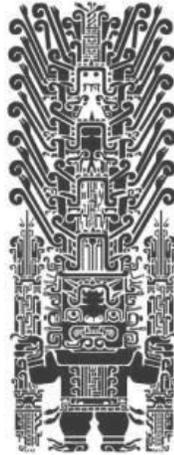


UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE QUIMICA



**“VALIDACION DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACION DE COBRE,
CROMO, MANGANESO Y NIQUEL EN SUELO POR ABSORCIÓN
ATÓMICA DE FLAMA”**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Química

CONDORI CASTRO WILDER

LIMA - PERU

2016

*A mi madre por su apoyo, consejos,
comprensión, amor y ayuda en los
momentos difíciles...*

*A mi amada esposa quien me prestó
el tiempo que le pertenecía para lograr mis
objetivos trazados...*

RESUMEN

En el presente trabajo se demostró la aplicabilidad del método analítico propuesto, aun introduciendo cambios significativos, para el análisis de Cu, Cr, Mn y Ni en suelos por Absorción Atómica de Flama. Se estableció una evidencia documentada de que el método analítico es capaz de cumplir en forma consistente y repetitiva las especificaciones establecidas.

Se presentan los resultados obtenidos del método analítico; donde se analizaron diferentes parámetros como son: veracidad, precisión, linealidad y rango de trabajo, límite de detección y cuantificación, sensibilidad y robustez. Definida las condiciones, se inicia los análisis para la evaluación de los parámetros de estadísticos y se demuestra mediante el diseño experimental y los procedimientos estadísticos empleados, que el método analítico propuesto es veraz porque se obtiene un porcentaje de recuperación media de 100,41%; 100,32%; 100,05% y 100,03% en Cu, Cr, Mn y Ni respectivamente es preciso ya que se obtiene un RSD de 0,38%, 1,20%; 0,80% y 1,34% en Cu, Cr, Mn y Ni respectivamente siendo menor al valor máximo según Horwitz de 7,72%, 9,01%; 7,05% y 8,70% en Cu, Cr, Mn y Ni respectivamente, es lineal porque presenta un coeficiente de correlación general de 0,9999 en Cu, Cr, Mn y Ni respectivamente, es sensible con un límite de detección de 9,0; 6,0; 6,0 y 6,0 mg/kg en Cu, Cr, Mn y Ni respectivamente, se demostró que el método es robusto a los cambios de masa de muestra, temperatura de secado de muestra y variación en la digestión con HCl.

Cumpliendo los parámetros de validación establecidos, se comprobó de esta forma la validez del método analítico. Las ventajas que ofrece esta técnica son su sencillez y rapidez para obtener los resultados, así como también la alta sensibilidad para determinación de analitos traza.

ABSTRACT

In this paper the applicability of the proposed analytical method was demonstrated, even introducing significant changes to the analysis of Cu, Cr, Mn and Ni in soils by Flame Atomic Absorption. Documented evidence that the analytical method is able to deliver consistently and repeatedly stated specifications are established.

The results of the analytical method are presented; accuracy, precision, linearity and working range, limit of detection and quantification, sensitivity and robustness: where different parameters such as were analyzed. Defined conditions, analyzes for evaluating statistical parameters starts and is demonstrated by the experimental design and statistical procedures used, the analytical method proposed is true because a percentage of average recovery of 100.41% is obtained; 100.32%; 100.05% to 100.03% of Cu, Cr, Mn and Ni is respectively necessary since a RSD of 0.38% is obtained, 1.20%; 0.80% and 1.34% of Cu, Cr, Mn and Ni respectively being less than the maximum value of 7.72% according Horwitz, 9.01%; 7.05% and 8.70% of Cu, Cr, Mn and Ni, respectively, is linear because it generally has a correlation coefficient of 0.9999 Cu, Cr, Mn and Ni, respectively, is sensitive with a detection limit of 9.0; 6.0; 6.0 and 6.0 mg / kg of Cu, Cr, Mn and Ni, respectively, showed that the method is robust to changes in sample mass, drying temperature and variation in sample digestion HCl.

Fulfilling the validation parameters set was found in this way the validity of the analytical method. The advantages of this technique are its simplicity and speed to get the results, as well as high sensitivity for trace determination of analytes.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA

RESUMEN

ABSTRACT

INDICE DE TABLAS

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN 1

I.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.- ANTECEDENTES	3
1.2.- FORMULACION DEL PROBLEMA	5
1.3.- JUSTIFICACION DEL PROBLEMA	5
1.4.- OBJETIVOS	6

II.- MARCO TEORICO

2.1.- Espectroscopia de Absorción Atómica	7
2.2.- Validación de Métodos Analíticos	10
2.3.- Parámetros de Validación de un Método	12
A.- Veracidad	12
B.- Precisión	18
C.- Selectividad / Especificidad	21
D.- Rango de Trabajo y Linealidad	24
E.- Limite de Detección y Limite de Cuantificación	26
F.- Sensibilidad	29
G.- Robustez	31

III.- METODO

3.1.- Equipos, materiales y reactivos	36
3.2.- Procedimiento Experimental	38
3.3.- Expresión de Resultados	42
3.4.- Tratamiento Estadístico de los Datos	42

A.- Prueba de Normalidad de los datos	43
B.- Prueba de Grubbs	43
C.- Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Bartlett	44
D.- Prueba de Análisis de Varianza (ANOVA)	45
E.- Veracidad	46
F.- Precisión	48
G.- Linealidad y Rango de Trabajo	48
H.- Limite de Detección y Limite de Cuantificación	51
I.- Sensibilidad	52
J.- Robustez	52
IV.- DISCUSION	55
V.- CONCLUSIONES	59
VI.- RECOMENDACIONES	60
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	164
ANEXOS	
ANEXO N° 1: ANALISIS ESTADISTICO DE COBRE	61
ANEXO N° 2: ANALISIS ESTADISTICO DE CROMO	83
ANEXO N° 3: ANALISIS ESTADISTICO DE MANGANESO	105
ANEXO N° 4: ANALISIS ESTADISTICO DE NIQUEL	127
ANEXO N° 5: DETERMINACION DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE EN EL ENSAYO DE Cu, Cr, Mn y Ni	149
ANEXO N° 6: ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE EN LA DETERMINACION DE Cu, Cr, Mn y Ni	150
ANEXO N° 7: PROTOCOLO DE MONITOREO DE SUELOS	154

INDICE DE TABLAS

MARCO TEORICO

Tabla N° 1. - Desviaciones Estándares Relativas aceptables recomendadas para la repetibilidad a diferentes concentraciones del analito.	20
Tabla N° 2 – Test de Robustez de Youden para un método analítico	34

METODO

Tabla N° 3 - Condiciones Instrumentales de operación	41
Tabla N° 4 - Criterio de decisión para la verificación de la Normalidad de los datos	43
Tabla N° 5 - Criterio de decisión de la Prueba de Grubbs	44
Tabla N° 6 - Criterio de decisión para la verificación de la igualdad de precisión	45
Tabla N° 7 - Criterio de decisión para la verificación de la igualdad de las medias	46
Tabla N° 8 - Verificación de la Veracidad del Método	47
Tabla N° 9 - Verificación de la Precisión del Método	48
Tabla N° 10 - Verificación de la Linealidad.	50
Tabla N° 11. - Combinaciones para el análisis de robustez	53
Tabla N° 12 - Variables seleccionadas para el estudio de Robustez	53
Tabla N° 13 - Criterio de decisión para la verificación de la Robustez en cada variable	54
Tabla N° 14 - Cálculo de la diferencia de respuesta para cada variable	54

ANEXO N° 1 ANALISIS ESTADISTICO DE COBRE

Tabla N° 15 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Cobre realizado el 13/05/201365
Tabla N° 16 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Cobre realizado el 14/05/201367
Tabla N° 17 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Cobre realizado el 15/05/201368
Tabla N° 18 - Resultados de la verificación de las Curvas de Calibrado de Cu69
Tabla N° 19 - Determinación de Cobre en Suelos70
Tabla N° 20 - Parámetros obtenidos de la Prueba de Grubbs de los datos de la tabla N° 1972
Tabla N° 21 - Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Cobre.73
Tabla N° 22 - Prueba de Igualdad de Medias de Cobre.75
Tabla N° 23 - Resultados de los ensayos de Recuperación realizado en tres niveles77
Tabla N° 24 - Resultados obtenidos para el cálculo de la precisión del Método79
Tabla N° 25 - Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas de las tablas N° 26, 27 y 28.79
Tabla N° 26 - Curva de Calibración Cu Día 13/05/201380
Tabla N° 27 - Curva de Calibración Cu Día 14/05/201380
Tabla N° 28 - Curva de Calibración Cu Día 15/05/201381
Tabla N° 29 – Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas evaluadas en conjunto83

Tabla N° 30 - Resultados de las lecturas de los patrones de concentración baja para el cálculo del límite de Detección y Cuantificación84
Tabla N° 31 - Resultados del cálculo del límite de Detección y límite de Cuantificación86
Tabla N° 32 – Resultados del cálculo de la sensibilidad86
Tabla N° 33 - Resultados obtenidos en los ensayos para la determinación de Robustez87
Tabla N° 34 - Resultado de la evaluación de la robustez87

ANEXO N° 2 ANALISIS ESTADISTICO DE CROMO

Tabla N° 35 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Cromo realizado el 20/05/201388
Tabla N° 36 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Cromo realizado el 21/05/201389
Tabla N° 37 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Cromo realizado el 22/05/201390
Tabla N° 38 - Resultados de la verificación de las Curvas de Calibrado de Cromo91
Tabla N° 39 - Determinación de Cromo en Suelos92
Tabla N° 40 - Parámetros obtenidos de la Prueba de Grubbs de los datos de la tabla N° 3994
Tabla N° 41 - Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Cromo.95
Tabla N° 42 - Prueba de Igualdad de Medias de Cromo.97
Tabla N° 43 - Resultados de los ensayos de Recuperación realizado en tres niveles99

Tabla N° 44 - Resultados obtenidos para el cálculo de la precisión del Método101
Tabla N° 45 - Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas de las tablas N° 46, 47 y 48.101
Tabla N° 46 - Curva de Calibración Cr Día 20/05/2013102
Tabla N° 47 - Curva de Calibración Cr Día 21/05/2013102
Tabla N° 48 - Curva de Calibración Cr Día 22/05/2013103
Tabla N° 49 – Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas evaluadas en conjunto105
Tabla N° 50 - Resultados de las lecturas de los patrones de concentración baja para el cálculo del límite de Detección y Cuantificación106
Tabla N° 51 - Resultados del cálculo del límite de Detección y límite de Cuantificación108
Tabla N° 52 – Resultados del cálculo de la sensibilidad108
Tabla N° 53 - Resultados obtenidos en los ensayos para la determinación de Robustez109
Tabla N° 54 - Resultado de la evaluación de la robustez109

ANEXO N° 3 ANALISIS ESTADISTICO DE MANGANESO

Tabla N° 55 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Manganeso realizado el 27/05/2013110
Tabla N° 56 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Manganeso realizado el 28/05/2013111
Tabla N° 57 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Manganeso realizado el 29/05/2013112

Tabla N° 58 - Resultados de la verificación de las Curvas de Calibrado de Manganeso113
Tabla N° 59 - Determinación de Manganeso en Suelos114
Tabla N° 60 - Parámetros obtenidos de la Prueba de Grubbs de los datos de la tabla N° 59116
Tabla N° 61 - Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Manganeso117
Tabla N° 62 - Prueba de Igualdad de Medias de Manganeso.119
Tabla N° 63 - Resultados de los ensayos de Recuperación realizado en tres niveles121
Tabla N° 64 - Resultados obtenidos para el cálculo de la precisión del Método123
Tabla N° 65 - Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas de las tablas 66, 67 y 68.123
Tabla N° 66 - Curva de Calibración Mn Día 27/05/2013124
Tabla N° 67 - Curva de Calibración Mn Día 28/05/2013124
Tabla N° 68 - Curva de Calibración Mn Día 29/05/2013125
Tabla N° 69 – Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas evaluadas en conjunto127
Tabla N° 70 - Resultados de las lecturas de los patrones de concentración baja para el cálculo del límite de Detección y Cuantificación128
Tabla N° 71 - Resultados del cálculo del límite de Detección y límite de Cuantificación129
Tabla N° 72 – Resultados del cálculo de la sensibilidad129
Tabla N° 73 - Resultados obtenidos en los ensayos para la determinación de Robustez131
Tabla N°74 - Resultado de la evaluación de la robustez131

ANEXO N° 4 ANALISIS ESTADISTICO DE NÍQUEL

Tabla N° 75 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Níquel realizado el 03/06/2013132
Tabla N° 76 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Níquel realizado el 04/06/2013133
Tabla N° 77 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Níquel realizado el 05/06/2013134
Tabla N° 78 - Resultados de la verificación de las Curvas de Calibrado de Níquel135
Tabla N° 79 - Determinación de Ni en Suelos136
Tabla N° 80 - Parámetros obtenidos de la Prueba de Grubbs de los datos de la tabla N° 79.138
Tabla N° 81 - Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Níquel.139
Tabla N° 82 - Prueba de Igualdad de Medias de Níquel.141
Tabla N° 83 - Resultados de los ensayos de Recuperación realizado en tres niveles143
Tabla N° 84 - Resultados obtenidos para el cálculo de la precisión del Método145
Tabla N° 85 - Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas de las tablas N° 86, 87 y 88.145
Tabla N° 86 - Curva de Calibración Ni Día 03/06/2013146
Tabla N° 87 - Curva de Calibración Ni Día 04/06/2013146
Tabla N° 88 - Curva de Calibración Ni Día 05/06/2013147
Tabla N° 89 – Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas evaluadas en conjunto149

Tabla N° 90 - Resultados de las lecturas de los patrones de concentración baja para el cálculo del límite de Detección y Cuantificación150
Tabla N° 91 - Resultados del cálculo del límite de Detección y límite de Cuantificación152
Tabla N° 92 – Resultados del cálculo de la sensibilidad152
Tabla N° 93 - Resultados obtenidos en los ensayos para la determinación de Robustez153
Tabla N° 94 - Resultado de la evaluación de la robustez153

