

**IMPLEMENTACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE ENSAYO
PARA LA DETERMINACIÓN DE CADMIO, COBRE Y ZINC EN AGUAS
RESIDUALES POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA EN EL
LABORATORIO CONSTRUCSUELOS SUMINISTROS LTDA**

HERNAN DARIO DOMINGUEZ



**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2018**

**IMPLEMENTACIÓN Y ESTANDARIZACION DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE CADMIO COBRE Y ZINC EN AGUAS
RESIDUALES POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA EN EL
LABORATORIO CONSTRUCSUELOS SUMINISTROS LTDA**

**Proyecto de trabajo de grado en modalidad de pasantía
Requisito parcial para optar el título de Químico**

HERNAN DARIO DOMINGUEZ

DIRECTOR

**Dr. EDIER HUMBERTO PEREZ
GRUPO DE INVESTIGACION EN AGROQUÍMICA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2018**

DEDICATORIA

Este trabajo de grado
se lo dedico a mi Dios,
quien supo guiarme por el buen camino,
darme fuerzas para seguir adelante
y no desmayar en los problemas
que se presentaban,
ensañándome a vencer las adversidades
sin perder nunca la dignidad
ni desfallecer en el intento.

A mi familia
quienes por ellos soy lo que soy.
Para mis padres por su inmenso apoyo
consejos, comprensión, amor,
ayuda en los momentos difíciles
y por ayudarme con los recursos necesarios
Me han dado todo lo que soy como persona,

mis valores, mis principios, mi carácter,
mi empeño, mi perseverancia, mi coraje
para conseguir mis metas.

Gracias también
a mis queridos compañeros de estudio
y a mis compañeros de trabajo,
que me apoyaron y me permitieron
entrar en su vida durante estos años
de aprendizaje constante.

Gracias a mis tutores,
ya que debido a ellos
tengo buenas bases y principios académicos
para desempeñarme correctamente
en los obstáculos de la VIDA.

TABLA DE CONTENIDO

	PÁG
1. RESUMEN	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3. OBJETIVOS	15
3.1. OBJETIVO GENERAL	15
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	16
4.1. AGUAS RESIDUALES	17
4.2. DETERMINACION DE METALES POR E.A.A	17
4.2.1 La espectroscopia de absorción atómica por llama directa (EAA-LI)	18
4.2.2. Interferencias	18
4.3. NORMATIVIDAD	19
Norma Internacional ISO/IEC 17025:2005	20
4.4. ACREDITACIÓN	20
4.5. ESTANDARIZACION	21
4.6. FIGURAS IMPORTANTES DE MERITOS ANALITICOS	21
4.6.1. Exactitud.	21
4.6.2. Precisión	22
4.6.3. Límite de detección (LOD).	22
4.6.4. Límite de cuantificación (LOQ)	23
4.6.5. Límite de detección instrumental	23
4.6.6. Linealidad	23
4.6.7. Sensibilidad.	24

4.6.8.	Repetibilidad.	24
4.6.9.	Precisión Intermedia.	24
4.6.10.	Calculo de la Incertidumbre.	25
4.7.	ANALISIS ESTADISTICO	28
4.7.1.	Pruebas De Normalidad	28
4.7.2.	Pruebas Paramétricas	29
4.7.3.	Pruebas no paramétricas	30
4.7.4.	Análisis de regresión lineal	31
5.	METODOLOGIA	32
5.1.	PREVALIDACION	32
5.2.	EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS	33
5.3.	ESTANDARIZACIÓN	33
5.3.1.	Lavado del material usado en la estandarización	34
5.3.2.	Metodología de calibración del material usado en la estandarización	34
5.3.3.	Implementación de las metodologías	34
5.3.4.	Implementación de la metodología en muestras	35
5.3.5.	Preparación de las Muestras	36
5.3.6.	Fortificación de muestras	36
5.3.7.	Análisis de muestras	37
5.3.8.	Evaluación estadística de los resultados.	38
6.	RESULTADOS Y ANALISIS	39
6.1.	LINEALIDAD INSTRUMENTAL	39
6.2.	PRECISION INSTRUMENTAL	47
6.3.	LIMITES CRÍTICOS	49
6.4.	IMPLEMENTACION DE LA METODOLOGIA	50
6.4.1.	Linealidad	50
6.4.2.	Precisión y Exactitud	50

6.4.3.	Implementación de las metodologías en aguas residuales	52
6.4.4.	Prueba de desempeño y competencia para el análisis de cadmio cobre y Zinc en aguas.	53
6.5.	ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA DETERMINACIÓN DE CADMIO, COBRE Y ZINC	54
7.	RESUMEN DE LAS METODOLOGIAS IMPLEMENTADAS	55
8.	CONCLUSIONES	56
9.	BIBLIOGRAFIA	57

INDICÉ DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Codificación de muestras de agua residual.	37
Tabla 2. Resultados para la evaluación de la linealidad instrumental	39
Tabla 3. Prueba de normalidad de datos en función del día	40
Tabla 4. Prueba de normalidad de datos en función de la concentración	40
Tabla 5. ANOVA para absorbancia en función del día	41
Tabla 6. ANOVA para absorbancia en función del nivel de concentración	41
Tabla 7. Prueba de Tukey (post hoc) Absorbancia Vs Nivel de Concentración.	42
Tabla 8. Pendientes, interceptos y coeficientes de correlación de las curvas de calibración en la determinación de linealidad	45
Tabla 9. Correlación de Pearson para evaluar la linealidad de las curvas	46
Tabla 10. Análisis de varianza para evaluar la regresión lineal en la curva de calibración	46
Tabla 11. Curvas de calibraciones bajo condición de repetibilidad	47
Tabla 12. Curvas de calibraciones bajo condición de precisión intermedia	47
Tabla 13. Precisión instrumental bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.	48
Tabla 14. Calculo del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del método	49

Tabla 15	Determinación Experimental del límite de cuantificación LOQ.	50
Tabla 16	Curvas de calibración en la determinación de precisión intermedia	51
Tabla 17	Determinación de precisión y exactitud del método.	51
Tabla 18	Pruebas de Normalidad en la determinación de precisión y exactitud del método	52
Tabla 19.	Resultados de los análisis a muestras de agua residual	53
Tabla 20.	Resultados de las pruebas de desempeño Inter laboratorios.	54
Tabla 21.	Resumen de las metodologías implementadas.	55

LISTA DE FIGURAS

		Pág
Figura 1	Curvas de calibración de Cadmio en la determinación de linealidad instrumental en absorción atómica llama aire acetileno durante los 7 días de ensayo	43
Figura 2	Curvas de calibración de Cobre en la determinación de linealidad instrumental en absorción atómica llama aire acetileno durante los 7 días de ensayo	44
Figura 3	Curvas de calibración de Zinc en la determinación de linealidad instrumental en absorción atómica llama aire acetileno durante los 7 días de ensayo	44
Figura 4	Diagrama de Espina de pescado en la evaluación de incertidumbre.	54

ACRÓNIMOS

AA: Aire – acetileno

ANOVA: Análisis de la Varianza

b: Intercepto de la curva en el eje Y

CV: Coeficiente de variación

EAA: Espectroscopía de Absorción atómica

ENA : Estudio nacional del agua

FOR: Formato

gl: Grados de libertad

Ha: Hipótesis alternativa

Ho: Hipótesis nula

IDEAM: Instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales.

IT: Instructivo técnico

LOD: Limite de detección

LOQ: Limite de Cuantificación

m: Pendiente de la curva

OA: Óxido nitroso – acetileno

PEA: Procedimiento de ensayo de aguas

r: Coeficiente de correlación

r²: Coeficiente de regresión

R: Recuperación

RSD: Desviación estándar relativa.

RSDt: Desviación estándar relativa total

S: Desviación estándar

SM: Standard methods for the examination of water & wastewater

SPSS: Statistical product and service solutions.

SRp: Desviación estándar relativa de los recuperados

PGC: Proceso de gestión de calidad

1. RESUMEN

El presente proyecto tiene como objetivo la estandarización del método espectrofotométrico de Absorción Atómica de Llama con el fin de contribuir en el proceso de ampliación del alcance de la acreditación de Construcsuelos Suministros LTDA, otorgada por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales **IDEAM**, bajo la Norma técnica ISO/IEC 17025:2005.

Siguiendo los procedimientos establecidos en el sistema de calidad del laboratorio, se implementaron, estandarizaron y se pusieron en marcha, metodologías analíticas para la determinación de 3 metales pesados en muestras de agua residual industrial mediante la técnica instrumental de espectroscopia de absorción atómica de llama directa, con los equipos, materiales y reactivos disponibles.

Se dio inicio con la fase experimental realizando curvas de calibración usando soluciones patrón certificadas con el fin de determinar, rango de trabajo, linealidad, y repetibilidad. Una vez evaluada la parte instrumental, se implementaron metodologías de digestión para la cuantificación de metales en muestras reales.

Se evaluaron criterios de calidad analítica como límite de cuantificación y de detección, sensibilidad, linealidad, exactitud, precisión, porcentaje de recuperación e incertidumbre que soportan la evaluación estadística del método y los cuales estuvieron dentro del rango esperado de aceptación cumpliendo con lineamientos establecidos en el sistema de gestión.

El análisis estadístico de los datos obtenidos experimentalmente se realizó con el paquete estadístico Statistical Product and Service Solutions (SPSS) versión 24. Se cumplieron criterios de aceptación de ensayo conforme.

Se logró la confirmación e implementación de metodologías reproducibles basadas en métodos normalizados empleando reactivos de referencia de grado analítico, materiales con baja incertidumbre, muestras reales y muestras certificadas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El agua es el principal constituyente de nuestro planeta. Las fuentes naturales de agua fresca provienen de ríos, lagos, glaciares y grandes sistemas subterráneos. Metales como Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mg, Mn, Zn, etc. pueden estar presentes en el agua potable debido a razones geológicas o actividades antropogénicas como la descarga descontrolada de aguas residuales de diferentes tipos de industrias.^[1]

En septiembre de 2015, la Asamblea general de la ONU, acordó como objetivo: “asegurar la disponibilidad y la gestión sostenible de agua y saneamiento para todos”, otorgándole al agua un carácter prioritario para todos los países. La contaminación ambiental se posiciona como uno de los más importantes problemas que afectan a la sociedad del siglo XXI. La tasa de contaminación del agua puede ser estimada en 2000 millones de metros cúbicos diarios.^[2]

En Colombia, la principal institución responsable de vigilar la condición de los recursos hídricos en todo el territorio nacional es el instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales (IDEAM), el cual desde su creación hace veinte años, está a cargo del monitoreo de la disponibilidad y calidad del recurso hídrico. A su vez, las autoridades ambientales regionales, son responsable del monitoreo de cuerpos de aguas pertenecientes a cada región. El manejo del recurso es dividido en cuatro grandes grupos: planeación, administración, seguimiento y monitoreo y manejo de conflictos relacionados con el agua.

Sin embargo, mientras el IDEAM da las pautas para las actividades de seguimiento y monitoreo, la mayoría de las autoridades no realizan estos procesos. Es importante notar que solo ocho de las 39 autoridades ambientales tienen un grupo o una unidad de recursos hídricos en su estructura organizacional, es decir, que en la mayoría de los casos las diferentes funciones de la gerencia de los recursos hídricos están dispersos dentro de la política nacional para la gestión integral del recurso, con lo que se afirma que en el país no existe un monitoreo periódico, sistemático y articulado de la calidad del agua de las superficies y fuentes de agua subterránea. En términos generales, es evidente que hay una afectación de los recursos de calidad del agua, con el consecuente efecto sobre la disponibilidad para diferentes usos, con mayor intensidad en ciertas áreas y cuerpos de agua. En consecuencia, es necesario tener información disponible con mayor cobertura, continuidad y resolución para hacer un diagnóstico más centrado en tiempo y espacio^[3].

Existe entonces, un creciente interés en el conocimiento de los niveles de contaminación y su impacto sobre el medio ambiente. Sin embargo, la efectividad de los estudios cuantitativos de estas alteraciones, solo podrá asegurarse si se dispone de metodologías analíticas precisas y reproducibles y con ciertos atributos estadísticos que son evaluados mediante la estandarización, el cual es un aspecto clave en el aseguramiento de la calidad de los resultados y en la demostración de la competencia técnica por parte de los laboratorios medioambientales.

El laboratorio Construcsuelos Suministros LTDA, empresa prestadora de servicios de análisis fisicoquímico de aguas, ofrece un amplio portafolio de servicios para el análisis de aguas de desecho o residuales provenientes de sectores urbanos, comerciales, académicos, industriales, institucionales y de la comunidad en general, y dentro de los cuales está la determinación de metales mediante espectroscopia de absorción atómica, pero no cuenta con metodologías debidamente implementadas para la realización de los ensayos dentro del alcance de la acreditación. Es por esta razón que se elige la metodología de digestión acida (SM 3030 E), con el fin de reducir la interferencia por la presencia de materia orgánica y convertir los metales asociados con partículas a una forma (usualmente el ion metálico libre) que pueda ser determinada por espectroscopia de absorción atómica llama aire-acetileno (SM 3111B).

