} : (n-1) indica que t depende de esta cantidad, que se conoce como el número de **grados de libertad, g.l.** (cuyo símbolo habitual es ν).

S: desviación estándar

n: número de muestras

El valor de t se toma de la tabla A.2¹, llamada La distribución t la cual da 2,78 para un 95% de intervalo de confianza y de un contraste de una cola (un solo método empleado).

Al reemplazar tenemos:

$$1,00 \pm 2,78 \times 0,24 / \sqrt{5} = 1,00 \pm 0,29$$

6.21.2 CONCLUSIÓN

Se puede concluir que el límite de confianza es útil para calcular la estimación de precisión, con base en la estimación de la cantidad medida y de la desviación estándar con el correspondiente número de cifras decimales; esto con el fin de detectar posibles errores sistemáticos en la validación proceso de concentración en plomo, lo que indica que esta es la probabilidad de encontrar el intervalo de confianza al 95% para una concentración de 1,0 mgPb/L.*

6.22 VALIDACIÓN PROCESO DE CONCENTRACIÓN EN CINCO MÉTODO DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA

6.22.1 ACTIVIDADES REALIZADAS

- El día veintitres (23) de febrero a las 12h:30 min se inició la validación del proceso de concentración de muestras reales, los ensayos se llevaron a cabo durante cinco (5) días continuos.
- Se prepararon 1000 mL de una solución estándar de 0,25 ppm a partir de una solución patrón de 1000 ppm de cinc.
- Llevar a concentración final de 15 mL, adicionando 1 mL de HNO₃ para la digestión ácida.
- Se diluyó la muestra 25 veces para lograr una absorbancia que estuviera dentro del rango de la curva de calibración.
- El factor final está dado por la siguiente expresión matemática:

$$(F) = 15 / 1000 \times 25 / 2,0 \times 25 / 2,5$$

NOTA: aunque el primer día del proceso de validación se tomó como primera dilución 25/2,2, en los demás días se tomó la dilución de 2,0. Esto se hizo con el fin de observar en qué rango se encontraba mejor la concentración a la que se quería llevar este proceso de concentración del cinc.

Los cálculos se realizaron con base a:

- Las curvas de calibración.
- Las condiciones de análisis estipuladas en el Protocolo de la Técnica con código de calidad (CALIDAD ITD-PTZN-01)

RESULTADOS OBTENIDOS

No. Ensayo	Resultado mg/L
1	0,27
2	0,18
3	0,23
4	0,23
5	0,22
Promedio	0,22
Desviación estándar	0,03

Como el tamaño de la muestra es pequeña (lote de muestra menor a diez), el límite de confianza al 95% de la media viene dado por la siguiente fórmula:

$$\bar{X} \pm t_{n-1} s / \sqrt{n}$$

Donde:

-

\bar{X} : media o promedio

t_{n-1} : (n-1) indica que t depende de esta cantidad, que se conoce como el número de **grados de libertad, g.l.** (cuyo símbolo habitual es ν).

S: desviación estándar

n: número de muestras

El valor de t se toma de la tabla A.2¹, llamada La distribución t la cual da 2,78 para un 95% de intervalo de confianza y de un contraste de una cola (un solo método empleado).

Al reemplazar tenemos:

$$0,22 \pm 2,78 \times 0,03 / \sqrt{5} = 0,22 \pm 0,03$$

6.22.2 CONCLUSIÓN

Se puede concluir que el límite de confianza es útil para calcular la estimación de precisión, con base en la estimación de la cantidad medida y de la desviación estándar con el correspondiente número de cifras decimales. Así podemos detectar posibles errores sistemáticos en la validación proceso de concentración en cinc, indicando que esta es la probabilidad de encontrar el intervalo de confianza al 95% para una concentración de 0,25 mg Zn/L.

CONCLUSIONES GENERALES

Como meta propuesta en esta pasantía empresarial, en el LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA, en Bogotá que se realizó con una duración de ochocientas (800) horas se concluyó lo siguiente:

- Los materiales y equipos empleados durante el proceso de validación se calibraron o ya tenían un certificado de calibración y de mantenimiento que permitieron obtener unos resultados óptimos y confiables que se ajustaran a las condiciones de cada método.