ANEXO N° 2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CROMO

Figura N° 13 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 3588
Figura N° 14 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 3689
Figura N° 15 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 3790
Figura N° 16 - Resultado de la Prueba de Normalidad por Anderson Darling de los datos de la tabla N° 3993
Figura N° 17 - Resultado de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos de la tabla N° 3996
Figura N° 18 - Resultado de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos de la tabla N° 3998
Figura N° 19 - Diagrama de Caja de la Prueba de t de Student100
Figura N° 20 - Curva de Calibrado General104
Figura N° 21 - Curva de Calibrado Absorbancia vs. Concentración para el cálculo del límite de detección y Cuantificación107
Figura N° 22 - Curva de Calibrado Desviación estándar vs. Concentración para el cálculo del límite de detección y Cuantificación107

ANEXO N° 3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE MANGANESO

Figura N° 23 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 55110
Figura N° 24 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 56111

Figura N° 25 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 57112
Figura N° 26 - Resultado de la Prueba de Normalidad por Anderson Darling de los datos de la tabla N° 59115
Figura N° 27 - Resultado de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos de la tabla N° 59118
Figura N° 28 - Resultado de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos de la tabla N° 59120
Figura N° 29 - Diagrama de Caja de la Prueba de t de Student122
Figura N° 30 - Curva de Calibrado General126
Figura N° 31 - Curva de Calibrado Absorbancia vs. Concentración para el cálculo del límite de detección y Cuantificación129
Figura N° 32 - Curva de Calibrado Desviación estándar vs. Concentración para el cálculo del límite de detección y Cuantificación129

ANEXO N° 4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE NIQUEL

Figura N° 33 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N°75132
Figura N° 34 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 76133
Figura N° 35 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 77134
Figura N° 36 - Resultado de la Prueba de Normalidad por Anderson Darling de los datos de la tabla N° 79137
Figura N° 37 - Resultado de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos de la tabla N° 79140

Figura N° 38 - Resultado de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos de la tabla N° 79142
Figura N° 39 - Diagrama de Caja de la Prueba de t de Student144
Figura N° 40 - Curva de Calibrado General148
Figura N° 41 - Curva de Calibrado Absorbancia vs. Concentración para el cálculo del límite de detección y Cuantificación151
Figura N° 42 - Curva de Calibrado Desviación estándar vs. Concentración para el cálculo del límite de detección y Cuantificación151

ANEXO N° 7 PROTOCOLO DE MONITOREO DE SUELOS

Figura N° 43 - Cuadrículas de muestreo de Suelos163
--------------------------------------------------	----------

INTRODUCCIÓN

Cada día se realizan millones de mediciones analíticas en miles de laboratorios a nivel mundial, existiendo innumerables razones para realizar estas mediciones; tales como por ejemplo: controlar la calidad del agua potable, efluentes, análisis forenses, para determinar la calidad de los alimentos, incluso mediciones al nivel de investigación, etc.⁶

Recordemos que muchas de las decisiones que se toman están basadas en los datos que se emiten de un método analítico, de aquí destaca la importancia de que los laboratorios demuestren que sus métodos analíticos proporcionan resultados confiables. Mediante estudios sistemáticos de laboratorio y demostrativos, un método de análisis es lo suficientemente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos. (Velandia Castellanos 2008).⁵

La contaminación de suelos y lodos por medio de los metales pesados, son objeto de gran atención a nivel mundial. Ya que dichos metales pesados son los contaminantes más peligrosos del medio ambiente porque no se degradan biológicamente ni químicamente, causando daños severos a la flora y fauna, ya que son transferidos a través de la cadena trófica, que posteriormente dan la posibilidad de ser ingeridos por el ser humano.

En los últimos años se ha producido un rápido aumento del nivel de plomo en el ambiente como consecuencia de las diversas actividades

antropogénica tales como la fundición, la minería, la fabricación de pinturas, la combustión de gasolinas y el reciclaje. (Robles Gutiérrez 2008).²⁴

El presente trabajo enfoca el procedimiento seleccionado para la determinación de Cobre (Cu), Cromo (Cr), Manganeso (Mn), Níquel (Ni), en muestras de suelos y lodos, teniendo como propósito obtener pruebas documentadas que demuestren que dicho método es suficientemente confiable para producir resultados previstos dentro de intervalos definidos.

La validación de métodos es un requisito importante en la práctica del análisis químico, sin embargo, parece ser pobre entre los químicos analíticos la conciencia sobre su importancia, sobre por qué y cuándo efectuarla y acerca de qué acciones supone con exactitud.

La literatura especializada proporciona mucha información sobre la validación de métodos, especialmente con respecto a métodos específicos; sin embargo, con mucha frecuencia dicha información se subutiliza. Algunos analistas conciben la validación de métodos como algo que solo puede hacerse mediante la colaboración con otros laboratorios y, por lo tanto, no la llevan a cabo. Cada día se realizan millones de mediciones analíticas en miles de laboratorios alrededor del mundo. Existen innumerables razones para realizar estas mediciones; por ejemplo: para verificar la calidad del agua destinada al consumo humano; para realizar análisis forenses de fluidos corporales como parte de investigaciones criminales, para demostrar que un alimento es adecuado para su consumo, etc. Por lo tanto la validación es un requerimiento importante en la implementación de métodos de ensayo, pues define los parámetros de control con base en los cuales dicho método debe ser aplicado.⁶

I.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.- ANTECEDENTES

Como vemos las necesidades de cada laboratorio son distintas y las condiciones de la misma manera razón por la cual se presentan varias validaciones en las diferentes matrices de muestra:

En el año de 1995 el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) llegan a realizar la Determinación de mercurio en orina, método del vapor frío con cloruro de estaño por espectroscopia de absorción atómica

Años más adelante en 2007 la investigadora Silvia Trejos Paulina llega a la Validación de metodología para determinación cuantitativa de plomo en tintes cosméticos disponibles en el mercado nacional por espectroscopia de absorción atómica con llama.

En Chile sale al conocimiento de todos los analistas dos artículos interesantes como son Implementación del Sistema para la Validación de los Métodos de Análisis y Mediciones de Laboratorio en Suelos y Lodos, y el segundo artículo es Protocolo de Métodos de Análisis para Suelos y Lodos, ejecutado por la Universidad de Concepción Facultad de Agronomía Chillan, siendo los gestores Erick Zagal, Angélica Sadzawka,

De la misma manera se efectúa la Validación de metodología para determinación cuantitativa de arsénico en aguas potables por generación de hidruros, Silvia Trejos Paulina en 2008

Un grupo de investigadores en el 2008 ven la necesidad de Validación del método analítico para la cuantificación de alcaloides quinolinicos del extracto de Galipea longiflora Krause Kallunki, siendo estos investigadores Vania Herrera, Juan Carlos Ticona, Enrique Udaeta, Rogelio Chuqui y Alberto Giménez,

La sangre con infinidad de analitos, en el año 2009 Raibel Suarez, Evelia Arevalo, Ledy Linares obtienen la Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario.

En 2009 Leonora de Lemos Medina termina el Desarrollo y validación de un método de calibración de analizadores de gases para vehículos con motores de encendido por chispa.

En el mismo año Ximena Chamorro Bolaños, Gloria Rodríguez Martínez, Alba Lucy Enríquez Brand, Milton Rosero Moreano Montaje y validación del método de análisis por combustión y detección por infrarrojo no dispersivo para determinación de carbono orgánico total en agua.

En este año 2010 Erika Valverde Montero Validación de la metodología de cuantificación del magnesio por espectroscopia de absorción atómica de llama en la canasta básica de Costa Rica.

Como vemos esta cronología breve constituye un marco de referencia para continuar con investigaciones y validaciones de métodos acorde a las necesidades de un laboratorio bajo sus propias condiciones.

1.2.- FORMULACION DEL PROBLEMA

La necesidad de análisis de cada laboratorio es distinta, por ello la validación es un paso esencial a realizar, de tal manera obtener una estadística confiable, reproducible, con resultados satisfactorios.

Existe poca información de análisis de metales en suelos (Guía Eurachem 1999), razón por la cual nos vemos encaminamos en la validación de métodos de ensayo en esta matriz, por ello la validación de plomo, cromo y bario en suelos puede constituirse una alternativa de análisis en los laboratorios, esto es lo que pretendemos demostrar, para obtener resultados satisfactorios, confiables y reproducibles.

1.3.- JUSTIFICACION DEL PROBLEMA

La alta contaminación de estos últimos años por los metales pesados, los laboratorios se han visto en la necesidad de implementar y/o validar un método de ensayo.

La validación de métodos es un requisito importante en la práctica del análisis químico. (Guía Eurachem 1999)

A ello hay que añadir la necesidad de mejorar la sensibilidad y el límite de detección de un método como Absorción atómica, en la cuantificación de metales traza

4.1.- OBJETIVOS

4.1.1.- OBJETIVOS GENERAL

Aplicar cada uno de los parámetros analíticos utilizados para la validación de un método.

4.1.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

Presentar al químico analista una guía práctica y concreta para encarar una validación analítica.

Asegurar que el método de ensayo sea idóneo para la determinación de cobre, cromo, manganeso y níquel en muestras de suelos.

II.- MARCO TEORICO

2.1.- Espectroscopia de Absorción Atómica

La absorción atómica es el proceso que ocurre cuando un átomo libre en estado fundamental absorbe energía radiante a una longitud de onda específica, pasando a un estado excitado, esta propiedad del átomo es utilizada en la espectroscopia de absorción atómica. La Espectroscopia por Absorción Atómica es un método analítico utilizado para el análisis de metales y algunos no metales. Este método utiliza fuentes de radiación que presentan valores de longitud de onda que se encuentran en el rango Ultravioleta - Visible. Es un método analítico rápido, selectivo y altamente sensible, que permite realizar análisis a concentraciones de ppm (mg/L) y ppb (ug/L). Las muestras que se analizan en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica deben de encontrarse en solución (Acuosa o en un solvente orgánico). El proceso característico del método es "Atomización", proceso en el cual el elemento bajo estudio pasa de su forma molecular o asociada, a un "átomo gaseoso libre y en el estado fundamental". La sensibilidad, la precisión y exactitud del método dependen de esta etapa.

El proceso de absorción atómica está ilustrado en la **Figura N°1** cuando la radiación de una cierta longitud de onda y potencia inicial P_0 , llega a la "celda atómica de absorción" de camino óptico "b" cm. y concentración de átomos "C", se produce una atenuación de la radiación a causa de la interacción entre los fotones y los átomos absorbentes presentes. Luego la radiación atenuada es dirigida sobre el detector donde se mide la potencia disminuida, P. La cantidad de radiación absorbida se determina al comparar P con P_0 . La cantidad de radiación absorbida a la longitud de onda del

analito se incrementa conforme el número de átomos en el paso de luz se incrementa y es proporcional a la concentración de átomos absorbentes.

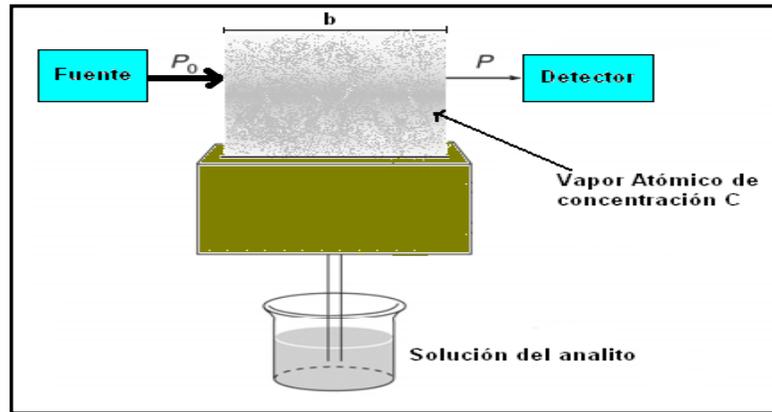


Figura N°1 – Esquema del proceso de absorción atómica

Es el término más conveniente para caracterizar la absorción de radiación en la espectrofotometría de absorción es la absorbancia, ya que esta cantidad guarda una relación lineal con la concentración. La ley de Beer define esta relación:

$$A = abc \quad (1)$$

En donde “a” es una constante de proporcionalidad denominado coeficiente de absorción que es característica de la especie que absorbe para una determinada longitud de onda, sus unidades depende de b y c. “b” es la longitud del paso de la radiación, determinado por la celda de absorción a menudo expresada en cm. y “c” es la concentración de las especies absorbentes en la celda de absorción. Esta ecuación simplemente establece que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes en la celda de absorción para unas condiciones instrumentales dadas.

Esta conducta, de proporcionalidad directa entre absorbancia y concentración, es observada en absorción atómica. Cuando la absorbancia de soluciones patrón se miden y grafican los resultados de las absorbancias con respecto a sus concentraciones, se establece una relación de calibración similar a la figura 2. En la región en la cual se observa la relación de la Ley de Beer, la calibración produce una línea recta. Conforme se incrementan la concentración produce una desviación en el desarrollo de la línea recta, como se muestra en la figura 3 para el caso particular del níquel.

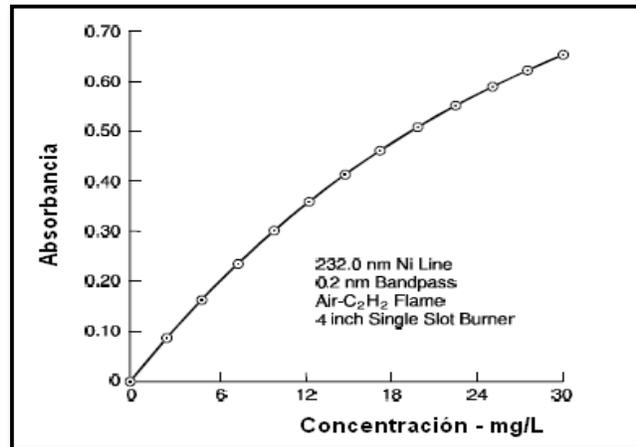


Figura N°2 – Absorbancia vs. Concentración del Níquel

2.2 Validación de Métodos Analíticos

A.- Concepto

Hoy en día los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para su finalidad y propósito perseguido ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos datos proporcionan. La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables. La validación de métodos es un proceso mediante el cual se definen requisitos analíticos, que aseguran que el método de ensayo bajo ciertas consideraciones ha desarrollado capacidades consistentes con la aplicación requerida.⁷ En términos generales la validación es la obtención de pruebas, convenientemente documentadas que demuestran que un método de ensayo es lo suficientemente confiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos.⁶

B.- Importancia

La validación de un método analítico es necesaria porque proporciona un alto grado de confianza, seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados, además permite un conocimiento profundo del método, así como de sus características de funcionamiento. Este conocimiento y seguridad en el método analítico que han sido validado, se traduce en: Disminución en el número de fallas y repeticiones, con el consiguiente ahorro de los costos asociados, y consecuentemente cumplir con los plazos previstos de análisis

C.- ¿Cuándo deben validarse los Métodos analíticos?