Se alcanzaron los objetivos de este proyecto logrando estandarizar y verificar metodologías normalizadas para la determinación de Cadmio, Cobre y Zinc en agua residual mediante la técnica de espectroscopia de absorción atómica por llama con la generación de datos estadísticamente confiables. Finalmente se realizó la documentación del ensayo y del método logrando así mejoras en el proceso de extensión de la acreditación del laboratorio bajo la norma ISO/IEC 17025:2005: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Implementar un método de ensayo de laboratorio para la determinación de Cadmio (Cd), Cobre (Cu) y Zinc (Zn) en muestras de agua residual proveniente de vertimientos en el municipio de Neiva, mediante la técnica de Espectroscopia de absorción atómica de llama para el laboratorio Construcsuelos Suministros LTDA., bajo la norma técnica ISO/IEC 17025:2005

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar e implementar metodologías analíticas necesarias para la determinación de metales traza como cadmio, zinc y cobre por medio de espectroscopia de absorción atómica de llama.
- Determinar parámetros como linealidad instrumental, exactitud, precisión, límites de detección y de cuantificación e incertidumbre para las metodologías de los metales a estandarizar.
- Implementar metodologías de digestión de muestras para la determinación de metales totales en aguas residuales.
- Realizar el proceso de estandarización y demostrar la competencia técnica de las metodologías analíticas implementadas mediante la realización de pruebas de evaluación del desempeño con muestras certificadas suministradas por el organismo de acreditación.
- Elaborar la documentación referente al desarrollo del método como procedimientos, instructivos técnicos, formatos de captura de datos e informe de estandarización en el marco del sistema de gestión de calidad del laboratorio de aguas Construcsuelos Suministros LTDA.

4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

El agua es uno de los principales componentes del planeta tierra; alrededor del 98% corresponde a agua salada que se encuentra en mares y océanos, el agua dulce que poseemos en un 69% corresponde a agua atrapada en glaciares y nieves, un 30% está constituida por aguas subterráneas y una cantidad no superior al 0,7% se encuentra en forma de ríos y lagos. Es un recurso valioso en virtud de la creciente demanda en todo el mundo y está expuesta a numerosas fuentes de contaminación. Industrias como la minería, el acero y galvanización, hacen sus descargas de efluentes en ríos, quebradas, en el mar, etc.; generando un impacto adverso sobre el medio ambiente ^[4].

Una de las fuentes hídricas más importantes de Colombia es el río Magdalena y la mayoría de la población del país depende de él como fuente de abastecimiento de agua y comida. Varios pueblos en Colombia carecen de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales, afectando el ecosistema y la biodiversidad por la descarga directa de contaminantes, en el río, incluyendo residuos municipales e industriales, desechos contaminados de la minería, actividades del petróleo y de la agricultura ^[5].

Un claro ejemplo de esta problemática se presenta en el municipio de Neiva, capital del departamento del Huila, la cual carece de planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) y en que en la actualidad cuenta con más de 10 vertimientos puntuales sobre el río.

Según el estudio nacional del agua (ENA), llevado a cabo por el IDEAM y por el ministerio del medio ambiente en el 2014, las presiones por contaminación que potencialmente se están ejerciendo sobre los sistemas hídricos y cuerpos del agua del país evalúan el estado y tendencias de las condiciones de calidad del agua ^[6].

Para controlar las descargas en los efluentes en Colombia el ministerio de ambiente y desarrollo sostenible se estableció la norma de vertimientos: la resolución 0631. En esta resolución se fijaron los valores máximos permisibles para el control de la carga contaminante de las sustancias de interés para el desarrollo del proyecto en las que se encuentra Cadmio (0.1 mg/L), Zinc (3.0 mg/L) y Cobre (1.0 mg/L) ^[7].

4.1. AGUAS RESIDUALES

Las aguas residuales son las aguas usadas y los sólidos que por uno u otro medio se introducen en las cloacas y son transportados mediante el sistema de alcantarillado.

Se considera como aguas residuales domesticas (ARD) los líquidos provenientes de las viviendas o residencias, edificios comerciales e institucionales. Se denominan aguas residuales municipales los residuos líquidos transportados por el alcantarillado de una ciudad o población y tratados en una planta de tratamiento municipal, y se llaman aguas residuales industriales las aguas residuales provenientes de las descargas de industria de manufactura.

Existen características típicas de aguas residuales, las cuales son muy importantes como referencia de los parámetros de importancia por analizar y de su magnitud, hay que recordar que cada agua residual es única en sus características y que, en lo posible, los parámetros de polución deben evaluarse en el laboratorio para cada agua residual específica ^[8]

4.2. DETERMINACION DE METALES POR E.A.A

Como su nombre lo indica, la espectroscopia de absorción atómica EAA es una técnica donde por un fenómeno fisicoquímico, los átomos de los metales absorben energía proveniente de la radiación ejercida por una lámpara fabricada con un cátodo del metal de interés, aplicando una longitud de onda específica para la absorción de cada metal en cuestión, siendo la cantidad total de absorción dependiente del número de átomos libres presentes y del grado en que los átomos libres puedan absorber la radiación. ^[9]

En la determinación cuantitativa de metales, se hace necesario lograr una disolución homogénea de los metales presentes en la matriz de estudio, como lo es en este caso matrices de residuos sólidos y líquidos, para posteriormente utilizar un método analítico de EAA adecuado para su determinación. La disolución total de metales se puede lograr aplicando un tratamiento a la matriz en medio ácido y calor o digestión. ^[10] Los ácidos comúnmente usados en dicho proceso son el HNO₃, HCl, y el H₂SO₄, su mezcla o su uso con agentes oxidantes neutros como el peróxido de hidrogeno H₂O₂, persulfato de potasio K₂S₂O₈ y el permanganato de potasio KMnO₄, produce una oxidación y degradación total de la materia orgánica presente en las

matrices sólidas y coloides presentes en las matrices líquidas. Las condiciones de digestión utilizadas para la degradación de las diversas matrices influyen en el grado de disolución de los metales presentes en la matriz. La digestión puede realizarse en un recipiente abierto o en un sistema a reflujo o en equipos de digestión que utilizan las ondas microondas, como fuente de energía para calentar la mezcla de ácidos y la muestra, dentro de un recipiente cerrado. Esta metodología permite lograr una digestión más eficiente de las muestras gracias a la combinación de presión alta y temperatura alta ^[11].

4.2.1. La espectroscopia de absorción atómica por llama directa (EAA-LI)

Es una técnica analítica que permite la detección y la cuantificación de metales en solución, haciendo de esta técnica la indicada para determinar elementos alcalinos, alcalinotérreos y metales pesados como el plomo (Pb) y el Bario (Ba) presentes en cualquier tipo de muestra, la cual sea posible transformar a una matriz con los metales disponibles en solución, es decir estén en forma iónica. ^[9] Los átomos de los metales son atomizados por la llama, los cuales en forma libre son capaces de absorber los haces de luz emitidos por la lámpara a determinada longitud de onda y así poder cuantificar la concentración en la muestra

4.2.2. Interferencias

En los métodos de absorción atómica se presentan dos tipos de interferencias. Las interferencias químicas que se producen como consecuencia de diversos procesos químicos que ocurren durante la atomización y que alteran las características de absorción del analito, y las interferencias espectrales que se producen cuando la absorción de una especie interferente se solapa o aparece muy próxima a la absorción del analito, de modo que su resolución por el monocromador resulta imposible

Interferencias químicas. En las interferencias químicas sus efectos se pueden reducir con frecuencia mediante una elección adecuada de las condiciones de operación.

Formación de compuestos poco volátiles. Los aniones oxigenados, los fosfatos y los sulfatos producen compuesto de baja volatilidad con el analito los cuales afectan la velocidad de atomización; lo que origina resultados menores que los esperados. Estas interferencias pueden atenuarse aumentando la temperatura y/o

empleando cationes que reaccionan con el interferente impidiendo su interacción con el analito.

Interferencia por ionización. Este tipo de interferencia ocurre cuando la temperatura de la flama es muy alta y el elemento pierde fácilmente uno o más de sus electrones más exteriores, esto ocurre en elementos de bajos potenciales de ionización, alcalinos térreos y lantánidos.

Equilibrio de disociación. En el ambiente gaseoso, caliente, de una llama o un horno, numerosas reacciones de disociación y asociación que conducen a la conversión de constituyentes metálicos en estado elemental. Las bandas moleculares surgen de la presencia de óxidos metálicos o hidróxidos en la llama, afectando la emisión y absorción de la llama.

Interferencias espectrales. En la EAA se hace incidir radiación de longitud de onda que corresponde exactamente a la longitud de onda requerida para efectuar una transición específica en los átomos de la especie absorbente. Aunque existe la posibilidad de que una especie atómica que no sea de nuestro interés absorba radiación incidente, causando superposición de líneas. Las interferencias espectrales también se producen por la presencia de producto de combustión, que posee bandas de absorción anchas, o de producto de forma de partículas, que dispersan la radiación. Disminuyendo el potencial de haz transmitido dando lugar a errores positivos.

4.3. NORMATIVIDAD

Para controlar las descargas en los efluentes en Colombia el ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, organismo encargado de vigilar y proteger el recurso hídrico, emitió la Resolución 0631 expedida en el 2015 por la cual se establecen los parámetros y los valores límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público, respondiendo a la nueva realidad urbana, industrial y ambiental del país. Esta permite el control de vertimientos de sustancias contaminantes que llegan a los cuerpos de agua vertidas por 73 actividades productivas presentes en ocho sectores económicos del país.

El control se realiza a partir de la medición de la concentración de las sustancias descargadas a los cuerpos de agua y que afectan la calidad del agua. Las autoridades ambientales son las responsables de hacer un seguimiento y control al cumplimiento de esta resolución a través de permisos legales. Es de carácter obligatorio para todas aquellas personas jurídicas o naturales que desarrollen

actividades industriales, comerciales o de servicios y que en el desarrollo de las mismas generen aguas residuales, que serán vertidas en cuerpos de agua superficial o al alcantarillado.

Norma Internacional ISO/IEC 17025:2005

La norma ISO/IEC 17025 es una normativa internacional desarrollada por ISO (International Organization for Standardization) el 26 de octubre de 2005, en la que se establecen los requisitos generales para la competencia de laboratorios en la realización de ensayos, muestreos y/o calibraciones ^[15]

El objetivo principal de ésta es garantizar la competencia técnica y la fiabilidad de los resultados analíticos. La norma contiene requisitos de gestión y técnicos que inciden sobre la mejora de la calidad del trabajo realizado en los laboratorios favoreciendo la creación de un conocimiento colectivo, que facilita la integración del personal, y un profundo conocimiento interno de la organización, proporcionando flexibilidad en la adaptación a necesidades y cambios del entorno y permite detectar problemas para su resolución anticipada. ^[16]

4.4. ACREDITACIÓN

La acreditación es un servicio de atestación y declaración de tercera parte sobre la competencia técnica y la imparcialidad de los organismos que evalúan la conformidad de productos y procesos con normas técnicas de mercado o con requisitos técnicos de exigencia legal. ^[17]

En general cualquier actividad que tenga por objeto evaluar si un producto, servicio, sistema, instalación, etc. es conforme con ciertos requisitos puede estar sujeta a acreditación. Dichos requisitos pueden estar establecidos por ley y tener por tanto carácter reglamentario o estar establecido en normas, especificaciones u otros documentos de carácter voluntario.

4.5. ESTANDARIZACION

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 la logística empleada para su desarrollo, puede requerir de un tiempo más o menos considerable (en algunos casos puede superar los seis meses).

Mediante la aplicación del protocolo de estandarización se desea obtener en forma experimental y para las condiciones particulares del Laboratorio, los valores de los parámetros estadísticos que servirán como criterios de confianza del método analítico, los cuales son exactitud, precisión, linealidad, límite de detección, sensibilidad, y porcentaje de recuperación.

Se espera además obtener información o complementar la existente en lo relacionado con: Interferencias, limitaciones, tiempo de vida útil de la muestra para el analito de interés, tiempo de análisis y costo del análisis. ^[18]

4.6. FIGURAS IMPORTANTES DE MERITOS ANALITICOS

A medida que se desarrolla el protocolo de estandarización se obtiene evidencia numérica que debe ser evaluada estadísticamente mediante la aplicación de parámetros de mérito analítico que permitirán demostrar la aplicabilidad exitosa de la metodología usada.

4.6.1. Exactitud.

Es la proximidad entre el resultado de una medición y la media de un conjunto de datos y se expresa en términos de porcentaje de error o porcentaje de recuperación. Se puede medir a partir de la comparación de los valores obtenidos por medio de las metodologías disponibles, respecto a los emitidos por la empresa proveedora de las soluciones, o por medio del porcentaje de recuperación o de error (Ecuación 1).

$$\% \text{ Recuperacion} = \frac{\text{resultado obtenido}}{\text{resultado esperado}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

4.6.2. Precisión

Es la medida del grado de la repetibilidad o correlación de los resultados obtenidos mediante un método analítico. Se puede medir por el grado de reproducibilidad (precisión intermedia) o de repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación. Los parámetros de calidad de la precisión son: *La desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV)*.

La desviación estándar, “S”, expresa la desviación de los valores con respecto a al valor medio (Ecuación 2). Por otra parte, el coeficiente de variación “CV”, proporciona una interpretación porcentual del grado de variabilidad de la desviación estándar (Ecuación 3).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde \bar{X} , es el valor medio obtenido de una serie de datos; X_i es el valor individual obtenido para cada una de las diferentes determinaciones y n es el número de determinaciones o repeticiones.

4.6.3. Límite de detección (LOD).

El límite de detección se define como la menor concentración de un elemento en la solución que se puede detectar con un 95% de certeza, por lo tanto, la concentración que produce una desviación igual a 3 veces la desviación estándar de un conjunto de lecturas se puede definir como el límite de detección. Históricamente se ha definido como la concentración de un analito que produce la desviación de la línea base de un registrador gráfico que es igual al doble del pico de la línea base. Este parámetro es una cifra teórica y no debería tratar de medirse rutinariamente, lo común es medir mínimo 10 veces por encima de dicho límite, por ejemplo, el límite de detección de Pb es de 0,01 ppm por absorción atómica de llama, el valor confiable que se podría medir de dicho metal es de 0,1 ppm. También es definido como se muestra en la Ecuación 4

$$LOD = \frac{3 S_b}{m_{promedio}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde S_b es la desviación estándar promedio de los interceptos de las curvas realizadas y $m_{promedio}$ es el promedio de las pendientes de las curvas de calibración realizadas.