- Cada uno de los objetivos trazados y propuestos en la validación de los quince (15) métodos se cumplieron con gran éxito dando así un avance más hacia el acceso de acreditación ante el IDEAM y la certificación bajo la norma **ISO 17025. REQUISITOS GENERALES DE COMPETENCIAS DE LABORATORIOS DE ENSAYO Y CALIBRACIÓN.**

- El LABORATORIO QUIMICONTROL LTDA dispone de personal idóneo, capacitado, de recursos técnicos que permiten mejorar cada día como laboratorio ambiental que es, siguiendo unos requisitos específicos para cada una de las metodologías desarrolladas.

- Los parámetros estadísticos determinados para cada una de las metodologías validadas fueron de fácil ejecución siguiendo cada uno de los pasos preliminares soportados en toda la documentación que se hizo (protocolos, condiciones de trabajo, diagramas de flujo, formato de captura de datos, informe de validación, validación de proceso de concentración (sólo para metales) y validación de los diferentes métodos), dando así la aceptación y continuidad en este laboratorio.

- La metodología que se llevo a cabo fue de manera práctica y recursiva atendiendo a la norma requerida por la **ISO 17025.**

BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19 ed., New York, 1995.
- Clavijo Díaz Alfonso. Fundamentos de Química Analítica. Equilibrio Iónico y análisis químico. 1ª edición., Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 2002.
- _____. Compendio: Tesis y otros trabajos de grado. Bogotá: ICONTEC, 2006-2007.
- _____. Calidad del agua: Determinación de metales por espectrofotometría de absorción atómica con llama. Bogotá: ICONTEC, 1996. (NTC 4717)
- _____. Guía para el aseguramiento de la calidad analítica de laboratorios ambientales. Bogotá: ICONTEC, 2001. (NTC-ISO-IEC 17025)
- IDEAM. El medio ambiente en Colombia [en línea]. 2ª versión de la edición de 1998. Bogotá, IDEAM, 2001. Disponible en Internet: <http://www.ideam.gov.co/publica/index4.htm> <
- IDEAM, Programa de Físicoquímica Ambiental. Protocolo estandarización de métodos analíticos. Bogotá, 1999. Disponible en Internet: < <http://www.ideam.gov.co/publica/index4.htm> >.
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS. Cómo implementar un sistema de gestión práctico y eficaz en laboratorios de ensayo y calibración. Bogotá: ICONTEC, 2004.
- ¹_____ MILLER, J.C y MILLER, J.N. Estadística y quimiometría para química analítica. 4ª edición. México, Addison-Wesley Iberoamericana, 1999.
- PERKIN ELMER. Manual de Instrucciones del espectrofotómetro de AA modelo 2380.

- RODIER, J. Análisis de Aguas: aguas naturales, aguas residuales, agua de mar. Barcelona, Omega, 1981.
- SKOOG, Douglas; WEST, Donald. Química analítica. 7a edición. Madrid, España: Mc Graw Hill, 2001.
- SKOOG, Douglas; y LEARY, James. Análisis Instrumental. 4a edición. Madrid, España: Mc Graw Hill, 1994.
- Valcárcel Miguel. Principios de química analítica. Barcelona, Springer Verlag Ibérica, S.A, 1999.

ANEXOS

ANEXO A. TABLAS DE VALORES ESTADÍSTICOS.

Tabla 1. Valores críticos T para rechazos de datos

n	95%	n	95%	n	95%	n	95%
3	1,15	11	2,24	19	2,53	27	2,69
4	1,146	12	2,29	20	2,56	28	2,71
5	1,67	13	2,33	21	2,58	29	2,72
6	1,82	14	2,37	22	2,6	30	2,74
7	1,94	15	2,41	23	2,62	31	2,87
8	2,03	16	2,44	24	2,64	32	2,96
9	2,11	17	2,47	25	2,66	33	3,03
10	2,18	18	2,50	26	2,67	34	3,21

Tabla 2. Valores de la distribución t para calcular LC 95%

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

ANEXO B. FOTOGRAFÍAS DE LOS EQUIPOS EMPLEADOS EN LA VALIDACIÓN



Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, modelo 2380, marca Perkin Elmer. Con certificado de calibración.



Espectrofotómetro Spectronic 20D, modelo 333175, marca Milton Roy. Con certificado de calibración.



pHmetro, modelo 37, marca Orion.



Balanza Analítica, modelo BP112D, marca Sartorius, con cinco (5) cifras decimales. Con Certificado de calibración.



Turbidímetro digital, marca Orbeco Hellige.



Micro-Kjeldahl