Un método de ensayo se valida cuando es necesario verificar que los parámetros ejecutados son los adecuados para resolver un problema analítico en particular. El laboratorio debe validar:

- El desarrollo de un nuevo método para un problema específico.
- La revisión de un método ya establecido con el fin de incorporar mejoras en el o con el objetivo de ampliarlo para un nuevo problema.
- Cuando el método ya establecido sea usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o instrumentos.
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos; por ejemplo un método nuevo y el normalizado.

- Cuando el control de calidad indique que un método ya establecido está cambiando con el tiempo.

El grado de validación o revalidación requerido dependerá de la naturaleza de los cambios realizados al aplicar un método en diferentes laboratorios, con diferentes instrumentos y analistas, así como de las circunstancias en las que se va a utilizar el método. Siempre resulta apropiado contar con algún grado de validación, incluso cuando se utilicen métodos aparentemente bien definidos, normalizados o publicados.

2.3.- Parámetros de Validación de un Método ^{6,4,8}

A continuación se hace una breve descripción de los parámetros que permiten evaluar el rendimiento de un método y se hace una indicación de qué se puede analizar para evaluar cada parámetro:

A. Veracidad

La veracidad es el grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor aceptado como verdadero, la veracidad se expresa cuantitativamente en términos de “sesgo”, cuanto más pequeño sea el sesgo, mayor será la veracidad.⁷ En la figura 14 se muestran dos componentes del sesgo: componente del método y componente del laboratorio, el sesgo del método surge de errores sistemáticos inherentes a él, cualquiera sea el laboratorio que lo use.

El sesgo del laboratorio surge de errores sistemáticos adicionales característicos del laboratorio y de su interpretación del método. De manera aislada, un laboratorio solo puede estimar el sesgo combinado, sin embargo, al controlar el sesgo, es importante tener conciencia de las convenciones vigentes para el propósito en cuestión. Por ejemplo, en muchas regulaciones sobre alimentos los límites de regulación se fijan en función de los resultados obtenidos mediante el método normalizado. Por lo tanto, el sesgo que surge exclusivamente del método específico queda compensado y la preocupación principal es la comparabilidad con otros laboratorios que usan el mismo método, el sesgo general determinado por un laboratorio específico durante la validación debe ser comparado luego con cualquier otro sesgo reportado para el método de regulación.¹¹

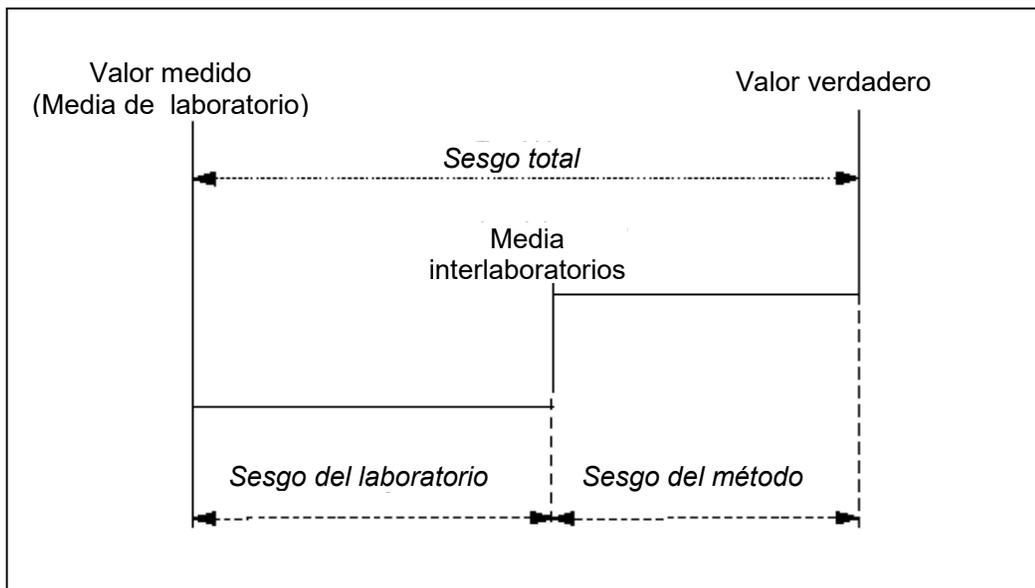


Figura N° 13 - Tipos de sesgo: Aquí se muestra que el sesgo del laboratorio y el sesgo del método actúan en la misma dirección. Este no es siempre el caso en la realidad.

Con el objeto de evaluar la veracidad de un método los laboratorios dependen de normas aceptadas, tales como, analizar materiales de referencia certificados u otro material de referencia, analizar muestras fortificadas, comparando con un método estándar de referencia o de validado, o a través de pruebas de interlaboratorio. En cualquiera de los casos anteriores se comprometen los laboratorios, los analistas y los instrumentos en lograr minimizar los errores.

Determinación de la Veracidad con Materiales de Referencia Certificados

Para verificar la conformidad mediante un material de referencia, se debe determinar la media y la desviación estándar de una serie de ensayos replicados y compararlos con el valor caracterizado de dicho material.

El material de referencia ideal debe ser certificado, de matriz natural lo mas similar posible a las muestras de interés, por supuesto, la disponibilidad de tales materiales es limitada. Si no se dispone de un material de referencia certificado, se puede utilizar otros materiales de referencia o un material preparado en el laboratorio (material interno) conteniendo una cantidad conocida del analito; el contenido del analito en los materiales-control interno debe ser investigado cuidadosamente, preferiblemente utilizando dos o más métodos analíticos basados en diferentes principios fisicoquímicos y, si es posible, basados en determinaciones efectuadas en diferentes laboratorios. Un material de referencia certificado o un material-control interno debe tener una concentración de analito similar al nivel de concentración en las muestras auténticas. Los materiales de referencia certificados y otros materiales de control ofrecen un estimado de la ejecución del método sólo para el rango estudiado. El análisis de materiales de referencia es de muy poco valor si el

mismo corresponde a un nivel de concentración diferente del analito; por ejemplo, no es posible ensayar la veracidad de un método en el rango de 0,1 µg/kg a 0,1 mg/kg utilizando un material de referencia que contiene una concentración del analito de 1 mg/kg.

También debe presentarse la atención al hecho de que los materiales de referencia certificados y otros materiales de control no siempre son materiales típicos. Comparados con muestras auténticas ellos son más fáciles de manipular, por ejemplo al extraer o incinerar, ellos son más homogéneos que las muestras ordinarias, esto puede significar que los resultados obtenidos de materiales de referencia sean generalmente “mejores” que aquellos obtenidos de las muestras desconocidas, resultando una falsa seguridad respecto a los resultados.

No es, por tanto, recomendable utilizar, ciegamente y sin criticismo, resultados obtenidos de un material de referencia como evidencia de que el análisis de una muestra desconocida tenga la misma veracidad. Respecto a todo lo anteriormente dicho, el análisis de un material de referencia certificado, por si sólo, no comprueba la veracidad de un método analítico, éste debe ser completado con otros criterios de calidad, tales como ensayos de recuperación por ejemplo.

Determinación de la Veracidad con Ensayos de Recuperación

En ausencia de materiales de referencia, o para completar estudios de material de referencia, la veracidad se puede investigar por adición (spiking) y recuperación; es decir una cantidad conocida del analito se añade a la porción de ensayo de una muestra que tiene una concentración conocida del mismo, esta muestra fortificada se analiza junto y bajo el mismo

procedimiento que la muestra original sin analito añadido, y luego se verifica si la cantidad determinada, restada la cantidad de la muestra no fortificada, coincide a la cantidad adicionada. La fortificación de muestras es, al mismo tiempo, un proceso delicado ya que se puede alterar la composición real que presentan. Al efectuar esta operación hay que tener en cuenta:

- Adicionar la menor cantidad posible (empleo de soluciones concentradas o incluso en estado sólido) para alterar lo menos posible la matriz natural.
- Añadir una cantidad que se distinga significativamente de la que tiene de forma natural la muestra, por lo general en el rango en el que se encuentra el analito normalmente en la muestra; pero sin que la suma de ambas cantidades supere la máxima cantidad cuantificable según la recta de calibrado, si el método se utiliza en varios niveles de concentración, se deben realizar ensayos de recuperación en, al menos dos niveles.
- La diferencia entre el comportamiento del analito añadido y el nativo; puede corregirse si se deja pasar un tiempo entre la adición del analito y el análisis de la muestra

La técnica puede ser utilizada para todos los analitos, especialmente para aquellos que son inestables y con la mayoría de las matrices, si está el analito disponible en el laboratorio como un compuesto sintético estable. La mayor limitación consiste en que puede haber una diferencia en la forma química entre el analito presente en la muestra auténtica y el compuesto

sintético añadido. Otro problema inherente a esto es que el analito introducido de esta manera probablemente no se enlazará tan fuertemente como el que está presente de manera natural en la matriz y, por tanto, la técnica dará una impresión irrealmente elevada de la eficiencia del método. Los estudios de Adición/recuperación están fuertemente sujetos a la siguiente regla: aunque una buena recuperación no constituye una garantía de veracidad, una recuperación pobre indica claramente una falta de veracidad.

Determinación de la Veracidad por comparación con un Método Estándar de Referencia

Si existe un método Estándar de Referencia, la misma muestra debe ser analizada utilizando este método y el método a validar; comparando luego los resultados. Si el método estándar no es un método de uso rutinario en el laboratorio, no se justifica introducir el mismo sólo para evaluar un nuevo método. En tales casos se recomienda enviar la muestra a un laboratorio con reconocida competencia respecto al método estándar de referencia, preferiblemente a un laboratorio acreditado.

Determinación de la Veracidad a través de Ensayos de aptitud

La veracidad del método también se puede determinar utilizando el método cuando participa en un ensayo de aptitud, incluyendo las muestras correspondientes para las cuales el método candidato se propone.

B. Precisión

Grado de coincidencia existente entre los resultados independientes de un ensayo, obtenidos en condiciones estipuladas. La precisión depende sólo de la distribución de errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero, por “resultados independiente de un ensayo” se entiende los resultados obtenidos de una manera que no está influenciada por ningún resultado previo relativo al mismo objeto u objetos similares. La precisión es una característica importante en la evaluación de todos los métodos cuantitativos; la precisión de un método depende mucho de las condiciones bajo las cuales ha sido estimada. Las condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad representan evidentemente condiciones diferentes y extremas, mientras que la precisión intermedia cae dentro de estos dos extremos.¹⁰

Una estimación de la repetibilidad de un método se obtiene cuando los resultados analíticos provienen de idénticas porciones de ensayo, en el mismo laboratorio, obtenidos por el mismo analista, el mismo equipo y dentro de un corto intervalo de tiempo.

La reproducibilidad de un método puede estimarse sobre la base de resultados obtenidos cuando el método se ha utilizado para analizar idénticas porciones de ensayo en diferentes laboratorios empleando diferentes equipos en intervalos de tiempo largos.

Se entiende por precisión intermedia la concordancia de resultados cuando los análisis se llevan a cabo en el mismo laboratorio, utilizando el mismo método, pero ejecutados en diferentes momentos por diferentes

analistas empleando, por ejemplo, diferentes lotes de reactivos, en algunos casos diferentes equipos.

Es importante documentar exactamente cómo y sobre qué materiales se han estimado la repetibilidad y la precisión intermedia: materiales de referencia, materiales de control, muestras auténticas, soluciones sintéticas, etc. En los casos donde el método bajo estudio se pretenda utilizar en un amplio rango de concentración, la precisión debe estimarse en varios niveles de concentración, por ejemplo, a nivel bajo, medio y alto; ya que la precisión depende mucho de la concentración del analito. La precisión generalmente se define en términos de desviación estándar (s) o desviación estándar relativa (RSD); La desviación estándar relativa puede ser más útil en este caso porque la concentración ha sido factorizada y de esa manera permanece en gran medida constante en todo el rango de interés, siempre que este no sea muy amplio. A partir de la desviación estándar de repetibilidad S_r resulta útil calcular el "límite de repetibilidad" r , que permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre los análisis duplicados de una muestra, determinados bajo condiciones de repetibilidad.

En la siguiente tabla se muestran los valores típicos de RSD aceptables para la repetibilidad, basadas en las concentraciones del analito (Pure & Applied Chem. 62, 1990 149-162)

**Tabla N°1 - Desviaciones Estándares Relativas aceptables
recomendadas para la repetibilidad a diferentes concentraciones del
analito**

Concentración del analito	RSD (%)
10 g/100g	2
1 g/100g	3
0,1 g/100g	4
100 mg/kg	5
10 mg/kg	7
1 mg/kg	11
100 µg/kg	15
10 µg/kg	21
1 µg/kg	30
0,1 µg/kg	43

C. Selectividad / Especificidad

En general, puede decirse que los métodos analíticos consisten en una etapa de medición que puede estar precedida o no por una etapa de aislamiento. Es necesario establecer que la señal producida en la etapa de medición u otra propiedad medida que pueda ser atribuida al analito se deba únicamente a la presencia del analito y no a la presencia de algo similar desde el punto de vista químico o físico, o bien a la coincidencia, esta es una confirmación de la identidad. ¹⁰

El que otros compuestos interfieran o no con la medición del analito dependerá de la eficacia de la etapa de aislamiento y de la selectividad/especificidad de la etapa de medición. La selectividad y la especificidad son medidas que evalúan la confiabilidad de las mediciones ante la presencia de interferencias, es decir, son parámetros que miden la capacidad del método para determinar el analito de interés en presencia de otros componentes (matriz compleja), bajo las condiciones establecidas en el método de ensayo. La especificidad por lo general se considera como un 100% de selectividad, pero no existe un acuerdo universal al respecto. Las interferencias pueden disminuir o aumentar la señal atribuida al analito.

Estos parámetros no requieren mayor validación cuando se utilizan procedimientos normalizados para una matriz específica, puesto que el trabajo ya lo han adelantado quienes desarrollaron y validaron el método. En estos casos se deben tener muy en cuenta las especificaciones sobre posibles interferencias y la manera de suprimirlas, si existen. Sin embargo, el laboratorio debe considerar el estudio de las interferencias en la validación si las matrices de las muestras que analiza son muy variadas y si en alguna de

ellas los interferentes se encuentran en niveles muy altos que pueden no ser suprimidos por los procesos recomendados. Este sería un caso de ampliación del alcance del método para nuevas matrices. La Selectividad / Especificidad de un método se investiga en función al tipo de muestra a analizar, la técnica utilizada, la información bibliográfica, etc. Generalmente se estudia la capacidad para medir el analito de interés en porciones de ensayo en las que, de manera deliberada, se han introducido determinadas interferencias (aquellas que, según se cree, tienen mayor probabilidad de estar presentes en las muestras).