4.6.4. Límite de cuantificación (LOQ)

Es la menor concentración de un analito o sustancia en una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones en que se lleva a cabo el método. Se ha sugerido el valor calculado mediante la ecuación 5.

$$LOQ = \frac{10 S_b}{m_{promedio}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde S_b es la desviación estándar promedio de los interceptos de las curvas realizadas y $m_{promedio}$ es el promedio de las pendientes de las curvas de calibración realizadas.

4.6.5. Límite de detección instrumental

Es la concentración de analito que produce una señal superior a 5 veces la relación señal/ruido del instrumento. Se ha establecido en 1,645 veces el valor de la desviación estándar de los análisis de los blancos como se indica en la ecuación 6

$$LDI = 1,645x S_{blanco} \quad \text{Ecuación 6}$$

4.6.6. Linealidad

Es el grado de proporcionalidad directa entre un par de variables de un método analítico. Generalmente se reporta como la variación de la pendiente de la línea de regresión.

Para medirse se realiza una “curva de calibración” con la cual se establece la proporcionalidad existente entre la concentración y la respuesta del método analítico, calculada por el método de ajuste mínimos cuadrados según la (ecuación 7).

$$y = mx + b \quad \text{Ecuación 7}$$

Dónde: x , es la concentración del analito; m es la pendiente de la recta; y es la respuesta del método y b es el intercepto con el eje y . Los términos m y b , pueden ser calculados a través de las siguientes ecuaciones (Ecuaciones 8 y 9)

$$m = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde n es el número de soluciones patrón. Se calcula además el coeficiente de regresión (r^2) el cual refleja el grado de ajuste de los puntos a la recta, y el coeficiente de correlación o proporcionalidad (r), que demuestra la relación entre las variables.

4.6.7. Sensibilidad.

Es la medida de la capacidad del instrumento para detectar pequeñas variaciones en la concentración de un analito, según la IUPAC, la sensibilidad se define como la pendiente de la curva de calibrado, a mayor pendiente mayor sensibilidad.

4.6.8. Repetibilidad.

Resultados obtenidos bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, con los mismos equipos y con la misma muestra homogénea.

4.6.9. Precisión Intermedia.

Resultados obtenidos dentro del laboratorio por el mismo analista, con los mismos equipos, en un intervalo largo de tiempo (días distintos) y con la misma muestra homogénea.

4.6.10. Incertidumbre.

Parámetro asociado al resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando. De forma general, la palabra incertidumbre está relacionada con el concepto general de duda. La palabra incertidumbre, sin adjetivos, se refiere tanto al parámetro asociado con la definición anterior, como al conocimiento limitado de un valor particular. La Incertidumbre de medida no implica duda sobre la validez de una medida; al contrario, el conocimiento de la incertidumbre implica un aumento de la confianza en la validez del resultado de una medición. ^[21] ^[22] a continuación se definen los tipos de incertidumbre a medir:

- **Incertidumbre Tipo A:** Componentes que pueden ser evaluados a partir de distribuciones estadísticas de series de resultados que pueden caracterizarse por desviación estándar
- **Incertidumbre Tipo B:** Pueden caracterizarse también por desviaciones estándar, pero se evalúan a partir de distribuciones de probabilidades supuestas, basadas en la experiencia o en otro tipo de información.
- **Trazabilidad:** Propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón, por la cual pueda ser relacionado a referencias determinadas, generalmente patrones nacionales o internacionales, por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones, teniendo todas incertidumbres determinadas.
- **Incertidumbre Estándar:** Incertidumbre del resultado de una medición expresada como una desviación estándar.
- **Incertidumbre Estándar Combinada:** Es la incertidumbre estándar del resultado de una medición, cuando el resultado se obtiene a partir de los valores de algunas otras magnitudes, igual a la raíz cuadrada positiva de la suma términos; varianzas y covarianzas de estas otras magnitudes ponderadas.
- **Incertidumbre expandida:** Cantidad que define un intervalo alrededor de una medición del que se puede esperar que abarque una fracción grande de la distribución de valores que razonablemente pudieran ser atribuidos al mensurando.

Pasos a seguir en el proceso de evaluación de la incertidumbre.

Se debe expresar matemáticamente la relación entre la magnitud Y y magnitudes de entrada Xi. como se muestra en la ecuación 10.

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n) \quad \text{Ecuación 10}$$

Determinar el valor (Xi) de cada una de las magnitudes de entrada (Xi) mencionados anteriormente.

Evaluar la incertidumbre estándar U(Xi) con que fue determinado cada valor Xi e identificar fuentes de incertidumbre.

Existen dos (2) tipos de incertidumbre estándar:

Evaluación de la incertidumbre estándar tipo A.

Se denomina “incertidumbre estándar” (Ui), a la desviación estándar experimental del valor medio de una serie de mediciones S(Xi). Se expresa por medio de la ecuación 11 y 12

$$U_i = \frac{S^*(X_i)}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde n = número de mediciones efectuados.

$$U_{A, X_i} = \frac{s^*(X_i)}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \frac{\sum_{j=1}^n X_{ij} - X_{ij}}{\sqrt{n}}} \quad \text{Ecuación 12}$$

Dónde:

Xij = Es el valor de la magnitud Xi en la medición j.

\bar{X}_{ij} = es el valor medio de los valores obtenidos para la magnitud Xi
j = 1 hasta n

Evaluación de la incertidumbre tipo B.

Cuando la incertidumbre no se obtiene a partir de valores obtenidos en una serie de mediciones si no de informaciones preexistentes de diversas índoles, decimos entonces que se trata de una incertidumbre tipo B.

Caso 1:

La incertidumbre asciende a la resolución dada por el fabricante de un instrumento de medida y se expresa mediante la ecuación 13

$$U_{B.RESOLUCION} = \frac{\text{Resolución}}{2 * \sqrt{3}} \quad \text{Ecuación 13}$$

Caso 2:

La especificación de incertidumbre de un elemento de medición se indica respecto de un nivel de confianza. En este caso la incertidumbre expandida se divide por el factor de cobertura especificado en el certificado de calibración (ecuación 14).

NC = m % γ_{ef} (grados de libertad) = n \therefore k = Factor de Cobertura

$$u_B = \frac{u_E}{k} \text{ Factor t student.} \quad \text{Ecuación 14}$$

Caso 3:

La especificación de incertidumbre no es explícita si no que se da un límite máximo para el error del instrumento (+/- a) (ecuación 15)

a: error asociado al instrumento.

$$u_B = \frac{a}{\sqrt{3}}. \quad \text{Ecuación 15}$$

Se debe evaluar las covarianzas asociadas a todas las magnitudes que estén correlacionadas, calcular el valor de medición "y" de la magnitud "Y", utilizando las estimaciones X_i , determinar la incertidumbre estándar compuesta $u_{c(y)}$ a partir de las incertidumbres estándar y de las covarianzas asociadas a las magnitudes de entrada, hallar el número efectivo de grados de libertad γ_{ef} y determinar mediante la fórmula de WELCH-SATTERTH WAITE:

$$\gamma_{Ef} = \frac{u^4_{c(y)}}{\sum_{i=1}^n \frac{u_{i(y)}}{\gamma_i}}$$

Ecuación 17

Dónde:

γ_i = Numero efectivo de grados de libertad de cada contribución $u_{i(y)}$, cuyo valor se obtiene aplicando las siguientes reglas:

γ_i : $n - 1$ Para evaluaciones tipo A

$\gamma_i = \infty$ Cuando se apliquen distribuciones rectangulares.

$\gamma_i = 50$ si se deduce de una distribución normal.

Se debe entonces multiplicar la incertidumbre estándar compuesta $u_{c(y)}$ por el factor k de cobertura correspondiente al número efectivo de grados de libertad (γ_{ef}) y de nivel de confianza deseado.

4.7. ANALISIS ESTADISTICO

Se realiza mediante el paquete estadístico SPSS versión 24, el cual facilita el análisis estadístico de los datos, como su ilustración gráfica. Entre las pruebas más utilizadas aplicadas para el análisis de datos están:

4.7.1. Pruebas De Normalidad

La distribución normal es, probablemente, la distribución teórica más importante en estadística y sirve como punto de referencia para describir cómo se distribuyen muchos de los datos de los análisis que realizamos. Se utilizan dos pruebas, la de Shapiro-Wilk para un tamaño de muestra menor o igual a 50, y la prueba de Kolmogorov-Smirnoff que se utiliza para un mayor número de datos, mayores a 50. Ambas pruebas permiten contrastar la hipótesis nula de que los datos de los resultados de los análisis proceden de poblaciones normales. Rechazaremos la hipótesis de normalidad cuando el nivel crítico o significancia (Sig.) sea menor que el nivel de significación establecido (generalmente 0,05). Cuando los valores presentan una distribución normal, se acepta la hipótesis nula y se aplican pruebas paramétricas. Cuando ocurre lo contrario, se aplican pruebas no paramétricas.

4.7.2. Pruebas Paramétricas

Son pruebas de hipótesis estadísticas que asumen cierto comportamiento de muestras obtenidas aleatoriamente, distribución normal de las observaciones y donde existe un parámetro de interés que buscamos estimar. Son un tipo de pruebas de significación estadística que cuantifican la asociación o independencia entre una variable cuantitativa y una categórica. Las pruebas paramétricas exigen ciertos requisitos previos para su aplicación: la distribución normal de la variable cuantitativa en los grupos que se comparan y la homogeneidad de varianzas en las poblaciones de las que proceden los grupos. A continuación, se definen las pruebas paramétricas más importantes:

Análisis de la varianza (ANOVA)

El análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de K 'tratamientos' o 'factores' con respecto a la variable dependiente o de interés, la hipótesis es evaluada de la siguiente forma: Si el nivel crítico asociado al estadístico F es menor que 0,05, se rechaza la hipótesis de igualdad de medias y se concluye que no todas las medias poblacionales comparadas son iguales. En caso contrario, no se puede rechazar la hipótesis de igualdad y no se puede afirmar que los grupos comparados difieran en sus promedios poblacionales.

En otras palabras, nos ayuda a comparar varios grupos en una variable cuantitativa. A la variable categórica (nominal u ordinal) que define los grupos que deseamos comparar la llamamos independiente o factor. A la variable cuantitativa (de intervalo o razón) en la que deseamos comparar los grupos la llamamos dependiente

Prueba de Tukey – Prueba de Duncan:

Son test de comparaciones múltiples. Permiten comparar las medias de los t niveles de un factor después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA. Todos los test de comparaciones múltiples son test que tratan de perfilar, tratan de especificar, tratan de concretar una hipótesis alternativa genérica como la de cualquiera de los test ANOVA.

Prueba T:

Esta Prueba permite contrastar hipótesis con base a una media poblacional, ajustándose a un modelo de distribución de probabilidad t de student cuando la población muestreada es normal. La realización de esta prueba con el paquete estadístico SPSS permite contrastar dos muestras independientes o relacionadas según sea el caso.

Coefficiente de Correlación de Pearson (r):

Es una prueba paramétrica que mide el grado de asociación lineal entre dos variables cuantitativas, tomando valores entre -1 y +1. Los valores próximos a +1 indican una fuerte asociación lineal positiva; los valores próximos a -1 indican una fuerte asociación lineal negativa; valores próximos a 0 indican que no existe asociación lineal entre las variables

4.7.3. Pruebas no paramétricas

Una prueba no paramétrica es una prueba de hipótesis que no requiere que la distribución de la población se caracterice en función de determinados parámetros. Por ejemplo, numerosas hipótesis se basan en el supuesto de que la población sigue una distribución normal con los parámetros μ y σ . Las pruebas no paramétricas no tienen este supuesto, de modo que son útiles cuando sus datos sean firmemente no normales y resistentes a transformaciones.

Sin embargo, las pruebas no paramétricas no están completamente exentas de supuestos sobre los datos. Por ejemplo, las pruebas no paramétricas requieren que los datos sean una muestra aleatoria independiente. Se aplican a una gran variedad de situaciones, ya que no se requiere que cumplan ciertas condiciones como lo es el de la distribución normal de los datos como es el caso de los métodos paramétricos. Los resultados estadísticos se obtienen de procedimientos de ordenación o en otros casos de recuento, donde el parámetro de centralización es la mediana que se define como un punto donde el valor de X está el 50% de las veces por debajo y el 50% por encima. Como pruebas no paramétricas se tiene:

Prueba de Kruskal - Wallis

Es un método para probar si un grupo de datos proviene de la misma población. Esta prueba es paralela al ANOVA con los datos reemplazados por categorías. Para determinar las diferencias significativas se aplica la prueba U de Mann-Whitney.

Prueba de U Mann-Whitney

Es una excelente alternativa a la prueba t sobre diferencia de medias cuándo no se cumplen los supuestos en los que se basa la prueba t (normalidad y homocedasticidad) y cuando no es apropiado utilizar la prueba t porque el nivel de medida de los datos es ordinal.

Coefficiente de Correlación de Spearman (Rho)

Es una prueba que mide la asociación o interdependencia entre dos variables discretas medidas, al menos una de ellas, en escala ordinal. Los valores próximos a +1 indican una correlación fuerte y positiva. Los valores próximos a -1 indican una correlación fuerte y negativa. Los valores próximos a 0 indican que no hay correlación lineal.

4.7.4. Análisis de regresión lineal

En estadística, la regresión lineal o ajuste lineal es un modelo matemático usado para aproximar la relación de dependencia entre una variable dependiente Y , las variables independientes X_i y un término aleatorio ε . El procedimiento implica, básicamente, obtener la ecuación mínimo-cuadrática que mejor expresa la relación entre la variable dependiente y la variable independiente y estimar mediante el coeficiente de determinación la calidad de la ecuación de regresión obtenida

5. METODOLOGIA

5.1. PREVALIDACION

Siguiendo los procesos establecidos e incluidos dentro del sistema de gestión de la calidad del laboratorio de análisis de aguas Construcsuelos Suministros LTDA, se dio inicio a la etapa de pre-validación como se indica a continuación

- Se seleccionó el método analítico y los procedimientos necesarios para la determinación de Cadmio, Zinc y Cobre en agua residual, de acuerdo a los materiales y reactivos disponibles en el laboratorio.
- Se realizó un inventario de equipos, reactivos necesarios para el proceso de estandarización y validación (identificación, cantidad, calidad, pureza), del material de vidrio y demás, señalando las cantidades necesarias para lograr un procedimiento exitoso.
- Se definieron los intervalos de trabajo para la determinación de cada metal teniendo en cuenta protocolos, normatividades, ensayos preliminares realizados en el laboratorio y rangos de concentración esperados en muestras de agua residual
- Se verificó el correcto funcionamiento de los equipos (espectrofotómetro de absorción atómica, neveras, campana extractora, purificador, planchas de calentamiento, material de medición de volúmenes) y elementos de laboratorio (material de vidrio) mediante ensayos preliminares de acuerdo al protocolo de verificación y calibración para cada uno, en otros casos se emplearon los certificados de análisis y calibración suministrados por los fabricantes.
- Se optimizaron las condiciones y parámetros instrumentales, incluyendo digestiones y curvas de calibración.
- Se generaron los formatos para consignar la información hallada a medida que avanza el proceso de implementación, siendo congruentes con el proceso de gestión de calidad (PGC) de elaboración y control de documentos del laboratorio Construcsuelos Suministros LTDA.
- Se describió un procedimiento detallado para la digestión de muestras, preparación de soluciones, estándares, muestras y análisis de muestras

5.2. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Se usó un equipo de espectroscopia absorción atómica marca Shimadzu AA 7000 de doble haz y lámparas de cátodo hueco de cada metal a analizar, una cabina de extracción de vapores, un digestor con Scrubber (limpieza de vapores ácidos) y una termocupla para control de temperatura marca FLUKE.

Se usaron estándares primarios de metales de 1000 mg/L trazable, ácido nítrico al 67% para análisis marca Merck, agua desionizada libre de metales con una conductividad menor a 1.0 $\mu\text{S}/\text{cm}$, acetileno grado 2.5, aire limpio y seco, óxido de lantano y carbonato de calcio para análisis.

Para la medición de volúmenes y aforos se trabajó con material volumétrico clase A. En las digestiones se usó recipientes de vidrio borosilicato 3.3, transferpipetas marca Brand de 100- 1000 y 5000 μL , y recipientes de polipropileno de alta densidad para almacenamiento y muestreo.

El software de captura de datos y tratamiento estadístico fue WizAArd y SPSS (v24) respectivamente

5.3. ESTANDARIZACIÓN

La estandarización de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se estandariza un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos y obtener evidencia documentada del procedimiento desarrollado, basándose en el sistema de gestión de calidad implementado.

En este sentido es importante que para el proceso se asigne a un responsable de realizar dicha tarea, de manera que se efectuó en forma metódica, ordenada, trazable y confiable.

Es importante tener la claridad antes de iniciar, sobre los requerimientos del método para establecer el alcance de la Estandarización. Es esencial entonces conocer el método y su aplicabilidad, es decir, el analito, su concentración y la matriz en las cuales se desea utilizar.

5.3.1. Lavado del material usado en la estandarización

Se debe garantizar que todo el material a utilizar debe estar completamente limpio y evitar introducir metales contaminantes desde recipientes, agua destilada, o filtros de membrana. Algunas tapas o revestimientos plásticos contaminan, por ejemplo, el Zinc ha sido encontrado en los tapones de baquelita, así como también en productos de caucho y/o de plástico y el Cadmio ha sido encontrado en puntas plásticas para transferpipetas.

El material de vidrio se lavó en una solución de jabón neutro Extran Merck, luego se enjuagó con agua de grifo y en seguida con abundante agua libre de metales. Posteriormente se dejó en una solución de ácido nítrico al 10% durante 4 horas para luego lavar y purgar con abundante agua desionizada libre de metales, de tal forma que el pH del agua de lavado final sea igual al pH del agua desionizada.

5.3.2. Metodología de calibración del material usado en la estandarización

Se calibró y verifico el material volumétrico de acuerdo al procedimiento de aseguramiento de la calidad (PAC) existente en Construcsuelos suministros LTDA.

Se revisaron los certificados de calibración emitidos por el proveedor. Se verificó la calibración de dos transferpipetas (una de 100 – 1000 μL y otra de 500 – 5000 μL), y una balanza analítica de 4 cifras decimales.

5.3.3. Implementación de las metodologías

➤ Preparación de las curvas de calibrado:

A partir de soluciones trazables marca Merck de 1000 ± 0.002 mg/L se prepararon estándares con el propósito de obtener curvas de calibración en un rango lineal para la determinación de Cadmio, Cobre y Zinc, graficando absorbancia en función de concentración y determinando el respectivo coeficiente de correlación

➤ Verificación del Sistema Instrumental

Se prepararon curvas de calibración en agua desionizada libre de metales acidulada con ácido nítrico, las cuales fueron sometidas al proceso de digestión para el análisis de muestras. Se evaluó la linealidad instrumental, precisión en términos de precisión intermedia y límites críticos. Para la evaluación de los resultados, se aplicó un tratamiento estadístico con la ayuda del software estadístico SPSS (ed 24).

➤ **Linealidad Instrumental**

Para determinar la linealidad instrumental se evaluaron 5 niveles de concentración durante 7 días diferentes. Se prepararon 7 curvas de calibración durante los 7 días, una curva de calibración por día, sometidas al método descrito en la metodología.

Los resultados de las pruebas para la evaluación de linealidad, permiten comprobar estadísticamente la linealidad instrumental en el rango utilizado.

➤ **Precisión instrumental**

Evaluada bajo condiciones de repetibilidad (el mismo día) y de precisión intermedia (días diferentes). En condiciones de repetibilidad se prepararon 3 curvas de calibración con 5 niveles de concentración, las cuales se analizaron el mismo día bajo las mismas condiciones. Para el ensayo de precisión intermedia se prepararon 7 curvas de calibración durante 7 días diferentes, una curva de calibración por día, para cada metal. Se calculó la desviación relativa estándar o coeficiente de variación por nivel de concentración bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.

➤ **Limites críticos**

Se prepararon 3 curvas de calibración las cuales se analizaron el mismo día, bajo las mismas condiciones. Seguidamente, se calculó mediante el método de mínimos cuadrados las ecuaciones de las líneas de tendencia en cada curva, obteniendo de esta forma los interceptos y las pendientes para cada una de las tres curvas de calibración, con estos datos se determinó la desviación estándar de los interceptos ($S_{\text{interceptos}}$) y el promedio de las pendientes (m_{prom}). Se aplicó la ecuación 5 para establecer teóricamente el valor para el límite de cuantificación (LOQ)

5.3.4. Implementación de la metodología en muestras

a. Toma de Muestras

De acuerdo al procedimiento de estandarización y validación de métodos analíticos y el procedimiento de aseguramiento de la calidad en Construcsuelos Suministros Ltda. se utilizó muestras de aguas residuales. El muestreo fue de tipo puntual y se realizó en el vertimiento **Puente Santander Norte**, ubicado en el departamento del Huila, Municipio de Neiva, las cuales fueron tomadas por el personal técnico de campo calificado y capacitado para dicha labor. Las muestras fueron ingresadas al laboratorio junto con su cadena de custodia y codificación de acuerdo al plan de muestreo incluido en el sistema de gestión de la calidad de Construcsuelos Suministros LTDA

5.3.5. Preparación de las Muestras

a. Codificación

La codificación de las muestras para el desarrollo de la estandarización incluyendo blancos, testigos, muestras y patrones se realizó en base al procedimiento de aseguramiento de la calidad, los procedimientos de validación y elaboración de documentos y los instructivos técnicos de manejo de muestras del laboratorio basados en el método normalizado de referencia.

b. Preservación

Las muestras recolectadas fueron preservadas con la adición de 1.5 mL de Ácido nítrico concentrado (65%) hasta llevar a pH < 2, y almacenadas a 4 °C para prevenir cambios en el volumen.

5.3.5 Digestión de muestras según metodología 3030 E Standard Methods.

Se transfirió un volumen de 100 mL de muestra previamente homogenizada y preservada a un Erlenmeyer. En una cabina extractora de vapores se le adicionó al recipiente 5 mL de ácido nítrico concentrado, perlas de ebullición y se sometió a reflujo a aproximadamente 95 °C en una cabina de extracción.

La muestra se evaporó sin ebullición hasta tener un volumen cercano a 10 mL, lavando las paredes del recipiente con agua desionizada libre de metales en el transcurso de la digestión. Se realizó adición de ácido nítrico 1:1 para digerir las sales o material particulado remanente. Una vez terminado el proceso se transfirió a balones aforados en forma cuantitativa filtrando a través de papel filtro cualitativo.

5.3.6. Fortificación de muestras

Se realizó la fortificación a muestras de agua residual una vez realizado el procedimiento de digestión (post), siguiendo las metodologías 3030 E de Standard Methods.

Una vez determinada la cantidad de metales totales presentes en las muestras, se hicieron adiciones o dopajes de los metales a determinar en tres niveles de concentración buscando evaluar todo el rango de trabajo de la siguiente manera.

Se realiza dilución, si la concentración determinada sobrepasa el límite superior del rango de la curva lineal, hasta alcanzar concentraciones cercanas al nivel 1 de la curva. Se lleva a cabo adiciones o fortificaciones de concentración conocida a las

muestras naturales para evaluar el error y la recuperación, así como el efecto matriz en la cuantificación.

Tabla 1. Codificación de muestras de agua residual

MUESTRA	DESCRIPCIÓN	CODIFICACIÓN
Metales Totales	Muestras natural metal total	M1T
	Muestra adicionada con nivel rango bajo	M1Tb
	Muestra adicionada con nivel rango medio	M1Tm
	Muestra adicionada con nivel rango alto	M1Ta

5.3.7. Análisis de muestras

- a. Inicialmente se prepararon una serie de estándares con los que se construye la curva de calibración. Todo el material se lavó según lo indicado en el numeral 5.3.1
- b. Se aplicó el procedimiento de digestión correspondiente a las muestras según la metodología propuesta en el numeral 3030 E de Standard Methods, y lectura por espectroscopia de absorción atómica método 3111 B Llama directa aire-acetileno, para la determinación de metales totales.
- c. Se ajustaron y verificaron las condiciones pre-programadas instrumentalmente: longitud de onda (line search), ancho de rendija (SLIT), altura del quemador, flujos, tiempos de pre-spray, integración y respuesta.
- d. Se consideró como blanco de reactivos agua desionizada acidulada al 2% con ácido nítrico. El blanco de metales totales o también llamado blanco de preparación o de método, corresponde al extracto del procedimiento de digestión aplicado en la determinación de metales totales. Con el blanco de reactivos se ajusta la absorbancia a cero en la respuesta del equipo.

- e. Posteriormente se realizó la lectura de estándares de la curva de calibración en orden ascendente y por triplicado. Los valores de absorbancia fueron registrados y almacenados por el software WizAArd.
- f. Una vez terminada la lectura de los patrones, se aspiró el blanco de reactivos y se ajustó la medición cero. Se procedió a leer las muestras digestadas según el procedimiento 5.3.7 y la lectura se realizó por triplicado. Si la absorbancia o concentración de alguna de las muestras ambientales estuvo por fuera del rango o intervalo de trabajo, se realizó la dilución apropiada y se realiza nuevamente la lectura.
- g. Se procedió a realizar una lectura del blanco de reactivos y de uno o más patrones de control cada 20 determinaciones consecutivas de acuerdo al plan de aseguramiento de la calidad del laboratorio
- h. La determinación de Cd, Cu y Zn se llevó a cabo por aspiración directa con llama Aire-Acetileno en el espectrofotómetro de absorción atómica siguiendo las instrucciones y condiciones de uso recomendadas por el manual del equipo.

5.3.8. Evaluación estadística de los resultados.

El objetivo principal de la estandarización en la implementación de metodologías es demostrar con evidencia estadística que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. Para realizar el análisis de los datos obtenidos en el ejercicio de validación se utilizó el software SPSS versión 24, con el cual se realizaron pruebas de normalidad para determinar si los resultados provienen de una población con distribución normal y aplicar pruebas paramétricas o no paramétricas, según corresponda.

Se analizó la linealidad instrumental, precisión en términos de precisión intermedia y límites críticos, para ello se aplicaron pruebas estadísticas como Shapiro-Wilk, y análisis de varianza (ANOVA). Se realizó la corrección en el contenido del metal obtenido para cada muestra teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación (%R) del método. Se determinó la precisión en términos del %C. V

6. RESULTADOS Y ANALISIS

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en la estandarización del método para la determinación de metales totales en muestras de agua residual doméstica y no doméstica provenientes de vertimientos principales como el *PUENTE SANTANDER NORTE* y comerciales del municipio de Neiva, mediante la espectroscopia de absorción atómica de llama aire acetileno. Se realizó un total de 7 ensayos en días diferentes, continuos o alternos con una diferencia de no más de 2 días, por triplicado. Se construyeron curvas de calibración en el rango de 0,05 a 0.5 mg/L de Cd, 0.1-1.0 mg/L de Zn y 0.1 – 2.0 mg/L de Cu, a partir de soluciones stock certificadas de 1000mg/L, teniendo como blanco de reactivos agua desionizada acidulada con HNO₃.