Cuando no queda claro si existen interferencias o no, se puede investigar la capacidad para medir al analito en comparación con otros métodos o técnicas independientes. En general para evaluar la Selectividad / Especificidad de un método se tiene diferentes criterios expuestos a continuación:

Comparación del comportamiento de muestra con respecto al comportamiento del estándar.

Se prepara una solución estándar del analito a la concentración esperada en el procedimiento de ensayo y una solución de muestra a la misma concentración. Se lleva a cabo una comparación de las mediciones de ambas soluciones. La muestra no debe presentar ningún tipo de señal que interfiera con la señal que se encuentra para el estándar.

Comparación del comportamiento de muestras enriquecidas con analito con respecto al comportamiento de estándar enriquecido con analito.

Se prepara una solución estándar del analito a la concentración esperada en el procedimiento de ensayo, y una solución de muestra a la misma concentración. Ambas soluciones son enriquecidas con una cantidad equivalente de analito. Se lleva a cabo una comparación de las mediciones de ambas soluciones enriquecidas. El criterio de aceptación es que el comportamiento de las muestras enriquecidas y del patrón enriquecido, debe ser lo más cercano posible, en aquel punto en que se lleva a cabo la medición del analito. Lo cual es indicativo de que la matriz, no aporta ningún tipo de señal que interfiera con la medición. Algunos autores recomiendan enriquecer tanto las muestras como el patrón con cinco niveles de concentración del analito, y llevar a cabo la comparación del comportamiento de las soluciones a los diferentes niveles. Esto permitiría determinar el grado de interferencia, dependiendo de la concentración del analito a determinar. Estos datos pueden obtenerse del estudio de linealidad del método utilizando la adición estándar.

Comparación del comportamiento de un blanco de matriz natural o sintético enriquecida con analito con respecto al comportamiento de una muestra enriquecida con analito.

Se prepara una solución de matriz natural (muestra analizada que no contenga analito) o una matriz sintética, si es posible, y una solución de muestra. Ambas soluciones son enriquecidas con una cantidad conocida de analito.

Se lleva a cabo una comparación de las mediciones de ambas soluciones; se debe comprobar que no están interferencias con el analito de ningún otro compuesto presente en la muestra, productos de degradación, metabolitos o aditivos conocidos.

Comparación del comportamiento del blanco de matriz con respecto al comportamiento del estándar.

Se prepara una solución estándar del analito a la concentración esperada en el procedimiento de ensayo, y una solución de matriz a la misma concentración relativa. Se lleva a cabo una comparación de las mediciones de ambas soluciones. La matriz no debe presentar ningún tipo de señal que interfiera con la señal que se encuentra para el estándar.

D. Rango de Trabajo y Linealidad

Para todo método cuantitativo, es necesario determinar el rango de concentraciones del analito o de valores de la propiedad dentro del cual se puede aplicar el método. Nótese que esto hace referencia al rango de concentraciones o valores en las soluciones efectivamente medidas y no en las muestras originales. Todos los métodos tienen una sensibilidad limitada que restringe el rango de concentración para lo cual el método es aplicable; en el extremo inferior del rango de concentraciones, los factores limitantes son los valores de los límites de detección y/o cuantificación. En el extremo superior del rango de concentraciones las limitaciones provendrán de diferentes efectos, lo cual dependerá del sistema de respuesta de los instrumentos., por ejemplo los métodos espectrofotométricos usualmente tienen un rango lineal de trabajo hasta una cierta concentración; a concentraciones superiores, la curva se inclina hacia el eje de las concentraciones.

La linealidad se define como la capacidad del método para obtener resultados de ensayos proporcionales a la concentración del analito con el valor de la propiedad. Por inferencia, el rango lineal es el rango de concentraciones del analito a lo largo del cual el método da, en el ensayo, resultados proporcionales a la concentración del analito⁷. Dentro del rango de trabajo puede existir un rango de respuesta lineal; se puede establecer la magnitud de este rango durante la evaluación del rango de trabajo. La linealidad es determinada por la medición de las respuestas (y) de una serie de patrones de concentración conocida (x) dentro del rango de interés; se necesita por lo menos cinco o seis concentraciones más el blanco, se establece el mejor ajuste de la recta de regresión, determinado la pendiente y el intercepto. Para verificar la linealidad se cuenta con los siguientes criterios:

- **Calculo del coeficiente de correlación (r);** es un parámetro cualitativo, adimensional, que nos da una idea primaria sobre la bondad del modelo lineal; mide “el grado de linealidad”, o “porcentaje de la variación en y que puede explicarse por variación en x”. En la práctica analítica, las gráficas de calibración proporcionan frecuentemente valores numéricos de $r > 0,99$. Este se determina:

$$r = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[n\sum X^2 - (\sum X)^2][n\sum Y^2 - (\sum Y)^2]}} \quad (6)$$

- **Cálculo de la desviación estándar del residual ($s_{y/x}$);** mide la calidad del ajuste a diferencia de r, es un parámetro cuantitativo expresado en las unidades de y; en general cuanto más pequeño es el valor de éste mejor será el ajuste lineal. Se determina:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{(n-2)}} \quad (7)$$

- **Cálculo del Análisis de Varianza (ANOVA)**; en aquellos casos donde se requiera una herramienta estadística más rigurosa para asegurar la validez de la recta de calibrado, se puede utilizar el análisis de la varianza, desde un punto de vista práctico, la principal desventaja de la utilización del ANOVA para comprobar la validez de una recta de calibrado es que ésta requiere replicados de cada punto experimental (2 como mínimo), por lo que el trabajo y el tiempo de análisis se puede alargar considerablemente.

E. Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Cuando las mediciones se realizan en niveles bajos del analito por ejemplo, en el análisis de trazas, es importante saber cuál es la mínima concentración del analito que se pueden detectar confiablemente mediante el método. La importancia de determinar esto y los problemas asociados surgen del hecho de que la probabilidad de detección no cambia repentinamente de cero a la unidad cuando se cruza algún límite. Los problemas se han investigado estadísticamente con cierto detalle y se han propuesto varios criterios de decisión. Se crea confusión adicional porque actualmente no existe un acuerdo universal sobre la terminología aplicable.

El límite de detección (LD) se puede definir como “la mínima concentración de analito que se puede detectar en una muestra, pero no

necesariamente cuantificar bajo las condiciones estipuladas para el ensayo" [AOAC-PVMC]. "El límite de detección expresado como la concentración C_L o la cantidad Q_L que se obtiene de la más pequeña medida Y_{LD} que se puede detectar con certeza razonable en un procedimiento analítico específico. El valor de Y_{LD} se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$Y_{LD} = Y_{Bk} + kS_{Bk} \quad (8)$$

Donde Y_{Bk} es la media de las medidas de blancos, S_{Bk} es la desviación estándar de las medidas de blancos y k es un factor numérico escogido de acuerdo con el nivel de confianza deseado". [IUPAC Compendium of Chemical Technology, 1985]. Recomendaciones de organismos públicos sugieren un valor de $K=3$.

Pese a la aparente simplicidad de la idea, el tema del límite de detección topa con los problemas que señalamos a continuación:

- Existen varias aproximaciones conceptuales posibles al tema, cada una de las cuales ofrece una definición del límite diferente. Los intentos de clarificar esta cuestión no han hecho sino aumentar la confusión.
- Aunque cada aproximación depende de una fidelidad estimada a una concentración igual o próxima a cero, no está claro si debe tomarse en condiciones de repetibilidad o en otras condiciones para la estimación.

- A menos que se recabe una enorme cantidad de datos, las estimaciones del límite de detección están sujetas a una variación aleatoria bastante grande.
- Las estimaciones del límite de detección suelen estar sesgadas por la parte inferior a causa de los factores operativos.

En términos prácticos para la validación de métodos, parece mejor optar por una definición simple que permita realizar rápidamente una estimación, que sólo se utilizará como indicador sobre la utilidad del método. Sin embargo, debe admitirse que, tal como se estima en el desarrollo de métodos, el límite de detección puede no ser idéntico como concepto o como valor numérico al que se utiliza para caracterizar un método analítico completo. Por ejemplo, el "límite de detección instrumental", tal como se denomina en la literatura o en los manuales de los instrumentos, y que seguidamente se ajusta para la dilución, suele ser más pequeño que el límite de detección "práctico" y es inadecuado para la validación de métodos. Por tanto, se recomienda que para la validación de métodos la estimación de la fidelidad utilizada S_{Bk} se base en al menos 6 determinaciones independientes completas de la concentración del analito en una matriz blanca típica o un material de bajo nivel, sin censurar los resultados iguales a cero o negativos, y que el límite de detección aproximado se calcule como $3S_{Bk}$.

El "límite de cuantificación" (LC) es estrictamente la mínima concentración del analito que se puede determinar con un nivel aceptable de precisión (repetibilidad) y exactitud bajo las condiciones estipuladas para el ensayo" [NATA Tech Note N°13]. De igual manera, varias convenciones lo

definen como la concentración del analito correspondiente a una señal (Y_{LC}) al valor del blanco (Y_{BK}) más 5, 6 ó 10 desviaciones estándar de la media de blancos (S_{BK}). También se le conoce algunas veces como límite de determinación. El LC es un valor indicativo y normalmente no debe usarse para tomar decisiones.

$$Y_{LC} = Y_{BK} + 10S_{BK} \quad (9)$$

F. Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad del analito que puede producir un resultado significativo. Para el rango lineal de un método se debe diferenciar claramente entre dos tipos de sensibilidad:

- *Sensibilidad de calibración.*- corresponde a la pendiente de la curva de calibrado.
- *Sensibilidad analítica.*- correspondiente al cociente entre la sensibilidad de calibración y la desviación estándar de la medida

Resulta claro que la misma técnica empleada para diferentes matrices, pueden tener la misma sensibilidad de calibración, pero diferente sensibilidad analítica, debida a factores propios como necesidad de extracción, concentración, etc. Dado que suele ser un parámetro arbitrario, en función de la configuración de los instrumentos, no es útil en la validación;

aunque puede serlo en los procedimientos de garantía de calidad para demostrar si un instrumento funciona de acuerdo con un estándar constante y satisfactorio. En el caso específico de absorción atómica; se le expresa en términos de la concentración del elemento, requerida para producir una absorción de 1% (correspondiente al valor más pequeño que se puede medir con exactitud), en términos de unidades de absorción, la sensibilidad viene a ser la concentración del elemento que de una absorbancia de 0,0044. Si las medidas son hechas en una región lineal. La sensibilidad (S) para la absorción atómica de un elemento, puede ser determinada, leyendo la absorbancia (A) producida por una concentración conocida del elemento (C_s) y resolviendo la ecuación de proporcionalidad para la concentración que produciría una absorbancia de 0,0044, como se muestra a continuación:

$$\frac{C_s}{A_s} = \frac{S}{0,0044} \longrightarrow S = \frac{C_s \times 0,0044}{A_s} \quad (10)$$

Los valores de sensibilidad para determinadas condiciones instrumentales, son generalmente dados por el equipo. El conocimiento de la sensibilidad esperada, permite al analista determinar si las condiciones instrumentales están optimizadas y si el instrumento está leyendo de acuerdo a sus especificaciones, simplemente midiendo la absorbancia de una concentración conocida y comparando el resultado con el valor esperado.

Un valor conocido de sensibilidad también permite predecir el intervalo de absorbancias que será observada por un rango conocido de concentraciones, o determinar el rango de concentraciones que produciría niveles de absorbancia óptimos, simplemente utilizando las relaciones mostradas anteriormente.²²

G. Robustez

La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad de no verse afectado por pequeñas variaciones deliberadas en los parámetros del método y brinda una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

Una medida de la efectividad de un método analítico es qué tan bien responde su rendimiento ante una implementación menos que perfecta. En cualquier método, existirán ciertas etapas que, de no implementarse con suficiente cuidado, tendrán un efecto severo sobre el rendimiento del método y podrán inclusive generar que éste no funcione en lo absoluto.

Es necesario identificar estas etapas, generalmente como parte del desarrollo del método y, de ser posible, debe evaluarse su influencia en el rendimiento del método usando "ensayos de robustez", algunas veces también denominados "ensayos de solidez". Estos ensayos implican realizar variaciones deliberadas en el método e investigar el consiguiente efecto en el rendimiento. Así será posible identificar las variables del método que tengan el efecto más significativo y asegurarse de que, al usar el método, dichas variables estén firmemente controladas. Cuando exista la necesidad de mejorar el método, probablemente se podrá prestar atención a aquellas partes del método que se sabe que son críticas. Normalmente, la robustez se evalúa durante el desarrollo del método; generalmente, dicha evaluación la realiza el laboratorio de origen antes de colaborar con otros. Un método es más robusto entre menos dependen los resultados del ensayo de una modificación en las condiciones de éste, las variables que parecen más

frecuentemente ensayadas, y las cuales pueden resultar críticos en un método analítico son:

- La composición y estabilidad de la muestra (matriz)
- Lote de reactivos químicos.
- pH de la fase móvil (por ejemplo en HPLC).
- Tiempo de extracción.
- Gradiente de temperatura (Por ejemplo en GC).
- Velocidad de flujo.
- Volatilidad del analito.
- Estabilidad de las soluciones analíticas.
- Variación entre equipos.
- Variación del peso de muestra.
- Tiempo de exposición a temperaturas.
- Tiempo de reacción.
- Variación de alícuotas.
- Cambio de analista.

Conviene modificar dichas variables en un orden de magnitud acorde con las desviaciones habituales en el laboratorio. Para determinar la robustez de un método analítico se utiliza el procedimiento de Youden y

Steiner, que permite evaluar el efecto de siete variables con sólo ocho análisis de una muestra. En primer lugar hay que elegir estratégicamente estas variables. Se examina el método escrito y se identifican aquellas etapas que posiblemente pueden afectar a los resultados finales, además de aquellas otras variables “habituales” (concentración de reactivos, pH, temperatura, etc.). El valor (o cualidades cuando esto no es posible) de cada variable, propia del método, que podrían influir en los resultados si cambian ligeramente se representa con letra mayúscula (A, B,...,G) en tanto que sus valores (o cualidades) alternativas o modificadas corresponden a las letras minúsculas (a, b,...,g) y se diseñan ocho pruebas como, por ejemplo, muestra la tabla 2; los resultados encontrados se representan las letras “s” hasta la “z”. A partir de los resultados puede calcularse el efecto de cada una de las variables haciendo la media de los cuatro análisis que contienen la variable en su valor nominal (mayúsculas) y aquellas que corresponden al valor modificado (minúsculas). Así, para evaluar el efecto de la primera variable obsérvese que:

$$\frac{(s + t + u + v)}{4} = \frac{4A}{4} = A \quad (11)$$

$$\frac{(w + x + y + z)}{4} = \frac{4a}{4} = a \quad (12)$$

Es decir, la media de los resultados (s + t + u + v) equivalen a “A” porque las seis restantes variables presentes en estos cuatro resultados se anulan entre sí como consecuencia de que existen siempre dos mayúsculas y dos minúsculas de cada variable. Análogamente, la media de los resultados (w + x + y + z) equivalen a “a”. Al comparar estos dos valores medios conocemos la influencia de la variable en estudio (V_A) Para

cualquier otra variable se puede proceder de manera similar, tal como muestra la Tabla N°6.

Tabla N°2 – Test de Robustez de Youden para un método analítico

		ENSAYOS							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Valor de la variable	A, a	A	A	A	A	A	a	A	a
	B, b	B	B	b	b	B	B	B	b
	C, c	C	c	C	c	C	c	C	c
	D, d	D	D	d	d	D	d	D	D
	E, e	E	e	E	e	E	E	E	E
	F, f	F	f	f	F	F	f	F	F
	G, g	G	g	g	G	G	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	W	x	Y	z	

Estableciendo las siete comparaciones posibles (A-a,...G-g) puede conocerse el efecto de cada variable; cuanto mayor sea la diferencia (en valor absoluto), mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico. Si cualquiera de estas diferencias entre las medias de subgrupos

de cuatro (en valor absoluto) es mayor que $2,2 \times S$ (S es la desviación estándar del estudio de precisión) es indicación de que el método es sensible a los cambios de la variable involucrada. Estas variables recibirán especial atención al redactar el método, remarcando la necesidad de un estricto control para obtener resultados de calidad. Las variables a estudiar no deben ser necesariamente siete; puede considerarse un número menor de variables. Esto no afectará el balance del diseño del experimento siempre que se lleven a cabo los ocho ensayos indicados. Otro diseño similar al de Youden, utilizado para evaluar la robustez; es el de Plackett y Burman, cuya diferencia es que permite estudiar el efecto de “ n ” variables en “ $n+1$ ” ensayos. Según este diseño para decidir si una variable tiene influencia significativa sobre el resultado, se compara la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre esa variable y el producto de “ s ” (desviación estándar del estudio de precisión) y raíz de 2, así para la variable “ A ”

$$\text{Si } |V_A| > \sqrt{2} \times S \Rightarrow \text{Hay diferencia significativa}$$

$$|V_i| > 2.24 \times S \Rightarrow \text{Diferencia significativa}$$

III.- METODO

3.1 Equipos, materiales y reactivos:

A.- Equipos:

- Espectrofotómetro de Absorción atómica; modelo AA24OFS, marca AGILENT.
- Lámpara de Cátodo Hueco para determinar Cobre, Cromo, Manganeso, Níquel, Marca AGILENT.
- Balanza analítica modelo 290-9844S, marca PRECISA, 0.0001 mg
- Plancha eléctrica con regulador de temperatura
- Estufa modelo ED53/E2, marca BINDER.
- Campana Extractora.

B.- Materiales:

- Vasos precipitados 100 mL.
- Lunas de reloj, 7mm diámetro.
- Pipetas volumétricas calibradas de 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 25mL.
- Matraz aforado (fiola) calibrado de 100mL.

- Embudos de filtración.
- Papel filtro whatman N° 41 o equivalente.

C.- Reactivos:

- Ácido nítrico concentrado Q.P.
- Ácido clorhídrico. concentrado Q.P.
- Solución patrón de Cobre de 1000 mg/L
- Solución patrón de Cromo de 1000 mg/L
- Solución patrón de Manganeseo de 1000 mg/L
- Solución patrón de Níquel de 1000 mg/L
- Peróxido de hidrogeno 30%.
- Agua desionizada y destilada.

3.2 Procedimiento Experimental

Elaboración de la Curva de Calibrado

1. Las curvas de calibrado se realizaron en 3 días distintos, cada una de ellas está compuesta de un blanco de calibración y 5 patrones. Se realizaron 3 mediciones por cada patrón; obteniéndose las absorbancias medias y el %RSD. Para la verificación de la curva se utilizó un patrón control al inicio y final del proceso de análisis, los resultados se encuentran detallados en los anexos del 1 al 4.
2. Para la preparación de la curva de calibrado se utilizó una solución patrón de Cu, Cr, Mn, Ni de concentración 1000 mg/L, a partir del cual se preparó diluciones de 100 mg/L y 10 mg/L en medio HNO₃ 1%.
3. Se preparó los patrones de la curva de calibrado de Cu, 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0 mg/L transfiriendo alícuotas de 1; 2; 3; 4 y 5 mL de la dilución de 100 mg/L de Cu, para la curva de Mn, 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 y 9,0 mg/L se transfirieron respectivamente alícuotas de 1; 3; 5; 7 y 9 mL de la dilución de 100 mg/L de Mn, para la curva de Cr, 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 transfiriendo respectivamente alícuotas de 2 y 5 mL de la dilución de 10mg/L y alícuotas de 1; 1,5 y 2 mL de la dilución de 100 mg/L de Cr, para la curva de Ni, 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 mg/L, transfiriendo respectivamente alícuotas de 5 y 10 mL de la dilución de 10mg/L de Ni y alícuotas de 1; 1,5 y 2 ml de la dilución de 100mg/L de Ni. Paralelamente se preparó soluciones controles de 2,0; 1,0; 5,0 y 1,0 mg/L de Cu, Cr, Mn, Ni respectivamente a partir de la solución de 100mg/L.

Recepción y preparación de la muestra.

De acuerdo al anexo N°6 se efectuó el muestreo superficial a una profundidad de 30cm, con una espátula de acero inoxidable, tomándose varias muestras para el mismo punto de muestreo, se procedió a la homogenización, conservación en cooler y siendo transportadas a la brevedad posible al laboratorio.

Una vez recepcionado la muestra (suelo) se procedió a su secado en estufa a $30^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$, luego se procedió a molienda, finalmente a un tamizado y homogenizado. Se analizó un total de 30 réplicas de la muestra, en tres días diferentes.

Tratamiento de la muestra para Cu, Cr, Mn, Ni (Método Propuesto)

1. Se pesó aproximadamente 1,0 g de muestra seca y homogenizada en un vaso precipitado y se añadió 10 mL de HNO_3 1:1, dejándose a reflujo por 10 minutos aproximadamente.
2. Se añadió 5 mL de HNO_3 continuando con el reflujo por 30 minutos.
3. Repetir el ítem 2, hasta completar la digestión.
4. Evaporar la muestra hasta 5mL aproximadamente, proceder a enfriar en medio ambiente. Se añadió 2 mL de agua destilada y 3 mL de H_2O_2 , continuar agregando H_2O_2 mililitro por mililitro hasta observar que exista burbujeo. Se procedió a reducción hasta 5mL.
5. Se agregó 2,5 mL de HCl concentrado, dejándose a reflujo por 15 minutos.
6. Se procedió a filtrar con papel whatman 41 o equivalente a un matraz aforado (fiola) de 100ml, aforar con agua destilada. Se procedió a la

medición. Se midió dos bancos de reactivos paralelamente a las muestras.

Calibración y determinación de la señal analítica

La adquisición, el procesamiento y salida de la señal se llevó a cabo con el software SpectrAA 240FS, Versión 5.01. Siguiendo con el manual de fabricante se procedió de la siguiente manera:

1. Se encendió la lámpara de Cu y se dejó estabilizar por 15 min. Luego mediante el giro de las perillas que se encuentran en la parte posterior del socket que sostiene al cátodo hueco, se alineó la lámpara a su máxima energía.
2. Se verifico la perfecta alineación del haz de radiación interponiéndose la tarjeta de calibración en la entrada del lente, sobre el quemador seleccionado, y observar que éste se encuentre bien centrado.
3. Para la verificación de la señal utilizar el quemador de 10cm y un estándar de cobre de 3,0 mg/L de concentración, el cual debe dar una absorbancia sobre 0,2.
4. Para el caso de los otros metales (Cr, Mn, Ni) en medición, se debe proceder de acuerdo a los ítems 1,2,3 utilizando estándar de 2.5 mg/L Cr; 12,0 mg/L Mn; 2,0 mg/L Ni; obteniéndose una absorbancia sobre 0,2 respectivamente.
5. Luego se midió la absorbancia de los patrones, de menor a mayor concentración, de la solución control para verificar la calibración y finalmente las muestras.

Tabla N° 3 - Condiciones Instrumentales de operación

Fuente	Lámpara de cátodo Hueco de Cu	Lámpara de cátodo Hueco de Cr	Lámpara de cátodo Hueco de Mn	Lámpara de cátodo Hueco de Ni
Corriente de la lámpara (mA)	4	7	5	4
Longitud de onda (nm)	327,4	357,9	403,1	232,0
Ancho de banda (nm)	0,2	0,2	0,2	0,2
Corrección Background	Si	Si	Si	Si
Flama	Si	Si	Si	Si
Número de replicas	3	3	3	3
Tiempo de integración (s)	5	5	5	5
Tiempo de Retardo (s)	5	5	5	5
Gas Reductor	Acetileno Técnico	Acetileno Técnico	Acetileno Técnico	Acetileno Técnico
Gas Oxidante	Aire	Aire	Aire	Aire
Verificación de la sensibilidad	Una solución de 2,0 mg/L da una absorbancia de aproximadamente 0,2	Una solución de 1,0 mg/L da una absorbancia de aproximadamente 0,2	Una solución de 12,0 mg/L da una absorbancia de aproximadamente 0,2	Una solución de 2,0 mg/L da una absorbancia de aproximadamente 0,2

3.3 Expresión de Resultados

A partir de la lectura de la absorbancia neta obtenida, el software del equipo facilitó la concentración del analito en mg/L, por lo que para conocer la concentración de cobre, cromo, manganeso, níquel y plomo en mg/kg, en la muestra fue necesario aplicar la siguiente fórmula:

$$\boxed{M_x \text{ (mg/kg)} = \frac{C_x \cdot V \cdot F_d}{W}} \quad (13)$$

Dónde:

C_x : Concentración, en mg/L, de la muestra obtenida de la curva de calibrado.

V : volumen, en mL, de aforo inicial

F_d : Factor de dilución $F_d = B/A$,

B = volumen de aforo final (mL)

A = volumen de la alícuota tomada (mL).

W : Masa de la muestra en g.

3.4 Tratamiento Estadístico de los Datos

El tratamiento de los datos obtenidos se realizó utilizando el software estadístico MINITAB 16, así como también, las hojas de cálculo del Microsoft Office EXCEL

A.- Prueba de Normalidad de los datos

Para verificar la distribución normal de los 30 datos obtenidos se sometió a una prueba de Hipótesis de Normalidad: Test de Bondad del Ajuste de Anderson-Darling. El contraste se plantea en los siguientes términos:

Hipótesis Nula (H_0) : Variable aleatoria observada es normal

Hipótesis Alternativa (H_a) : Variable aleatoria observada no es normal.

Tabla N° 4 - Criterio de decisión para la verificación de la Normalidad de los datos

Nivel de significación (α)	P-Value	Criterio de decisión	Conclusión
0,05	P	$P \geq 0,05$	Aceptar H_0 : los datos son Normales
		$P < 0,05$	Rechazar H_0 : los datos son no Normales

B.- Prueba de Grubbs

Para poder aplicar esta prueba, los datos deben ser normales y aleatorios. Mediante este Test se probó si existen o no datos atípicos, para eliminarlos del trabajo de investigación. El contraste se plantea en los siguientes términos:

Hipótesis Nula (H_0) : No hay datos atípicos en la muestra.

Hipótesis Alternativa (H_a) : Hay al menos un dato atípico.

Tabla N° 5 - Criterio de decisión de la Prueba de Grubbs

Nivel de significación (α)	Estadístico Experimental	Criterio de decisión	Conclusión
0,05	G	$G < G_{\text{tabla}}$	Aceptar H_0
		$G \geq G_{\text{tabla}}$	Rechazar H_0

Teniendo en cuenta que la fórmula para determinar el estadístico “G” de los datos extremos es la siguiente:

$$G = \frac{|X_{\text{máx./mín}} - \bar{X}|}{S} \quad (14)$$

Dónde:

$X_{\text{máx./mín}}$: Dato extremos; máximo o mínimo.

\bar{X} : Media de los datos

S : Desviación estándar de los datos.

C.- Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Bartlett

Es una generalización de la Prueba de Fisher; requiere que haya normalidad y muestras grandes. Esta prueba permitió verificar si las varianzas, por tanto, la precisión de los 3 grupos de datos obtenidos en días diferentes son significativamente iguales.

El contraste se plantea en los siguientes términos:

Hipótesis Nula (H_0) : No hay diferencia significativa entre las varianzas

Hipótesis Alternativa (H_a) : Al menos una de las varianzas es distinta a las otras.

Tabla N° 6 - Criterio de decisión para la verificación de la igualdad de precisión

Criterio de decisión	Conclusión
$P \geq 0,05$	Aceptar H_0 : resultados con similar precisión
$P < 0,05$	Rechazar H_0 : resultados con distinta precisión

D.- Prueba de Análisis de Varianza (ANOVA)

Esta prueba verificó la igualdad de las medias, por tanto, comparar si los resultados de los 3 grupos de datos obtenidos en días diferentes difieren o no significativamente.

El contraste se plantea en los siguientes términos:

Hipótesis Nula (H_0) : No hay diferencia significativa entre las medias.

Hipótesis Alternativa (H_a) : Al menos una de las medias es distinta a las otras.

Tabla N° 7 - Criterio de decisión para la verificación de la igualdad de las medias

Criterio de decisión	Conclusión
$P \geq 0,05$	Aceptar H_0 : resultados con diferencias no significativas
$P < 0,05$	Rechazar H_0 : resultados con diferencias significativas

E.- Veracidad

La veracidad del método se evaluó mediante un material de referencia certificada, determinándose posteriormente el porcentaje de Rendimiento. El porcentaje de recuperación se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Rendimiento} = \left[\frac{R_1}{R_2} \right] \times 100 \quad (15)$$

Dónde:

R_1 : Concentración determinada en la muestra adicionada

R_2 : Concentración determinada en la muestra original

Criterio de Decisión:

Se verificó mediante la prueba de "t de Student". El contraste se plantea en los siguientes términos:

Hipótesis Nula (H_0) : No existe diferencia significativa con el 100% de recuperación.