6.1. LINEALIDAD INSTRUMENTAL

Se evaluaron 5 niveles de concentración durante 7 días diferentes. Se preparó una curva de calibración por día, la cual se sometió al método descrito en la metodología. Los resultados se presentan en la tabla 2

Tabla 2 Resultados para la evaluación de la linealidad instrumental

Metal	Concentración (mg/L)	Absorbancia						
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Cd	0,05	0,0322	0,0318	0,0343	0,0315	0,0359	0,0348	0,0325
	0,1	0,0655	0,0615	0,0649	0,0654	0,0623	0,0637	0,0621
	0,2	0,1245	0,1225	0,1248	0,1266	0,1268	0,1254	0,1251
	0,3	0,1844	0,1822	0,1872	0,1872	0,1851	0,1837	0,1827
	0,5	0,2991	0,3001	0,3064	0,3064	0,3010	0,3005	0,3026
Cu	0,1	0,0228	0,0220	0,0222	0,0225	0,0228	0,0216	0,0229
	0,5	0,0894	0,0891	0,0899	0,0896	0,0899	0,0890	0,0895
	1,0	0,1629	0,1631	0,1636	0,1619	0,1620	0,1617	0,1632
	1,5	0,2315	0,2308	0,2312	0,2311	0,2317	0,2310	0,2312
	2,0	0,3232	0,3239	0,3235	0,3230	0,3233	0,3229	0,3234
Zn	0,1	0,1035	0,1064	0,0998	0,1018	0,1009	0,0963	0,1009
	0,2	0,1938	0,1905	0,1952	0,1849	0,1861	0,1836	0,1839
	0,4	0,3620	0,3543	0,3576	0,3508	0,3587	0,3508	0,3485
	0,6	0,5352	0,5122	0,5192	0,5157	0,5192	0,5144	0,5043
	0,8	0,6868	0,6741	0,6757	0,6658	0,6665	0,6719	0,6547

Se verificó mediante los estadísticos descriptivos, la normalidad del conjunto de datos teniendo como variables la concentración, la absorbancia y el día de ensayo. Los resultados para el test de Shapiro-Wilk, se muestra en la tabla 3 y 4.

Tabla 3 Prueba de normalidad de datos en función del día.

DÍA	Cd		Cu		Zn	
	Est*	Sig*	Est*	Sig*	Est*	Sig*
1	0.950	0.740	0.988	0.973	0.962	0.825
2	0.944	0.695	0.989	0.975	0.964	0.839
3	0.944	0.692	0.989	0.976	0.968	0.865
4	0.950	0.735	0.989	0.974	0.961	0.816
5	0.942	0.680	0.988	0.974	0.962	0.821
6	0.944	0.695	0.989	0.975	0.964	0.836
7	0.944	0.719	0.988	0.974	0.963	0.831

Tabla 4 Prueba de normalidad de datos en función de la concentración

NIVEL	Cd		Cu		Zn	
	Est*	Sig*	Est*	Sig*	Est*	Sig*
1	0.898	0.319	0.911	0.400	0.970	0.898
2	0.882	0.234	0.923	0.497	0.864	0.164
3	0.929	0.546	0.895	0.304	0.944	0.670
4	0.912	0.411	0.962	0.835	0.912	0.407
5	0.854	0.133	0.964	0.853	0.974	0.928

* Est: estadístico, Sig: significancia

Inicialmente se plantean dos hipótesis. La Hipótesis nula (Ho) “los datos obtenidos provienen de una población normalmente distribuida” y la Hipótesis alternativa (Ha) “Los datos obtenidos no provienen de una población normalmente distribuida”. Con base en el valor de significancia (sig.), se acepta o rechaza la Ho, de acuerdo a si este valor es mayor o igual o menor de 0,05 respectivamente. Si se rechaza la hipótesis nula, lógicamente se debe aceptar la alternativa en cada prueba.

Al evaluar los datos obtenidos en el test estadístico, se encontró una significancia mayor a 0.05, por lo que se acepta la hipótesis nula teniendo que los datos provienen de una población con distribución normal.

Se realizó la prueba de ANOVA, para determinar la existencia de diferencias significativas entre las medias de los valores de absorbancia de los diferentes niveles de concentración. Los resultados se muestran en la tabla 5

Tabla 5 ANOVA para absorbancia en función del día

Metal		Suma cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Cd	Entre grupos	0.000	6	0.000	0.001	1.000
	Dentro de grupos	0.320	28	0.011		
	Total	0.321	34			
Cu	Entre grupos	0.000	6	0.000	0.000	1.000
	Dentro de grupos	0.388	28	0.014		
	Total	0.388	34			
Zn	Entre grupos	0.001	6	0.000	0.003	1.000
	Dentro de grupos	1.523	28	0.054		
	Total	1.524	34			

Se encontró valores de significancia estadística mayores a 0.05, lo que indicó que no existe diferencia significativa en los valores de absorbancia de cada nivel de considerando los días de ensayo, ósea no presenta variación con el tiempo, estableciendo que la metodología aplicada es reproducible.

Tabla 6. ANOVA para Absorbancia en función del nivel de concentración

METAL		SUMA DE CUADRADOS	GL	MEDIA CUADRÁTICA	F	SIG.
Cd	Inter-grupos	0.320	4	0.080	19295.3	0.000
	Intra-grupos	0.000	30	0.000		
	Total	0.321	34			
Cu	Inter-grupos	0.388	4	0.097	43207.9	0.000
	Intra-grupos	0.000	30	0.000		
	Total	0.388	34			
Zn	Inter-grupos	1.522	4	0.381	7745.2	0.000
	Intra-grupos	0.001	30	0.000		
	Total	1.524	34			

De igual manera, al realizar el análisis de la varianza, pero esta vez en función del nivel de concentración (tabla 6), se concluye en base al valor de significancia estadística ($p < 0,05$), que las absorbancias difieren significativamente entre cada nivel de concentración. Se aplicó la prueba estadística de Tukey (post hoc) para determinar entre que niveles se presentó la diferencia.

Según los resultados de la tabla 7, se aprecia la existencia de cinco grupos en donde la absorbancia es significativamente diferente por cada nivel de concentración con una significancia $p > 0,05$, estableciendo una relación de tipo lineal entre estos dos factores en las curvas de calibración de cada metal analizado.

Tabla 7. Prueba de Tukey (post hoc) Absorbancia Vs Nivel de Concentración.

METAL	NIVEL DE CONCENTRACIÓN	N	SUBCONJUNTO PARA ALFA = 0,05				
			1	2	3	4	5
Cd	1	7	0.0332				
	2		0.0636				
	3		0.1251				
	4		0.1846				
	5		0.3023				
	sig	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
Cu	1	7	0.0224				
	2		0.0894				
	3		0.1626				
	4		0.2312				
	5		0.3233				
	sig	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
Zn	1	7	0.1013				
	2		0.1883				
	3		0.3547				
	4		0.5171				
	5		0.6707				
	sig	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	

La tendencia lineal se evaluó a través de un gráfico relacionando la absorbancia respecto a la concentración de cada uno de los metales, durante los 7 días, la gráfica obtenida se muestra en la Figuras 1, 2 y 3 donde se observó dicha tendencia lineal, por lo que se aplicó el método de mínimos cuadrados para hallar una ecuación lineal que relaciona la concentración del metal con la absorbancia.

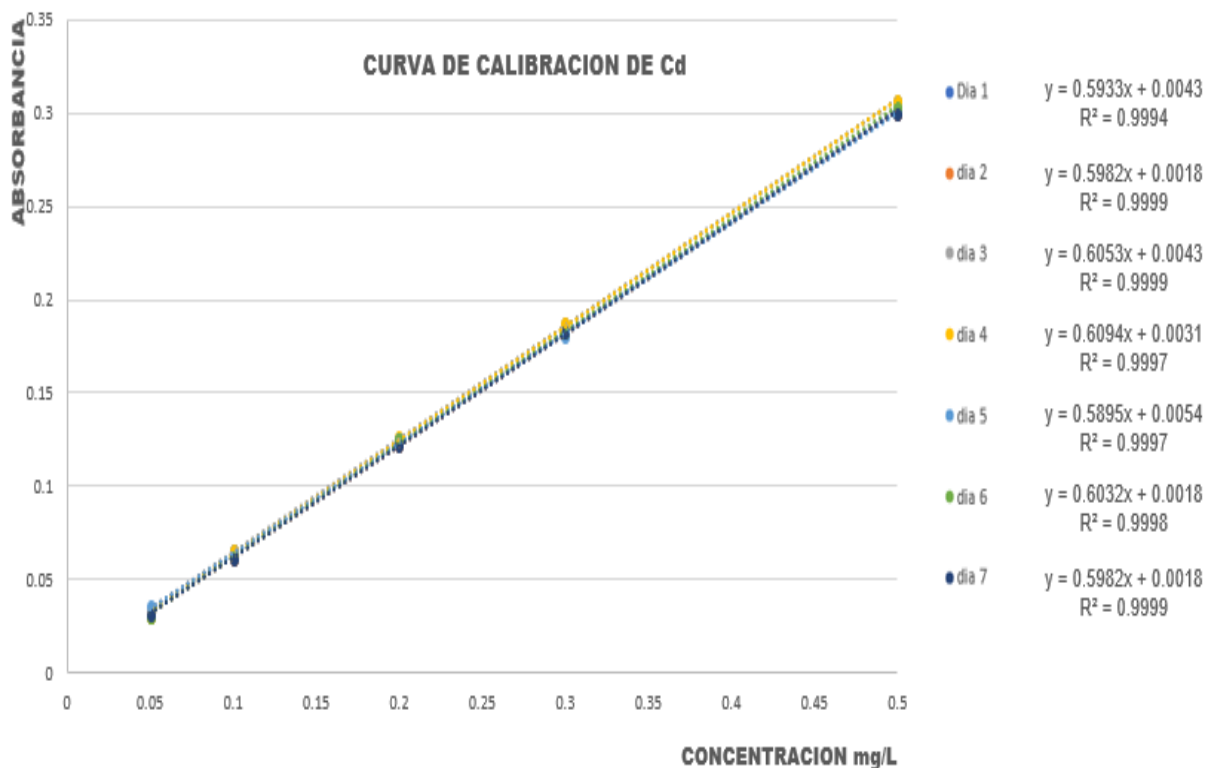


Figura 1. Curvas de calibración de Cadmio en la determinación de linealidad instrumental en absorción atómica llama aire acetileno durante los 7 días de ensayos.

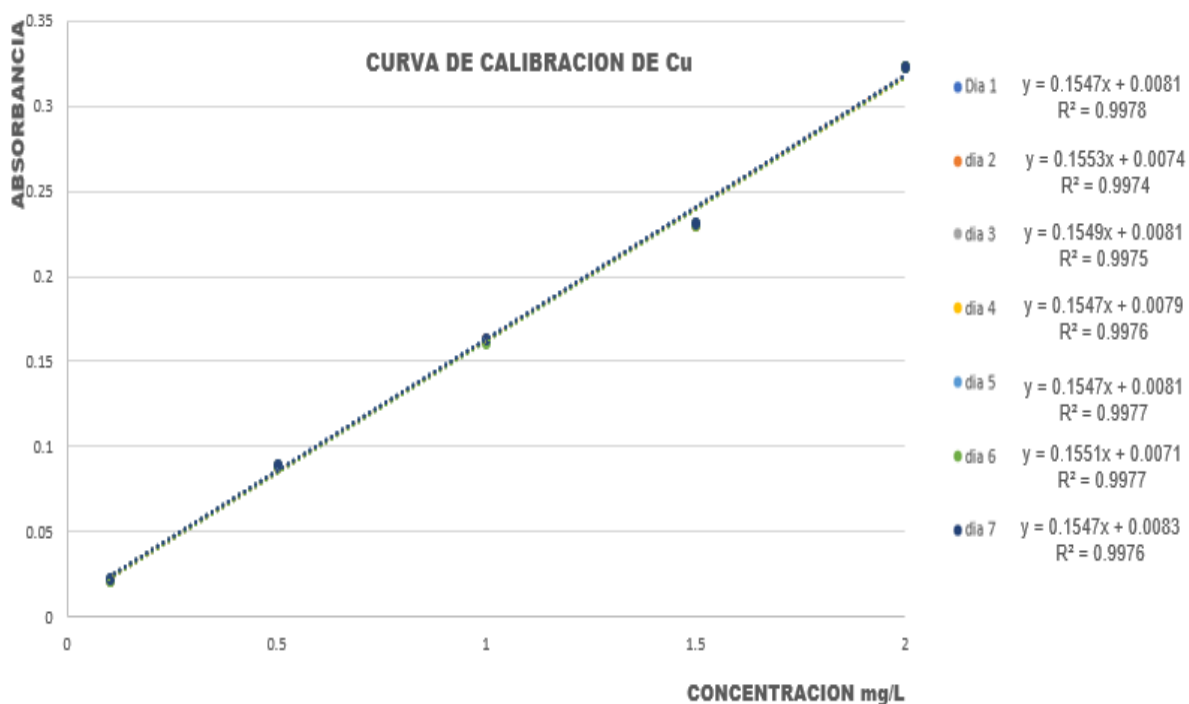


Figura 2. Curvas de calibración de Cobre en la determinación de linealidad instrumental en absorción atómica llama aire acetileno durante los 7 días de ensayo