Hipótesis Alternativa (H_a) : Existe diferencia significativa con el 100% de recuperación.

Tabla N° 8 - Verificación de la Veracidad del Método

Criterio de decisión: ($\alpha = 0,05$; $n - 1$ grados de libertad)	Conclusión
$ t_{\text{exp.}} < t_{\text{tabla}}$	Aceptar H_0 : el método es veraz
$ t_{\text{exp.}} > t_{\text{tabla}}$	Rechazar H_0 : el método no es veraz

Teniendo en cuenta:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|R - 100| \cdot \sqrt{n}}{S} \quad (16)$$

Donde:

R : Media de la Recuperación porcentual.

n : Número de datos.

S : Desviación estándar.

F.- Precisión (Repetibilidad)

La precisión del método se determinó analizando el contenido de cobre, cromo, manganeso, níquel, plomo en 30 réplicas en total por metal, realizadas en 3 días diferentes y luego se procedió a la evaluación de la dispersión de los datos, calculándose los estadísticos de precisión: desviación estándar en condiciones de repetibilidad (S_r), desviación estándar relativa (RSD) y el límite de repetibilidad (r).

Criterios de Decisión:

La verificación de la precisión en el método se realizó aplicando Horwitz según la siguiente tabla:

Tabla N° 9 - Verificación de la Precisión del Método

Criterio de Decisión	Conclusión
$RSD_{exp.} < RSD_{Horwitz}$	Metodología Precisa
$RSD_{exp.} \geq RSD_{Horwitz}$	Metodología No Precisa

G.- Linealidad y Rango de Trabajo

Para su determinación se elaboró tres curvas de calibrado independientes (distinto día); cada curva contó con 5 niveles de concentración. Se realizó un análisis de regresión lineal (método de mínimos cuadrados) y se determinó los estadísticos de regresión: pendiente,

ordenada al origen (intercepto) y el coeficiente de correlación; los dos primeros fueron evaluados estadísticamente mediante la prueba de t de Student. El desvío de la linealidad se evaluó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con el estadístico F de Fisher, los intervalos de confianza y el análisis de los residuales.

Criterio de Decisión:

En el análisis de regresión se verificó la linealidad con una prueba de “t de Student” ($\alpha = 0,05$; $n-2$ grados de libertad) para el Intercepto (a) y ordenada (b).

El contraste se plantea en los siguientes términos:

Prueba de Hipótesis para el intercepto (a):

H_0 : No existe diferencia significativa entre el intercepto y el cero.

H_a : Existe diferencia significativa entre el intercepto y el cero.

Prueba de Hipótesis para la ordenada (b):

H_0 : No existe diferencia significativa entre la ordenada y el cero.

H_a : Existe diferencia significativa entre la ordenada y el cero.

Tabla N° 10 - Verificación de la Linealidad.

Prueba		Criterio de decisión	Conclusión
Estadística de Regresión	Coeficiente de Correlación (r)	$r > 0,9950$	El método es lineal en el rango de trabajo
		$r < 0,9950$	El método no es lineal en el rango de trabajo
	Intercepto (a)	$ t_a < t_{\text{tabla}}$	Aceptar H_0 : "a" Pasa por el origen
		$ t_a > t_{\text{tabla}}$	Rechazar H_0 : "a" No pasa por el origen
	Pendiente (b)	$ t_b < t_{\text{tabla}}$	Aceptar H_0 : La correlación lineal no es significativa
		$ t_b > t_{\text{tabla}}$	Rechazar H_0 : La correlación lineal es significativa
Análisis de Residuales		La distribución de los residuales es aleatoria.	El método es lineal en el rango de trabajo.
Análisis de Varianza ($\alpha = 0,05$)		$F_{\text{exp.}} < F_{\text{tabla}}$	El método es lineal en el rango de trabajo.

Teniendo en cuenta:

$$t_a = \frac{|a|}{S_a} \quad (17)$$

$$t_b = \frac{|b|}{S_b} \quad (18)$$

Donde:

a : Intercepto de la recta

b : Pendiente de la recta

S_a : Desviación estándar (error típico) del intercepto.

S_b : desviación estándar (error típico) de la pendiente

H.- Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación se estimaron a partir de la curva de regresión del método y utilizando patrones con concentraciones de analito menores al estándar más bajo indicado en el método.

La lectura de los patrones se realizó por triplicado, determinándose la media y desviación estándar de cada punto.

Estimación de los parámetros Y_{bk} y S_{bk}

Se calculó la ecuación de recta Absorbancia vs. Concentración y se extrapoló la absorbancia a concentración cero, obteniéndose un estimado de la Señal del blanco: Y_{bk} . Se determinó la ecuación de recta Concentración vs. Desviación estándar y se extrapoló la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose un estimado de la desviación estándar del blanco: S_{bk}

I.- Sensibilidad

La sensibilidad se evaluó mediante la respuesta del equipo en tres días a las concentraciones de nuestra curva de trabajo.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{C \times 0,0044}{A} \quad (19)$$

Donde:

C : Concentración del patrón en mg/L.

A : Absorbancia del patrón.

J.- Robustez

Para su determinación se utilizó el diseño de Placket y Burman, que permitió evaluar si las variables que se sometieron a pequeños cambios influyeron significativamente sobre el resultado. Las variables que son propias o adaptadas al método a validarse se indican con letras mayúsculas (A, B, C) y las letras minúsculas (a, b, c) corresponden a las variables que han sido alteradas. Se realizaron 4 ensayos, por duplicado cada uno de ellos, de una misma muestra siguiendo el diseño de Placket y Burman (ver Tabla N°2)

Tabla N° 11 - Combinaciones para el análisis de robustez

		ENSAYOS			
		1	2	3	4
VARIABLE	A, a	A	A	a	A
	B, b	B	b	B	B
	C, c	C	c	c	C
RESULTADO		s	t	u	v

Tabla N° 12 - Variables seleccionadas para el estudio de Robustez

VARIABLE A	Masa de muestra
Estándar (A)	1,5 gramos
Modificado (a)	1,0 gramos
VARIABLE B	Secado de muestra
Estándar (B)	34°C
Modificado (b)	30°C
VARIABLE C	Digestión
Estándar (C)	5mL HCl _(c)
Modificado (c)	2,5mL HCl _(c)

Criterio de Decisión:

Para decidir si una variable tiene influencia significativa sobre el resultado, se comparó la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre esa variable (ver Tabla N° 12) y el producto de la desviación estándar de repetibilidad (S_r) y raíz de 2 según la siguiente tabla:

Tabla N° 13 - Criterio de decisión para la verificación de la Robustez en cada variable

Criterio de decisión	Conclusión
$ V_i < S_r \cdot \sqrt{2}$	El método es robusto para el cambio de variable "i"
$ V_i \geq S_r \cdot \sqrt{2}$	El método no es robusto para el cambio de variable "i"

Tabla N° 14 - Cálculo de la diferencia de respuesta para cada variable

Variable	Diferencia
A - a	$V_A = 1/2(s+t) - 1/2(u+v)$
B - b	$V_B = 1/2(s+u) - 1/2(t+v)$
C - c	$V_C = 1/2(s+v) - 1/2(t+u)$

IV.- DISCUSION

Las verificaciones inicial y final de las tres curvas de calibrado para los analitos de Cu, Cr, Mn y Ni mostraron porcentajes de recuperación aceptables; ya que los valores obtenidos de los patrones de control caen dentro del 90% y 110% de la concentración esperada.

La prueba de Hipótesis de Normalidad de Anderson-Darling; dado que el P-value obtenido fue de 0,193; 0,586; 0,410 y 0,508; para Cu, Cr, Mn y Ni respectivamente son mayor que el nivel de significación 0,05, demostrándose que presentan distribución normal.

Los estadísticos experimentales obtenidos en la prueba de Grubbs G_{\min} y G_{\max} . son menores al valor obtenido por tabla; lo cual confirma la no existencia de datos atípicos en el conjunto de datos.

El P-value obtenido de la prueba de Bartlett fue de 0,910; 0,613; 0,485 y 0,947; para Cu, Cr, Mn y Ni respectivamente lo que permite aceptar la hipótesis nula, por lo tanto, los tres grupos de datos obtenidos presentan similar precisión.

Como el P-value 0,966; 0,148; 0,348 y 0,669 para Cu, Cr, Mn y Ni respectivamente, son mayores que el nivel de significación 0,05 se confirmó

la igualdad de las medias de los tres grupos de datos, por tanto, los resultados no presentan diferencias significativas.

Como se observa en las tablas N° 23, 43, 63 y 83, la media de las recuperaciones realizadas en tres niveles fue de 100,56; 99,94; 100,74 para Cu, 100,53; 100,15; 100,29 para Cr, 100,05; 100,07; 100,01 para Mn, 100,01; 100,04; 100,02 para Ni, con una desviación estándar relativa (RSD) de 1,96; 1,73; 1,99 para Cu, 2,56; 2,18; 1,60 para Cr, 1,36; 1,00; 1,12 para Mn, 2,30; 2,04; 1,56 para Ni. La verificación de que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% se realizó a través del estadístico t de Student, donde se observó que el valor absoluto de "t" experimental es menor al "t" de tabla al 95% de nivel de confianza. Lo que confirma la veracidad del método propuesto.

El estudio de precisión del método mostró una buena repetibilidad de los resultados, obteniéndose una desviación estándar relativa (RSD) de 0,38; 1,20; 0,80 y 1,34 para Cu, Cr, Mn y Ni respectivamente, siendo el valor máximo según Horwitz de 7,72; 9,01; 7,05 y 8,70 para Cu, Cr, Mn y Ni respectivamente, los límites de repetibilidad obtenidos fueron de 1,3; 1,5; 4,9 y 2,1mg/kg Cu, Cr, Mn y Ni.

Se analizaron las siguientes concentraciones para Cu 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0 mg/L, para Cr, 0,02; 0,05; 1,0; 1,50 y 2,0 mg/L; para Mn; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 y 9,0 mg/L y para Ni, 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 mg/L; las cuales al ser

evaluadas estadísticamente, se obtuvieron coeficientes de correlación (r) para Cu, Cr, Mn y Ni aceptables mayores a 0,9950; lo que demuestra que existe linealidad entre las variables concentración y absorbancia en dichos rangos de trabajo. Para confirmar la linealidad, además, se evaluó las 3 curvas de calibrado en conjunto para Cu, Cr, Mn y Ni; mediante la prueba de t de Student para la ordenada en el origen se demostró que el " t_a " es menor al t_{tabla} lo que confirma que pasa por el origen.

Mediante la prueba de t de Student para la pendiente se demostró que el " t_b " es mayor al t_{tabla} lo que confirma que la correlación lineal es significativa. Además de un coeficiente de correlación general es mayor a 0,9950. El análisis de Varianza también demostró la linealidad ya que dio un valor de "F" experimental de 0,659; 0,933; 0,416; 0,104 para Cu, Cr, Mn y Ni respectivamente menor al F de tabla (2,874; 1,901; 1,896; 1,254 para Cu, Cr, Mn y Ni respectivamente).

Puesto que el principal objetivo de este método, es poder medir concentraciones de Cu, Cr, Mn y Ni a nivel trazas, fue de primordial importancia conocer el límite de detección y cuantificación. Obteniéndose los siguientes límites de detección de 3,0; 2,0; 2,0; 2,0 para Cu, Cr, Mn y Ni mg/kg respectivamente, los cuales representan la mínima concentración detectable pero no necesariamente cuantificable. Con un límite de cuantificación de 9,0; 6,0; 6,0; 6,0 para Cu, Cr, Mn y Ni mg/kg respectivamente, que representan la

mínima concentración del analito que se puede determinar con un nivel aceptable de precisión y exactitud.

Los resultados obtenidos para los ensayos de robustez demuestran que los cambios a los cuales fue sometida las variables de estudio no influyeron significativamente, ya que la diferencia de respuesta de cada variable es menor al producto de la desviación estándar y raíz cuadrada de dos.

V.- CONCLUSIONES

- Se concluye que los resultados presentan una distribución normal, no existe datos atípicos, son reproducibles y no presentan diferencias significativas entre ellos.
- El método es veraz y preciso, debido a que se obtienen resultados con RSD, menor al RSD de Horwitz para Cu, Cr, Mn y Ni.
- El método es lineal en el intervalo de concentraciones de 1,0 y 5,0 mg/L Cu; 0,2 y 2,0 mg/L Cr; 1,0 y 9,0 mg/L Mn; 0,5 y 2,5 mg/L Ni, como se confirmó a través de las pruebas estadísticas.
- Las pruebas estadísticas evidencian que el método es robusto para los cambios de masa de muestra, temperatura de secado de muestra, volumen de HCl en la digestión.
- El desarrollo de este método permitió conocer el desempeño del ensayo a través de los parámetros evaluados.
- Se demuestra que el método es veraz, preciso, lineal, sensible, selectivo y robusto.

VI.- RECOMENDACIONES

- Se debe tener especial cuidado en mantener invariable las condiciones operacionales del sistema de absorción atómica, ya que de ello depende la calidad y la reproducibilidad de los resultados.
- Antes de cada medición analítica de los patrones de la curva de calibrado y soluciones de muestras se debe evaluar la sensibilidad del equipo para el analito. Con el objetivo de asegurar la calidad de los resultados se debe realizar una verificación inmediatamente después de cada calibración del equipo y, durante la medición, cada 10 muestras, mediante el análisis de una solución patrón control; admitiéndose una desviación máxima del 10% del valor nominal del analito.

ANEXO N° 1: ANALISIS ESTADISTICO DE COBRE

Tabla N° 15 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Cobre realizado el 13/05/2013

Concentración (mg/L)	Absorbancia Media	%RSD
0,00	-0,0001	>100
1,00	0,0665	2,30
2,00	0,1329	1,57
3,00	0,2011	0,98
4,00	0,2658	0,56
5,00	0,3302	0,74

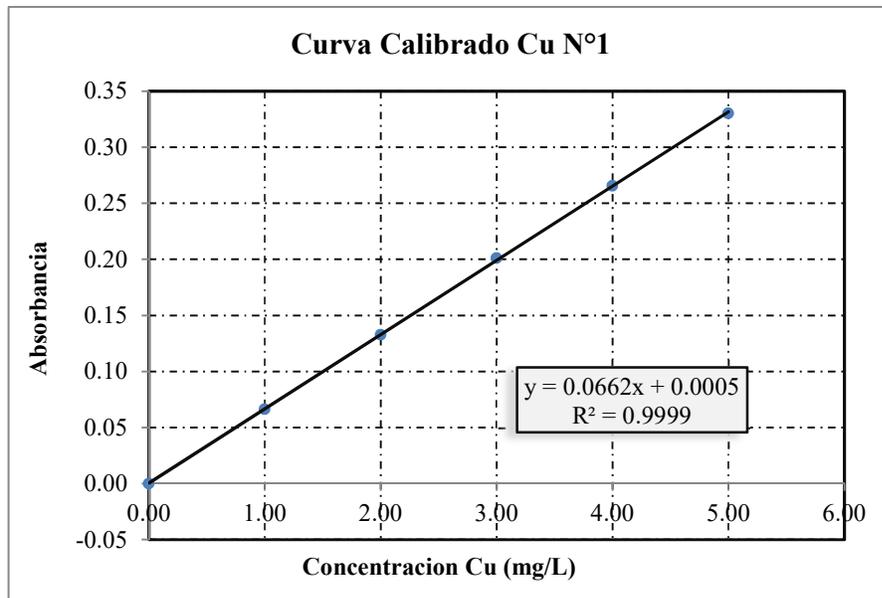


Figura N° 3 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 15

Tabla N° 16 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Cobre realizado el 14/05/2013

Concentración (mg/L)	Absorbancia Media	%RSD
0,00	-0,0001	>100
1,00	0,0666	1,98
2,00	0,1331	1,11
3,00	0,2007	0,33
4,00	0,2654	0,35
5,00	0,3304	0,87

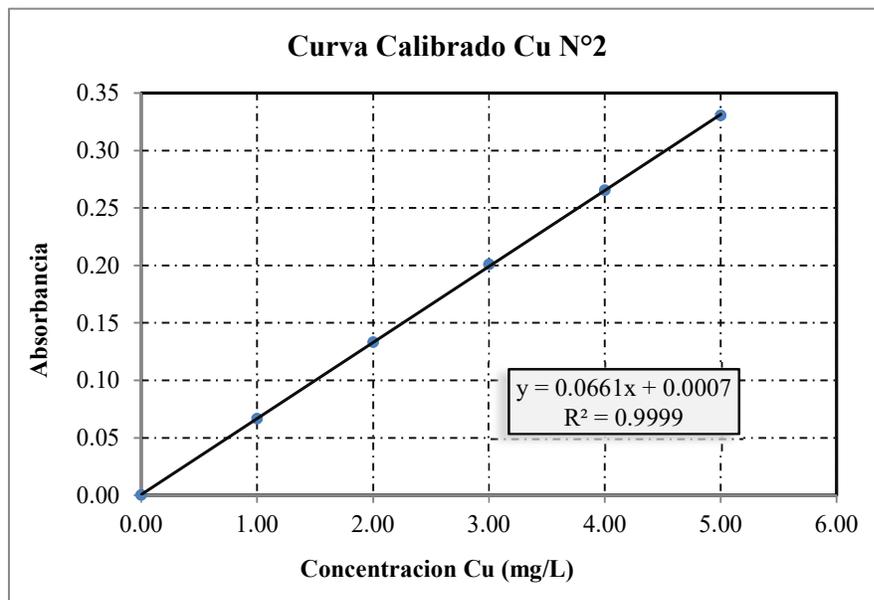


Figura N° 4 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 16

Tabla N° 17 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Cobre realizado el 15/05/2013

Concentración (mg/L)	Absorbancia Media	%RSD
0,00	-0,0001	>100
1,00	0,0662	2,76
2,00	0,1327	0,95
3,00	0,2004	0,29
4,00	0,2647	0,83
5,00	0,3291	0,75

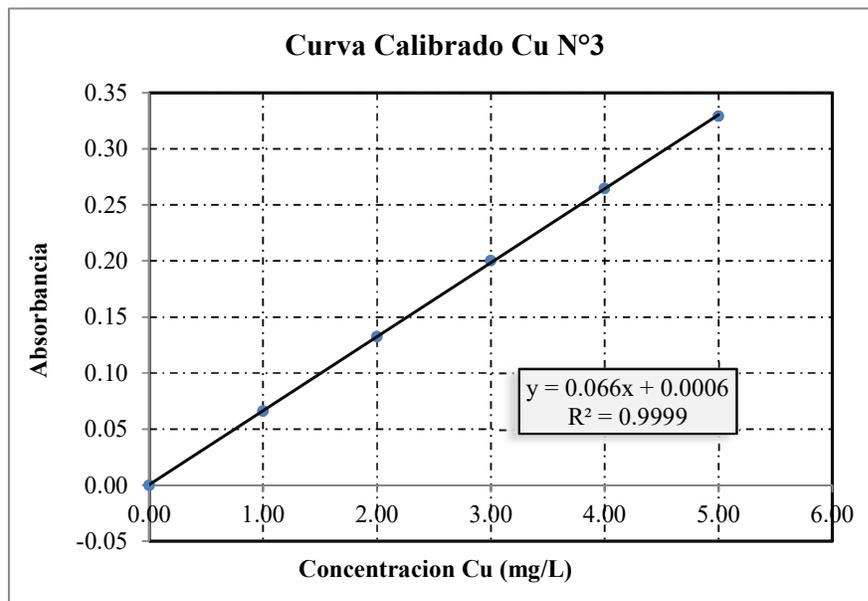


Figura N° 5 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 17

Tabla N° 18 - Resultados de la verificación de las Curvas de Calibrado de Cu

Curva de Calibrado	Concentración obtenida del Patrón Control de Cu			
	Inicio (mg/L)	% Recuperación	Final (mg/L)	% Recuperación
1	1,972	98,6	1,986	99,3
2	1,984	99,2	1,991	99,6
3	2,002	100,1	2,005	100,3

3.2 Expresión de Resultados

La muestra utilizada fue suelo homogenizado y tamizado, las 30 replicas se analizaron en tres días diferentes; en condiciones de repetibilidad. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos:

Tabla N° 19 - Determinación de Cobre en Suelos

Nro.	Concentración (mg Cu/Kg muestra)		
	13/05/2013	14/05/2013	15/05/2013
1	100,53 ± 3,96	100,53 ± 3,95	100,51 ± 3,95
2	100,44 ± 3,94	99,97 ± 3,96	100,21 ± 3,96
3	100,49 ± 3,94	99,84 ± 3,91	100,63 ± 3,94
4	99,99 ± 3,95	100,51 ± 3,90	100,14 ± 3,93
5	100,41 ± 3,95	100,08 ± 3,94	100,19 ± 3,96
6	100,22 ± 3,94	100,12 ± 3,94	100,92 ± 3,95
7	100,77 ± 3,93	100,01 ± 3,95	100,41 ± 3,95
8	99,92 ± 3,96	100,58 ± 3,94	100,48 ± 3,95
9	100,58 ± 3,97	100,28 ± 3,95	100,50 ± 3,95
10	100,41 ± 3,94	100,61 ± 3,94	100,19 ± 3,93
Media	100,37	100,25	100,42
Desviación Estándar	0,3	0,3	0,2
Media General	100,35		
Desviación Estándar General	0,26		

3.3 Tratamiento Estadístico de los Datos

Prueba de Normalidad de los datos

A continuación se muestra la Prueba de Normalidad de Anderson Darling aplicado a las 30 réplicas analizadas, para ello se contó con el paquete estadístico Minitab 16.

Ho: Los datos presentan una distribución de probabilidad normal.

Ha: Los datos no presentan una distribución de probabilidad normal.

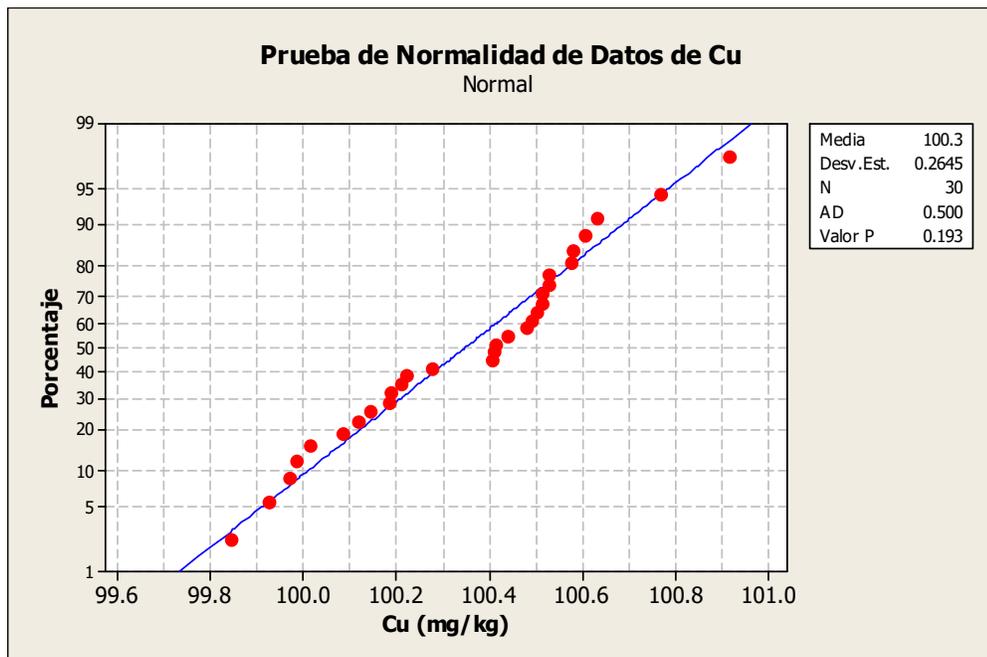


Figura N° 6 - Resultado de la Prueba de Normalidad por Anderson Darling de los datos de la tabla N° 19

El Valor P obtenido es 0,193 mayor al nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Aceptamos la hipótesis nula, por lo tanto los resultados presentan una distribución de probabilidad normal al 95% de confianza.

Prueba de Grubbs

La existencia de datos anómalos o atípicos en los resultados de la tabla N° 19 se verificó con la prueba de Grubbs:

Tabla N° 20 - Parámetros obtenidos de la Prueba de Grubbs de los datos de la tabla N° 19

Puntos Atípicos de Grubbs

Para poder aplicar este test, los datos deben de ser normales y aleatorios. Mediante este Test se prueba si existen datos atípicos, para eliminarlos del trabajo de investigación

Estadístico de Contraste

$$G = \frac{(x_{\text{máx-min}} - \bar{x})}{S}$$

$x_{\text{máx 0 mín}}$: Valores extremos: Máximos o Mínimos

\bar{x} : Promedio de los resultados

s : Desviación Estándar de conjunto de datos

Cálculos

Cu (mg/kg)		
Dia 1	Dia 2	Dia 3
100.53	100.53	100.51
100.44	99.97	100.21
100.49	99.84	100.63
99.99	100.51	100.14
100.41	100.08	100.19
100.22	100.12	100.92
100.77	100.01	100.41
99.92	100.58	100.48
100.58	100.28	100.50
100.41	100.61	100.19

Promedio	100.349
Máximo Valor	100.92
Mínimo Valor	99.84
Desv. Estándar	0.265

Valores Experimentales	
G_{mínimo}	1.911
G_{máximo}	2.149

Significancia	0.05
N	30
K	3.74

Valores De Tabla	
G ($\alpha = 0,05$)	3.058

Conclusión

No existen valores atípicos en este conjunto de resultados

Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Bartlett

Se realizó a través de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Fisher. Esta prueba permitió verificar las varianzas, por tanto, la precisión de los datos obtenidos en días diferentes son significativamente iguales.

Ho: No existe diferencia significativa entre las varianzas

Ha: Al menos una de las varianzas es distinta a las otras

Tabla N° 21 - Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Cobre.

Prueba de Homogeneidad de Varianzas al 95% Confianza				
Cobre VS Analista				
Dia	N	Inferior	Desv. Est.	Superior
1	10	0,166436	0,261264	0,555992
2	10	0,181104	0,284290	0,604993
3	10	0,156314	0,245376	0,522180

Prueba de Bartlett (Distribución Normal)
Estadística de prueba = 0,19 p-value = **0,910**

Prueba de Levene (Cualquier Distribución Continua)
Estadística de prueba = 0,51 p-value = 0,604

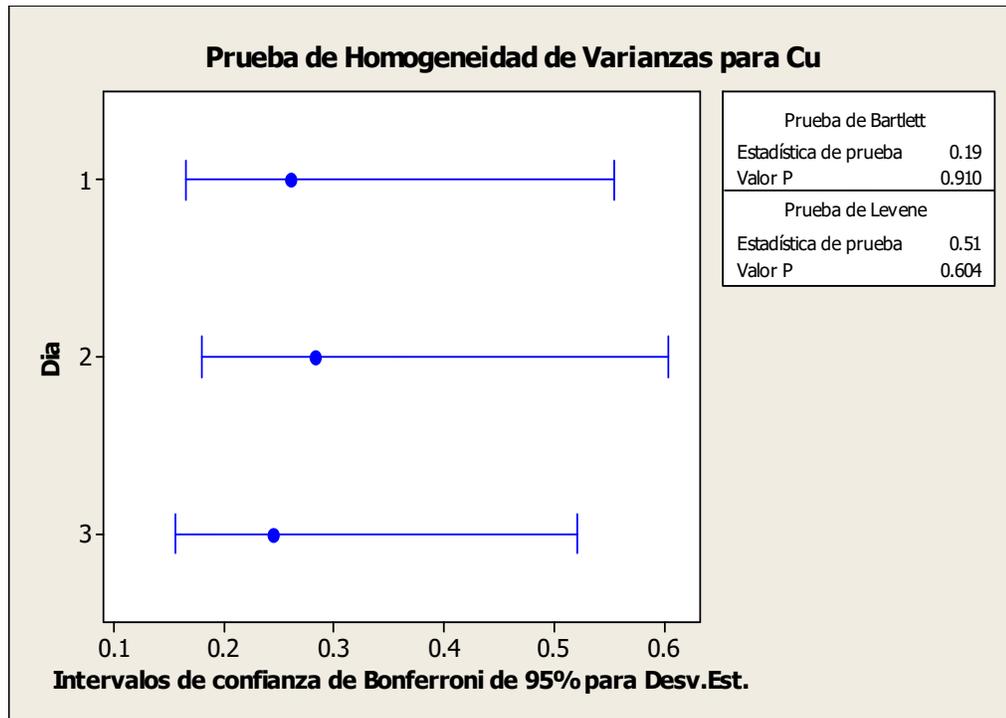


Figura N° 7 - Resultado de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos de la tabla N° 19

El Valor P obtenido es 0,910 mayor al nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Aceptamos la hipótesis nula, por lo tanto podemos concluir que los resultados de los analistas tienen el mismo nivel de precisión al 95% de confianza.