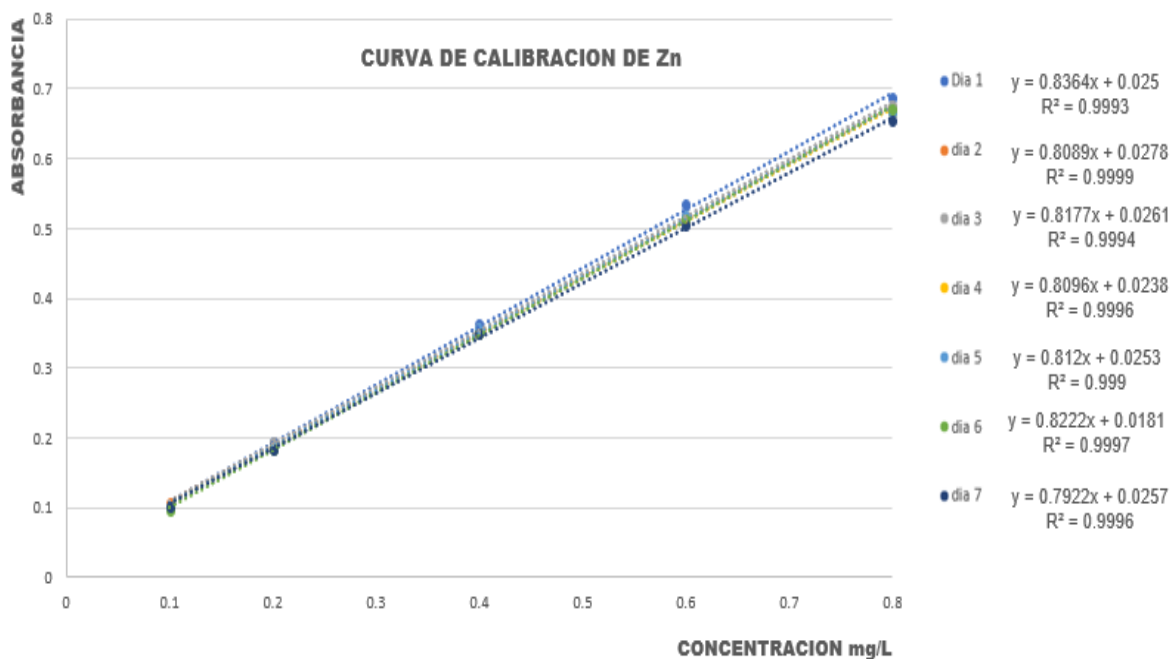


Figura 3. Curvas de calibración de Zinc en la determinación de linealidad instrumental en absorción atómica llama aire acetileno durante los 7 días de ensayo

Se aplicó la técnica de análisis numérico “Mínimos Cuadrados” en la que se intenta encontrar la función continua o ecuación lineal que mejor se aproxime a los datos (mejor ajuste) de acuerdo con el criterio de mínimo error cuadrático, el cual intenta minimizar la suma de cuadrados de las diferencias en las ordenadas (residuos). Los valores para la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación, se muestran en la tabla 8.

Tabla 8 Pendientes, interceptos y coeficientes de correlación de las curvas de calibración en la determinación de linealidad.

METAL	PARAMETRO	SIMBOLO	VALOR
Cd	Coeficiente de Correlación	R	0.9999
	Pendiente	m	0.5995
	Intercepto	b	0.0032
	Desviación Estándar intercepto	Sb	0.0014
Cu	Coeficiente de Correlación	R	0.9996
	Pendiente	m	0.1548
	Intercepto	b	0.0078
	Desviación Estándar intercepto	Sb	0.0004
Zn	Coeficiente de Correlación	R	0.9996
	Pendiente	m	0.8141
	Intercepto	b	0.0244
	Desviación Estándar intercepto	Sb	0.0031

Teniendo en cuenta la normalidad de la distribución de las dos variables cuantitativas, la correlación se evaluó mediante el cálculo del coeficiente de Pearson, permitiendo plantear como hipótesis nula (Ho) que: No existe correlación entre x e y”.

Como se observa en la tabla 9 la significancia estadística es menor a 0.05, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existe una correlación significativa entre la concentración y la respuesta brindada por el equipo (absorbancia). El valor del coeficiente Pearson, indica la correlación positiva perfecta, ósea la existencia de una fuerte relación entre las dos variables, ya que, al cambiar el valor de una variable, también cambia el valor de la otra.

Tabla 9. Resultados obtenidos en la evaluación estadística del coeficiente de correlación de Pearson.

Correlaciones		Cd		Cu		Zn	
		Abs	N.C	Abs	N.C	Abs	N.C
Abs	C.P	1	0,974	1	1,000	1	0,995
	Sig. B		0,000		0,000		0,000
	N	35	35	35	35	35	35
N.C	C.P	0,974	1	1,000	1	0,995	1
	Sig. B	0,000		0,000		0,000	
	N	35	35	35	35	35	35

Abs: absorbancia, N. C nivel de concentración, N número de datos, C.P correlación de Pearson, Sig. B significancia

Tabla 10. Análisis de varianza para evaluar la regresión lineal en la curva de calibración

METAL		SUMA DE CUADRADOS	gl	MEDIA CUADRÁTICA	F	Sig.
Cd	Regresión	0.304	1	0.304	606.95	0.000
	Residuo	0.017	33	0.001		
	Total	0.320	34			
Cu	Regresión	69.747	1	67.747	9099.4	0.000
	Residuo	0.253	33	0.008		
	Total	70.00	34			
Zn	Regresión	69.268	1	69.268	3121.80	0.000
	Residuo	7.32	33	0.022		
	Total	70.00	34			

gl: grados de libertad, Sig:Significancia

Se formuló como hipótesis nula: “No existe regresión significativa en la curva de calibración ($R^2 = 0$)”, y como hipótesis alternativa “Existe regresión significativa en la curva de calibración ($R^2 \neq 0$)”. Como se observa en la tabla 10, la significancia para la regresión es menor de 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, concluyendo que existe regresión significativa en la curva de calibración.

6.2. PRECISION INSTRUMENTAL

Se prepararon 3 curvas de calibración las cuales se analizaron el mismo día bajo las mismas condiciones. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Curvas de calibración bajo condiciones de repetibilidad

NIVEL	Cd CURVA			Cu CURVA			Zn CURVA		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	0.0320	0.0305	0.0310	0.0226	0.0214	0.0221	0.1033	0.1029	0.1057
2	0.0566	0.0587	0.0560	0.0854	0.0896	0.0893	0.1946	0.1905	0.1957
3	0.1127	0.1165	0.1198	0.1622	0.1636	0.1615	0.3670	0.3644	0.3681
4	0.1710	0.1718	0.1744	0.2344	0.2306	0.2370	0.5309	0.5289	0.5316
5	0.2884	0.2801	0.2900	0.3266	0.3252	0.3254	0.6801	0.6866	0.6827

Para la evaluación de la precisión intermedia, se prepararon 5 curvas de calibración realizadas en días diferentes y los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Curvas de calibración bajo condiciones de precisión intermedia

Nivel	Días				
	1	2	3	4	5
	Cd				
1	0.0311	0.0354	0.0341	0.0330	0.0337
2	0.0641	0.0656	0.0641	0.0687	0.0697
3	0.1214	0.1215	0.1201	0.1244	0.1295
4	0.1863	0.1901	0.1841	0.1857	0.1887
5	0.3011	0.3005	0.3047	0.3069	0.3009
	Cu				
1	0.0221	0.0216	0.0244	0.0256	0.0211
2	0.0841	0.0866	0.0850	0.0866	0.0816
3	0.1615	0.1642	0.1630	0.1647	0.1621
4	0.2311	0.2308	0.2315	0.2346	0.2301
5	0.3216	0.3247	0.3236	0.3277	0.3233
	Zn				
1	0.1031	0.1013	0.1090	0.1044	0.1074
2	0.1902	0.1896	0.1861	0.1833	0.1863
3	0.3604	0.36614	0.3647	0.3681	0.3687
4	0.5315	0.5224	0.5296	0.5271	0.5217
5	0.6841	0.6810	0.6799	0.6841	0.6866

Se calculó la absorbancia promedio, la desviación estándar y el porcentaje del coeficiente de variación por nivel de concentración, bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia. Los resultados se presentan en la tabla 14

Tabla 13. Precisión instrumental bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia

NIVEL	REPETIBILIDAD			PRECISIÓN INTERMEDIA		
	Promedio	S	%CV	Promedio	S	%CV
Cd						
1	0.0321	0.0021	6.6	0.0334	0.0015	4.7
2	0.0357	0.0011	1.8	0.0664	0.0026	3.9
3	0.1250	0.0034	2.7	0.1233	0.003	3.0
4	0.1828	0.0009	0.5	0.1864	0.0028	1.5
5	0.3015	0.0006	0.2	0.3028	0.0028	0.9
Cu						
1	0.0220	0.0060	2.7	0.0229	0.0019	8.4
2	0.0881	0.0023	2.6	0.0847	0.0020	2.4
3	0.1624	0.0010	0.6	0.1631	0.0013	0.8
4	0.2340	0.0032	1.3	0.2316	0.0017	0.7
5	0.3257	0.0007	0.2	0.3242	0.0022	0.6
Zn						
1	0.1039	0.0015	1.5	0.1050	0.0031	3.0
2	0.1936	0.0027	1.4	0.1871	0.0028	1.5
3	0.3665	0.0019	0.5	0.3646	0.0037	1.0
4	0.5304	0.0014	0.2	0.5264	0.043	0.8
5	0.6831	0.0032	0.4	0.6831	0.0026	0.3

S: desviación estándar, CV: coeficiente de variación

6.3. LIMITES CRÍTICOS

Los límites de detección y cuantificación se determinaron teóricamente aplicando el método sugerido por la IUPAC y el procedimiento de aseguramiento de la calidad del laboratorio de Construcciones suministros Ltda. Se prepararon 3 curvas de calibración las cuales se analizaron el mismo día y bajo las mismas condiciones. se elaboró de forma gráfica la relación lineal existente entre la absorbancia y la concentración. Con los datos obtenidos se calculó mediante la aplicación de un test de regresión lineal, las ecuaciones de las líneas de tendencia en cada curva, obteniendo de esta forma los interceptos y las pendientes para cada una. Se determinó la desviación estándar de los interceptos (S_b) y el promedio de las pendientes (m_{prom}) de las tres ecuaciones lineales. Se aplicó las ecuaciones 4 y 5 para establecer teóricamente los valores para el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Calculo del límite de detección y cuantificación del método

Metal	Concentración Teórica	Curvas			Σ Promedio	S Desviación	LOD	LOQ
		1	2	3				
Cd	Pendiente	0.5974	0.6034	0.6098	0.6029	0.0070	0.01	0.02
	Intercepto	0.0070	0.0008	0.0024	0.0034	0.0032		
Cu	Pendiente	0.8180	0.8157	0.8190	0.8176	0.0014	0.008	0.06
	Intercepto	0.0023	0.0225	0.0192	0.0147	0.0017		
Zn	Pendiente	0.8364	0.8177	0.8222	0.8254	0.0097	0.01	0.05
	Intercepto	0.0250	0.0260	0.0180	0.0230	0.0043		

El límite de cuantificación LOQ teórico se evaluó de forma experimental preparando 3 réplicas de una solución al nivel de concentración LOQ calculado. Las absorbancias obtenidas para cada solución se promediaron e interpolaron en una curva de calibración preparada y analizada el mismo día, con estos resultados se halló la precisión y la exactitud al LOQ como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Determinación experimental del límite de cuantificación (LOQ)

Metal	Concentración (mg/L)	Resultado (mg/L)	%R	C.V (%)
Cd	0.050	0,051	102	5,8
Cu	0.100	0.094	94	4.5
Zn	0.100	0.093	93	5.8

6.4. IMPLEMENTACION DE LA METODOLOGIA

En la implementación de la metodología en análisis de muestras, se evaluaron los parámetros linealidad, exactitud, precisión y límites críticos de acuerdo al instructivo y protocolo de validación de metodologías analíticas en aguas y en suelos implementadas por el laboratorio.

6.4.1. Linealidad

Correspondiente a la linealidad instrumental. Se emplearon curvas de calibración sometidas a la metodología planteada

6.4.2. Precisión y Exactitud

Los resultados obtenidos en la determinación de la concentración real de cada nivel de la curva, se presentan en la tabla 16. Se determinó la precisión intermedia y exactitud en términos de coeficiente de variación (%C. V) y el porcentaje de recuperación (%R), para cada nivel de concentración de las curvas de calibración en los tres metales como se muestra en la tabla 18.

Tabla 16. Curvas de calibración en la determinación de precisión intermedia

Nivel	Curvas				
	1	2	3	4	5
Cd					
1	0.0484	0.0499	0.0481	0.0496	0.0472
2	0.0997	0.0989	0.0987	0.0997	0.0999
3	0.2017	0.2035	0.2039	0.2017	0.2044
4	0.3015	0.2973	0.3011	0.3015	0.2999
5	0.5001	0.5005	0.4999	0.5010	0.5006
Cu					
1	0.1005	0.1013	0.1096	0.1004	0.1031
2	0.5066	0.5006	0.5089	0.4996	0.5014
3	0.9991	0.9996	1.0615	1.0050	1.0212
4	1.5247	1.5005	1.4996	1.5115	1.5036
5	1.9866	2.006	1.998	2.012	2.005
Zn					
1	0.1064	0.0952	0.0937	0.0908	0.0964
2	0.2189	0.1999	0.2029	0.2074	0.1990
3	0.3982	0.4066	0.4054	0.4037	0.4039
4	0.5973	0.6040	0.6025	0.6028	0.6076
5	0.8015	0.7942	0.7955	0.7954	0.7930

Tabla 17. Determinación de precisión y exactitud del método.

NIVEL	Cd			Cu			Zn		
	S	%CV	% R	S	%CV	% R	S	%CV	% R
1	0.0011	2.2	97.2	0.0038	3.7	102	0.0059	6.1	96.5
2	0.0005	0.5	99.4	0.0040	0.8	100	0.0081	3.9	102.9
3	0.0012	0.6	101	0.0262	2.6	101	0.0032	0.7	100.9
4	0.0017	0.6	100	0.0104	0.7	100	0.0037	0.6	100.5
5	0.0009	0.2	99.8	0.0901	0.5	100	0.0032	0.4	99.5

S.D: desviación estándar, R: recuperación, CV: coeficiente de variación

En las pruebas de normalidad para la curva en función de la concentración (tabla 19), se obtuvo una significancia estadística $p > 0,05$, en todos los metales, indicando que los datos provienen de una población normal.

Tabla 18. Pruebas de normalidad en la determinación de precisión y exactitud del método.

NIVEL	Cd		Cu		Zn	
	Est	Sig.	Est	Sig.	Est.	Sig.
1	0.943	0.687	0.951	0.198	0.845	0.144
2	0.840	0.166	0.810	0.647	0.457	0.647
3	0.846	0.182	0.877	0.568	0.541	0.158
4	0.797	0.076	0.795	0.481	0.545	0.084
5	0.970	0.875	0.789	0.857	0.584	0.471

Est: estadístico, Sig: significancia

Los resultados de la prueba mostraron un %R (mediana) y un %R promedio que cumplen a los criterios de aceptabilidad establecidos (95-105) por el método. De igual forma los % C.V son inferiores a 10.

6.4.3. Implementación de las metodologías en aguas residuales

Se utilizó una muestra de agua residual industrial proveniente del vertimiento *Puente Santander Norte*, a la cual se le determinó la cantidad de metales totales sometiéndola a la metodología descrita anteriormente. Se analizaron tres réplicas de cada muestra (muestras adicionales) durante cinco días diferentes, preparando una curva de calibración por día (ver precisión intermedia) y los resultados obtenidos para las muestras se interpolaron en la curva de calibración correspondiente, en la que los patrones fueron sometidos al mismo tratamiento que las muestras.

Se realizó la corrección en la concentración del metal obtenido para cada muestra teniendo en cuenta el % R del método. Se determinó la precisión en términos del % C.V, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 19.

Se aplicó el método de estandarización del laboratorio usando muestras con las siguientes características: dos estándares de concentración conocida (un estándar bajo STDB y un estándar alto STDA) preparados internamente por el laboratorio. Una muestra líquida con concentración de metales totales desconocida (M1T), Dos fortificaciones, para comparar el efecto matriz en un rango bajo y un rango alto (M1Tb, M1Ta) respectivamente y un blanco (BK).

Tabla 19. Resultados de los análisis a muestras de agua residual

MUESTRA	PROMEDIO mg/L	S	CV %	(% R)
Cd				
M1T	0.0972	0.0041	4.2	
M1Tb	0.1780	0.0205	3.1	101
M1Ta	0.3601	0.0111	1.8	97.3
Cu				
M1T	0.1454	0.0087	6.0	
M1Tb	0.9354	0.0147	1.5	98.7
M1Ta	1.3212	0.0214	1.6	98.0
Zn				
M1T	0.1841	0.0096	5.2	
M1Tb	0.3389	0.0154	4.5	96.7
M1Ta	0.5315	0.0101	1.9	99.3

6.4.4. Prueba de desempeño y competencia para el análisis de cadmio cobre y Zinc en aguas.

Se realizaron pruebas de desempeño con muestras certificadas otorgadas por el proveedor certificado de pruebas Inter-laboratorio ERA (Environmental Resources Associates), con el fin de participar en la demostración de la competencia técnica frente a otros laboratorios, en la demostración de la estandarización del método y contribuir a la extensión del alcance de la acreditación otorgada al laboratorio. Los valores de concentración de los metales en las muestras problema son confidenciales por parte de ERA hasta la fecha de reporte final. La entidad evalúa y contrasta el resultado reportado, con el valor certificado verdadero y con los resultados de otros laboratorios y teniendo en cuenta el error o incertidumbre asociada, el proveedor emite una calificación, la cual es satisfactoria solo si el resultado está dentro del rango establecido.

En caso de que sea satisfactoria, la prueba se considera superada y se vuelve requisito fundamental para la demostración y acreditación del método para determinación de metales en muestras líquidas. En la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos en la participación.

Tabla 20. Resultados de las pruebas de desempeño Inter laboratorios

METAL	ERA Valor asignado	LABORATORIO CONSTRUCSUELOS Valor reportado	% E	%R	EVALUACION
Cd	0.361	0.366	1.4	101.4	Satisfactoria
Cu	0.166	0.164	1.2	98.8	Satisfactoria
Zn	0.174	0.164	5.7	140.2	Satisfactoria

6.5. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA DETERMINACIÓN DE CADMIO, COBRE Y ZINC

Para calcular el valor de la incertidumbre para este método se tiene en cuenta el siguiente diagrama de espina de pescado donde se relacionan todas las posibles fuentes de incertidumbre. Se desarrolla la incertidumbre para un metal y en forma resumida se presenta la incertidumbre para Cadmio, Cobre y Zinc en el Anexo A, tablas A4, A5 Y A6.

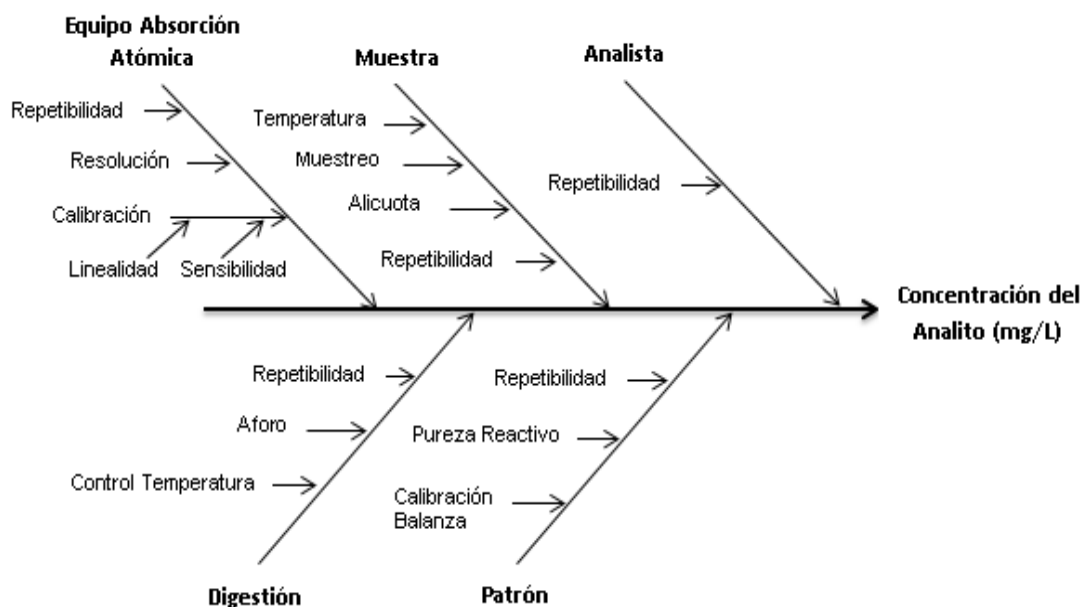


Figura 4. Diagrama de Espina de pescado en la evaluación de incertidumbre.

7. RESUMEN DE LAS METODOLOGIAS IMPLEMENTADAS

En la tabla 21. Se muestra el resumen general de las metodologías implementadas en la cual se describen parámetros como: método, rango de trabajo, longitud de onda, límites críticos, coeficiente de correlación, porcentajes de recuperación y coeficientes de variación para cada metal.

Tabla 21 Resumen de las metodologías implementadas.

Metal	Longitud de onda (nm)	Intervalo Trabajo	LOD	LOQ
Cd	228.8	0.05-0.5	0,01	0.05
Cu	324.8	0.1-2.0	0,02	0.1
Zn	213.9	0.1 -0.8	0,01	0.1

8. CONCLUSIONES

- Se implementaron las metodologías analíticas necesarias para la determinación de cadmio, cobre y zinc, por espectroscopia de absorción atómica de llama.
- Las metodologías validadas cumplieron con porcentajes de recuperación entre el 95 y el 105%, con coeficientes de variación menores al 10% logrando obtener metodologías sensibles y lineales bajo los parámetros trabajados.
- El laboratorio Construcsuelos extendió el alcance de la acreditación en las matrices aguas para el análisis de tres metales por espectroscopia de absorción atómica.
- Se elaboraron los respectivos formatos de captura de datos, protocolos de ensayo e instructivos técnicos en aguas y suelos necesarios para llevar a cabo de manera clara la determinación de metales en aguas
- Los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas permiten concluir que el método instrumental empleado para determinación de Cadmio, Cobre y Zinc se comporta de manera lineal, como lo exige la norma para la determinación de metales por EAA, cumpliendo así la ley de Beer-Lambert.

9. BIBLIOGRAFIA

1. B. Shama, S. T. *Simplification of metal ion analysis in fresh water samplas by atomic absorption spectroscopy for laboratory students*. Journal of laboratory chemical educacion, 2013, pág. 54-58.
2. Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Díaz, M., González, E. *Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria*. Ingenieria, Investigacion y Desarrollo, 2016, pág. 66-77.
3. Gonzales, L., Torres, F. *Use of LANDSAT 8 images for depth and water quality assessment of El Guajaro reservoir, Colombia*. Journal of South American Earth Sciences 82, 2018, pág. 231-238
4. Chatterjee, S.K, Bhattacharjee, Chandra, I.G. *Biosorption of heavy metals from industrial waste water by Geobacillus thermodenitrificans*, Journal of Hazardous Materials 175, 2010, pág. 117–125
5. Benitez, L.T, Flegal. R., Odigie K., Verbel, J.O., *Pollution by metals and toxicity assessment using caenorhabditis elegans in sediments from the Magdalena River, Colombia* 2016. Enviromental Pollution 212, pag 238.
6. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM, Estudio nacional del agua, *ENA*, Bogotá 2014
7. Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. Resolución 0631: Parámetros y Valores máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público. Bogota. 17 de marzo de 2015
8. Karia, G.L, Christian R,A. *Wastewater treatment concepts and design approach*, 2nd edition, PHI Learning private limited, rimjhim house 2013.
9. Espectroscopia de absorción atómica, [EN LINEA] <<http://es.scribd.com/doc/35172981/Espectroscopia-de-Absorcion-Atomica>> [Consulta: 03 de marzo de 2018]

10. Andrew D. EATON. STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER & WASTEWATER. Centennial edition. 22st Edition. 2012. SM 3030 E, SM 3111 B
11. EPA US. Acid digestion of sediments sludge's and soils. Method 3050 B. December 1996.
12. US Environmental Protection Agency. Method 7470A – mercury in liquid waste (manual cold-vapor technique), 6 p, September 1994
13. Jong, T. David L. Parry. *Evaluation of the stability of arsenic immobilized by microbial sulfate reduction using TCLP extractions and long-term leaching techniques*. Environmental Analytical Chemistry Unit, School of Science and Primary Industries, Faculty of Education, Australia. 14 December 2004.
14. INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Requisitos Generales de Competencia de Laboratorios de Ensayo y Calibración ISO/IEC 17025. Bogotá: ICONTEC, 2001.
15. Laboratorios analíticos ICSA. Disponible en: www.icsa.es/laboratorios-analiticos/consultoria-de-laboratorios/norma-iso-17025. Citado el 25 de marzo de 2018.
16. Organismo Nacional De Acreditación De Colombia, ONAC., Colombia. Disponible en : <http://www.onac.org.co/modulos/contenido/default.asp?idmodulo=243>. Citado el 20 de marzo de 2018
17. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, IDEAM. *Protocolo de estandarización de métodos analíticos*. Programa de Físico-química Ambiental. Bogotá, 1999. 10 p
18. Miller, J., Miller, J. ESTADÍSTICA Y QUIMIOMETRÍA Para Química Analítica. 4ª Edición. Editorial Prentice Hall. España. 2000. 278p.
19. SKOOG, D. Principios De Análisis Instrumental. 5ª Edición. Editorial Mcgraw Hill. España. 2001.
20. Guía CG 4 EURACHEM / CITAC, Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas, 3 edición. EuroLAB. España.

21. Norma técnica colombiana GTC 51, *Guía para la expresión de incertidumbre en las mediciones*. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC) Apartado 14237 Bogotá, D.C.

ANEXOS

DETERMINACION DE LA INCERTIDUMBRE

A continuación, se describe el proceso del cálculo de la incertidumbre asociada a las mediciones para el metal Zinc.

1. INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DE LA PUREZA DEL REACTIVO

El valor de su pureza y su incertidumbre normalmente vienen expresados en porcentaje, por lo tanto, se deben dividir entre 100 antes de calcular la incertidumbre estándar. Cuando la incertidumbre viene dada solo por el % de pureza esta se sustrae de 100 y se divide en 100.

$$u_1 = \mu/\sqrt{3}$$

Se asume $\sqrt{3}$ se asume para la distribución rectangular, cuando no se especifica el intervalo de confianza ni la forma o simetría de la distribución.

2. INCERTIDUMBRE COMBINADA PARA LA PUREZA

Esta es igual a la incertidumbre estándar porque no hay sino un componente para evaluar, entonces:

$$u_1 = U_c$$

2.1 Incertidumbre estándar relativa para la pureza

Con el valor nominal de la pureza, calculamos la IER (Incertidumbre estándar relativa), la que corresponde a la relación entre la incertidumbre combinada y la pureza, así:

$$IER\ 1 = U_c/Pureza$$

Tabla A1 Incertidumbre estándar relativa para la pureza

Componentes	Zinc
Pureza del patrón	1000 ± 0,0015
U1	0,0008
Uc	0,0008
IER1	8.6602x⁻⁶

2.2 Incertidumbre estándar de la dilución del reactivo

Esta es la incertidumbre del material volumétrico utilizado para aforar la solución. Esta incertidumbre se obtiene del valor μ indicado en el material volumétrico o en el certificado respectivo (debe ser suministrado por el proveedor)

$$u_2 = \mu/\sqrt{6}$$

Tabla A2 Incertidumbre estándar de la dilución del reactivo

Tolerancia del balón de 50 mL	0,06
U balón	0,0245

Se asume una distribución triangular a menos que el fabricante indique otro tipo de distribución (nivel de confianza) diferente.

2.3 Incertidumbre estándar de la diferencia de temperatura de calibración del material volumétrico del aforo

Esta contribución se obtiene a partir de una variación estimada en la temperatura de 3 °C del coeficiente de dilatación volumétrica para el agua $2,1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}$ y el volumen del material volumétrico utilizado para la medición de la muestra (x). Se asume 3 °C, como una variación normal en un laboratorio, que debe mantener la temperatura de sus ensayos prácticamente constante.

$$u_3 = [(X) (3) (2,1 \times 10^{-4})]/\sqrt{3}$$

$$u_3 = 0,0182$$

Se divide entre $\sqrt{3}$ asumiendo una distribución rectangular. Se utilizó un balón de 50mL.

2.4 Incertidumbre estándar de la verificación del material volumétrico

Esta incertidumbre se obtiene a través de la desviación estándar (s) calculada a partir de la verificación del volumen .

Tabla A3 Incertidumbre estándar de la verificación del material volumétrico

Verificación volumen	Promedio	Desviación estándar	U balón 50mL
49.8535	49.8497	0.0089	0,0028
49,8592			
49,8589			
49.8331			
49.8477			
49.8373			
49.8451			
49.8569			
49.8523			
49.8531			

$$u_4 = s/\sqrt{n}$$

$$u_4 = 0.0028$$

3. INCERTIDUMBRE COMBINADA PARA LA DILUCIÓN DEL REACTIVO

La incertidumbre combinada de la dilución del reactivo corresponde a la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de u_4 a u_6

$$U_c = \sqrt{(u_2^2 + u_3^2 + u_4^2)}$$

$$U_c = \sqrt{(0.0245^2 + 0.0182^2 + 0.0028^2)}$$

$$U_c = 0,0306$$

4. INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA PARA LA DILUCIÓN DEL REACTIVO

Con el valor del volumen del balón, calculamos la IER (Incertidumbre estándar relativa), la que corresponde a la relación entre la incertidumbre combinada y el volumen, así:

$$IER\ 2 = U_c/\text{Volumen del balón}$$

$$IER\ 2 = 0.0006$$

4.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES – INCERTIDUMBRE COMBINADA

En éste cálculo se reúnen todas las contribuciones de incertidumbre relativa estándar en la preparación de la solución.

$$U_{c1} = \sqrt{(IER1^2 + IER2^2)}$$

$$U_{c1} = 0,0006$$

4.2 Incertidumbre estándar de la medición del volumen del reactivo

Incertidumbre estándar de la pipeta para la toma de alícuota (estándar, muestra o blanco. Se obtiene del valor μ indicado en el material volumétrico o en el certificado respectivo (debe ser suministrado por el proveedor). El valor de μ reportado por la calibración de la transferpipeta de 5 es 0,16% esto corresponde a 0,0016

$$u_5 = \mu/\sqrt{3}$$

$$u_5 = 0,0009$$

Se asume una distribución rectangular a menos que el fabricante indique otro tipo de distribución (nivel de confianza) diferente.

4.3 Incertidumbre estándar de la diferencia de temperatura de calibración del material volumétrico de la alícuota

Se obtiene esta contribución a partir de una variación estimada en la temperatura de 3 °C del coeficiente de expansión de volumen para el agua $2,1 \cdot 10^{-4}$ °C y el volumen del material volumétrico utilizado para la medición de la muestra (x).

$$u_6 = [(X) (3) (2,1 \cdot 10^{-4})]/\sqrt{3}$$

$$u_6 = 0,00182$$

4.4 Incertidumbre estándar de la verificación del material volumétrico

Esta incertidumbre se obtiene a través de la desviación estándar (s) calculada a partir de la verificación del volumen (10 mediciones como mínimo) del material volumétrico usado para medir la muestra.

$$u_7 = s/\sqrt{n}$$

Tabla A4. Incertidumbre estándar de la verificación del material volumétrico

Verificación volumen transfer de 5mL	promedio	Desviación estándar	U7
5.0569	5.0085	0.0052	0.0016
5.0150			
5.0116			
5.0034			
4.9955			
5.0037			
5.0008			
4.9635			
4.9902			
5.0142			

4.5 Incertidumbre combinada para la dilución del reactivo

La incertidumbre combinada de la dilución del reactivo corresponde a la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de u7 a u9.

$$U_c = \sqrt{(u_5^2 + u_6^2 + u_7^2)}$$

$$U_c = 0,0026$$

4.6 Incertidumbre estándar relativa para la medición de la alícuota

Con el valor del volumen del balón, calculamos la IER (Incertidumbre estándar relativa), la que corresponde a la relación entre la incertidumbre combinada y el volumen, así:

$$IER\ 3 = U_c / \text{Volumen Balon}$$

$$IER\ 3 = 0,00005$$

5. INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DE LA LECTURA DEL EQUIPO

La habilidad de un instrumento de medición para responder a los cambios de la cantidad que está siendo medida puede ser considerada como la incertidumbre de la medición debido a la resolución. Si la diferencia en el instrumento es δx , el valor estimulado que produce una indicación X dada puede localizarse en cualquier intervalo $x - \delta x/2$ a $x + \delta x/2$. El estímulo es entonces descrito mediante una distribución de probabilidad uniforme. Esta puede estimarse a partir de las diferencias relativas en las respuestas de dos calibraciones consecutivas, mediante la siguiente ecuación:

$$U_8 = \frac{1}{\sqrt{12}} x \left[\frac{(R_n - R_{n-1})}{\left(\frac{R_n + R_{n-1}}{2}\right)} \right]$$

Siendo:

R_n la respuesta del detector, en la calibración n , para un patrón de calibración de una concentración dada

R_{n-1} la respuesta del detector, en la calibración anterior, para el mismo patrón. El patrón que se tomó fue el 0.8 mg/L para obtener la incertidumbre asociada al equipo.

$$u_8 = 0,0049$$

5.1 Incertidumbre por división de escala

Equivale a la mínima división de escala del equipo utilizado (de), dividido entre $\sqrt{3}$, si es un instrumento análogo o $\sqrt{6}$, si es un instrumento digital. La lectura mínima de equipos de absorción atómica Shimadzu 7000 AA mostradas en el display, 0,0001

$$u_9 = \frac{\mu}{\sqrt{6}} \quad u_9 = 4,08 \times 10^{-5}$$

5.2 Incertidumbre combinada para la lectura del equipo

La incertidumbre combinada de la dilución del reactivo corresponde a la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de u_8 a u_9

$$U_c = \sqrt{(u_8^2 + u_9^2)}$$

$$U_c = 0,0049$$

5.3 Incertidumbre estándar relativa de la lectura del equipo

$$\text{IER 4} = U_C / \text{Concentración}$$

$$\text{IER 4} = 0,0061$$

5.4 Incertidumbre por reproducibilidad

Corresponde a la desviación estándar obtenida durante la validación para uno de los estándares dividida entre la raíz cuadrada del número de ensayos realizados. Para esta se tomó el estándar 0.8 mg/L la desviación estándar para un numero de 7 ensayos fue de (S= 0,0125)

$$u_{10} = s / \sqrt{n}$$

$$u_{10} = 0,0047$$

5.5 Incertidumbre estándar relativa de la reproducibilidad

$$\text{IER 5} = \frac{u_{10}}{\text{Concentración}}$$

$$\text{IER 5} = 5.88 \times 10^{-3}$$

5.6 Incertidumbre combinada total para la lectura en el equipo

Calculamos la incertidumbre combinada total sumando todos las IER elevados al cuadrado y aplicamos raíz:

$$U_{c2} = \sqrt{(\text{IER3}^2 + \text{IER4}^2 + \text{IER5}^2)}$$

$$U_{c2} = 0,00847$$

Sumamos la $U_c 1$ y $U_c 2$ y obtenemos la Incertidumbre combinada total.

$$U_{CT} = U_{C1} + U_{C2}$$

$$U_{CT} = 0,0133$$

5.7 Incertidumbre expandida

De acuerdo a la definición de la incertidumbre expandida obtenemos:

$$U = (2)(U_{CT})(X)$$

Donde X es el valor de la concentración del patrón o muestra calculada y 2 es el factor k de acuerdo al nivel de confianza del 95%.

$$U = (2)(0,0133)(0,8) = 0.02$$

6. EXPRESIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

La expresión de la incertidumbre expandida U incluye su indicación como un intervalo centrado en el mejor estimado y del mensurando, la afirmación de que p es del 95% (o el valor elegido) aproximadamente y el número efectivo de grados de libertad, cuando sea requerido. Una manera de expresar el resultado de la medición es

$$Y = y \pm U$$

$$Y = y \pm 0,02$$

El número de cifras significativas en la expresión de la incertidumbre es generalmente uno, o dos cuando la exactitud es alta (si la primera cifra significativa es uno o dos, cabe la posibilidad de usar un dígito más para evitar la pérdida de información útil). Además, debe asegurarse que el número de cifras significativas del valor del mensurando sea consistente con el de la incertidumbre

En la tabla A4, tabla A5 y tabla A6 se presenta en resumen la medición de la incertidumbre para Cadmio, Cobre y Zinc respectivamente.

Tabla A5. Incertidumbre de la medición para Cd

Pureza reactivo	Pureza	$\pm 0,0015$
	U	0.0015
	U compuesta	0.0015
	U relativa	8.62×10^{-6}
Balón de 50 mL	Tolerancia	0.06
	U tolerancia	0.0245
	U temperatura	0.0182
	Verificación	0.009
	U verificación	0.0028
	U combinada	0.0306
	U relativa	0.0006
U combinada preparación soluciones	$(U_{2\text{relativa balón}} + U_{2\text{relativa pureza}})^{1/2}$	0.0006
Transfer 5.0mL	Tolerancia	0.0016
	U tolerancia	0.0009
	U temperatura	0.0182
	Verificación	0.0052
	U verificación	0.0016
	U combinada	0.0026
	U relativa	0.00005
Equipo	Desviación estándar patrón	0.0105
	U desviación	0.004
	Escala	0.0001
	U escala	0.000048
	U combinada	0.0049
	U relativa equipo	0.0061
Reproducibilidad	Desviación estándar patrón	0.0066
	U desviación	0.0025
	U relativa	0.0038
Combinada de lectura (U _{comb lectura})	$(U_{2\text{relativa equipo}} + U_{2\text{relativa reproducibilidad}} + U_{2\text{relativa transfer}})^{1/2}$	0.0063
Incertidumbre combinada total (U _{ct})	U _{comb lectura} + U _{combinada preparación soluciones}	0.0082
Incertidumbre expandida	U _{ct} × K K=2	0.008
Expresión resultados	U _{ct} × K × C K=2 C=0,1	mg Cd/L $\pm 0,008$

Tabla A6. Incertidumbre de la medición para Cu

Pureza reactivo	Pureza	±0,0015
	U	0.0015
	U compuesta	0.0015
	U relativa	8.62×10^{-6}
Balón de 50 mL	Tolerancia	0.06
	U tolerancia	0.0245
	U temperatura	0.0182
	Verificación	0.009
	U verificación	0.0028
	U combinada	0.0306
	U relativa	0.0006
U combinada preparación soluciones	$(U_{2\text{relativa balón}} + U_{2\text{relativa pureza}})^{1/2}$	0.0006
transfer 5.0mL	Tolerancia	0.0016
	U tolerancia	0.0009
	U temperatura	0.0182
	Verificación	0.0052
	U verificación	0.0016
	U combinada	0.0026
	U relativa	0.00005
Equipo	Desviación estándar patrón	0.0105
	U desviación	0.004
	Escala	0.0001
	U escala	0.000048
	U combinada	0.0049
	U relativa equipo	0.0061
Reproducibilidad	Desviación estándar patrón	0.0141
	U desviación	0.0047
	U relativa	0.0058
Combinada de lectura (U _{comb lectura})	$(U_{2\text{relativa equipo}} + U_{2\text{relativa reproducibilidad}} + U_{2\text{relativa transfer}})^{1/2}$	0.00847
Incertidumbre combinada total (U _{ct})	U _{comb lectura} + U _{combinada preparación soluciones}	0.0045
Incertidumbre expandida	U _{ct} × K K=2	0.004
Expresión resultados	U _{ct} × K × C K=2 C=0,1	mgCu/L ± 0,004

Tabla A7. Incertidumbre de la medición para Zn

Pureza reactivo	Pureza	$\pm 0,0015$
	U	0.0015
	U compuesta	0.0015
	U relativa	8.62×10^{-6}
Balón de 50 mL	Tolerancia	0.06
	U tolerancia	0.0245
	U temperatura	0.0182
	Verificación	0.009
	U verificación	0.0028
	U combinada	0.0306
	U relativa	0.0006
U combinada preparación soluciones	$(U_{2\text{relativa balón}} + U_{2\text{relativa pureza}})^{1/2}$	0.0006
transfer 5.0mL	Tolerancia	0.0016
	U tolerancia	0.0009
	U temperatura	0.0182
	Verificación	0.0052
	U verificación	0.0016
	U combinada	0.0026
	U relativa	0.00005
Equipo	Desviación estándar patrón	0.0105
	U desviación	0.004
	Escala	0.0001
	U escala	0.000048
	U combinada	0.0049
	U relativa equipo	0.0061
Reproducibilidad	Desviación estándar patrón	0.0141
	U desviación	0.0047
	U relativa	0.0058
Combinada de lectura (U _{comb lectura})	$(U_{2\text{relativa equipo}} + U_{2\text{relativa reproducibilidad}} + U_{2\text{relativa transfer}})^{1/2}$	0.00847
Incertidumbre combinada total (U _{ct})	$U_{\text{comb lectura}} + U_{\text{combinada preparación soluciones}}$	0.0133
Incertidumbre expandida	$U_{\text{ct}} \times K$ K=2	0.02
Expresión resultados	$U_{\text{ct}} \times K \times C$ K=2 C=0,1	mgZn/L $\pm 0,025$