Prueba de Igualdad de Medias de Tendencia Central

Para evaluar que los promedios de los datos obtenidos en diferentes días no difieren significativamente se realizó la prueba de ANOVA de un factor.

Ho: No existe diferencia significativa entre las promedios

Ha: Al menos una de los promedios es diferente a los otros.

Tabla N° 22 - Prueba de Igualdad de Medias de Cobre.

Prueba de ANOVA de un factor					
Cobre Vs Analista					
Fuente	GL	SC	MC	F	P
Analista	2	0,1456	0,0728	1,04	0,366
Error	27	1,8836	0,0698		
Total	29	2,0292			

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada			
Dia	N	Media	Desv. Est.
1	10	100,374	0,261
2	10	100,254	0,284
3	10	100,418	0,245

-----+-----+-----+-----+-----
 (-----*-----)
 (-----*-----)
 (-----*-----)
 -----+-----+-----+-----+-----
 100,20 100,35 100,50 100,65

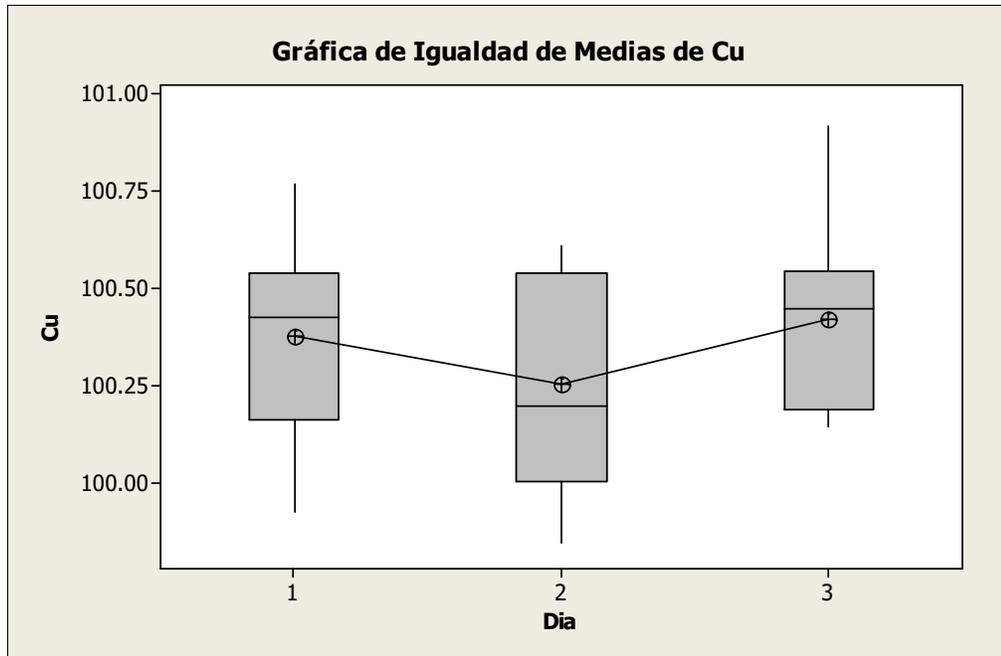


Figura N° 8 - Resultado de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos de la tabla N° 19

Como podemos observar el P-Value es igual 0,966 es mayor que el nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Aceptamos la hipótesis nula, por lo tanto no existe diferencia significativa entre los promedios al 95% de confianza.

Veracidad

La fortificación de la muestra se realizó en tres niveles teniendo cuidado que la suma de ambas cantidades, la del analito nativo y analito adicionado no supere la máxima cantidad cuantificable según la recta de calibrado, a continuación se muestran los resultados (ver tabla N° 23). Para evaluar la veracidad el promedio de todas las recuperaciones se sometió a una prueba de t de Student y se verificó que no existan diferencias significativas con el 100% de recuperación

Tabla N° 23 - Resultados de los ensayos de Recuperación realizado en tres niveles

MRC Adicionada (mg/kg)	Concentración Obtenida (mg Cu/Kg)			%Recuperación		
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
39,60	139,82	160,52	179,51	99,2	101,0	99,7
59,40	140,35	159,68	180,41	100,8	100,5	101,3
79,20	140,19	160,36	181,93	100,3	101,9	102,6
	139,51	160,58	182,36	99,8	101,1	103,8
	140,75	158,47	178,58	101,9	98,3	99,0
	138,95	158,25	178,69	97,8	97,9	98,2
	141,32	160,14	178,25	102,4	101,2	98,3
	139,85	160,98	179,89	100,8	101,7	100,3
	140,62	158,22	180,58	101,1	97,5	101,1
	140,62	158,98	181,81	101,5	98,3	103,1
Promedio	140,20	159,62	180,20	100,56	99,94	100,74
Desviación Estándar	0,69	1,05	1,48	1,36	1,73	1,99

Prueba T de una muestra: %Re Adición Cu

Variable	N	Media	Desv. Est.	Error estandar de la media	Intervalo de Confianza	P-Value
%Re Adición Cu	30	100,413	1,688	0,308	99,783 - 101,044	0,190

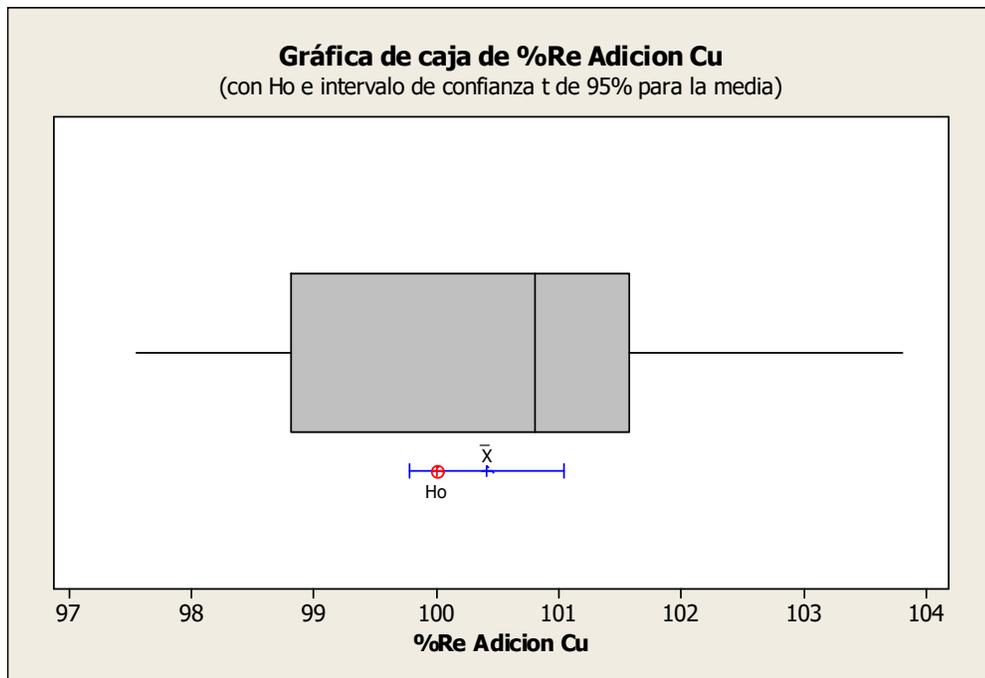


Figura N° 9 - Diagrama de Caja de la Prueba de t de Student

Precisión

La precisión fue estimada en condiciones de repetibilidad; analizando 30 réplicas independientes de la muestra de ensayo, en un periodo de 3 días diferentes.

Tabla N° 24 - Resultados obtenidos para el cálculo de la precisión del Método

Concentración Promedio (mg/kg)	Desviación Estandar Repetibilidad (S_r)	% RSD _R Experimental	% RSD Horwitz	Limite de Repetibilidad (r) (mg/kg)	Criterio de precisión
126,44	0,47	0,38	7,72	1,3	RSD _{Exp.} < RSD Horwitz

Linealidad y Rango de trabajo

Para la evaluación de la linealidad se utilizó las tres curvas de calibrado diseñadas anteriormente; primero se evaluaron las tres curvas de manera independiente y luego en conjunto.

Tabla N° 25 - Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas de las tablas N° 26, 27 y 28.

CURVA	Intercepto (a)	Pendiente (b)	(r)	Criterio de decisión	Conclusión
DIA 1	0,00052	0,0662	0,99996	r > 0,9950	r aceptable
DIA 2	0,00071	0,0661	0,99997		r aceptable
DIA 3	0,00056	0,0660	0,99996		r aceptable

Tabla N° 26 - Curva de Calibración Cu Día 13/05/2013	
Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,000	-0,0001
1,000	0,0665
2,000	0,1329
3,000	0,2011
4,000	0,2658
5,000	0,3302
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99996
Coeficiente de determinación R ²	0,99992
R ² ajustado	0,99990
Error típico	0,00126
Observaciones	6
Con lo que podemos afirmar que nuestro R (0,99996)	

Tabla N° 27 - Curva de Calibración Cu Día 14/05/2013	
Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,000	-0,0001
1,000	0,0665
2,000	0,1329
3,000	0,2011
4,000	0,2658
5,000	0,3302
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99997
Coeficiente de determinación R ²	0,99995
R ² ajustado	0,99994
Error típico	0,00098
Observaciones	6
Con lo que podemos afirmar que nuestro R (0,99997)	

Tabla N° 28 - Curva de Calibración Cu Día 15/05/2013	
Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,000	-0,0001
1,000	0,0665
2,000	0,1329
3,000	0,2011
4,000	0,2658
5,000	0,3302
<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99996
Coefficiente de determinación R ²	0,99992
R ² ajustado	0,99990
Error típico	0,00123
Observaciones	6
Con lo que podemos afirmar que nuestro R (0,99996)	

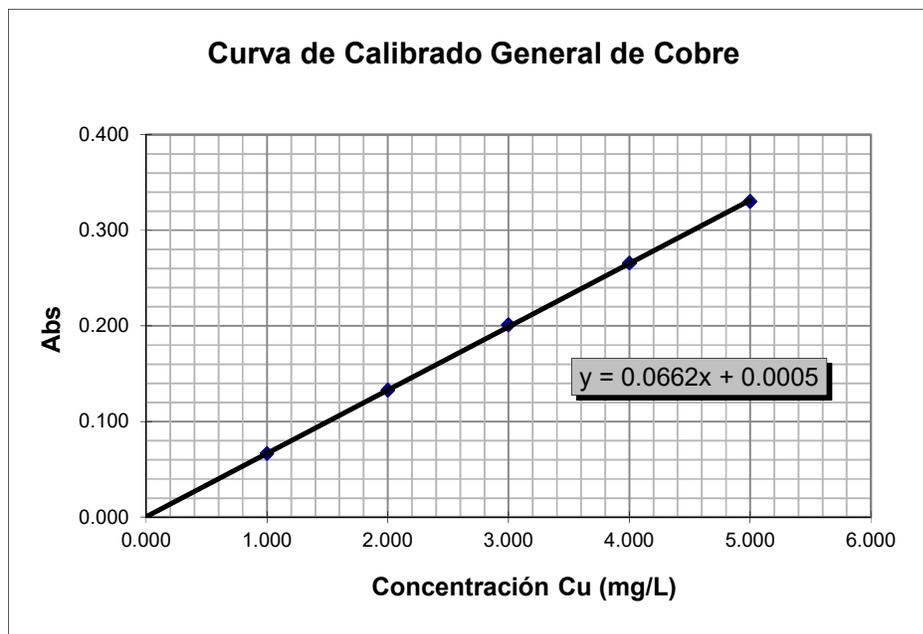


Figura N° 10 - Curva de Calibrado General

ECUACION	Absorbancia = 0,0662x Concentración + 0,0005
COEFICIENTE DE CORRELACION	El "r" obtenido es 0,99997 mayor a 0,9950 por lo tanto es aceptable.
ANALISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN	<p>La regresión es significativa (F es mayor que el valor crítico de F), Por lo tanto la PENDIENTE es distinta de cero</p> <p>El INTERCEPTO de la regresión contiene al valor cero pues pertenece al intervalo de: [-0,000343976; 0,001537627]</p>

Tabla N° 29 – Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas evaluadas en conjunto

ESTADÍSTICAS DE LA REGRESIÓN						
Coefficiente de correlación (r)	0,99996					
Coefficiente de determinación (r^2)	0,99992					
r^2 ajustado	0,99992					
Error típico ($S_{Y/X}$)	0,00106					
Observaciones	18					
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)						
Origen de las Variaciones	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	Probabilidad
Puntos	1	0,229469463	0,229469463	0,659	2,874	0,197
Réplicas	16	1,80481E-05	1,128E-06			
Total	17	0,229487511				
INTERVALO DE CONFIANZA DEL INTERCEPTO Y LA PENDIENTE						
	Coefficientes	Error Típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepto (a)	0,00059	0,000443	1,34	0,197	-0,0003439	0,001537
Pendiente (b)	0,0661	0,000146	451,03	0,000	0,065801	0,066423

Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Los límites de detección y Cuantificación se estimaron por extrapolación a cero en la curva de regresión con soluciones de concentración baja del analito. A continuación se muestra las lecturas de los patrones:

Tabla N° 30 - Resultados de las lecturas de los patrones de concentración baja para el cálculo del límite de Detección y Cuantificación

Concentración (mg/L)	Absorbancia			Absorbancia Media	Desviación Estándar (s)
0,10	0,0069	0,0073	0,0064	0,0069	0,00045
0,15	0,0105	0,0107	0,0101	0,0104	0,00031
0,20	0,0134	0,0127	0,0131	0,0131	0,00035

La estimación de la señal del blanco: Y_{bk} se calculó de la ecuación de recta Absorbancia vs. Concentración (figura N° 11) y se extrapoló la absorbancia a concentración cero. La estimación de la desviación estándar del blanco: S_{bk} se calculó de la ecuación de recta "Concentración vs. Desviación estándar" (figura N° 12) y se extrapoló la desviación estándar a concentración cero.

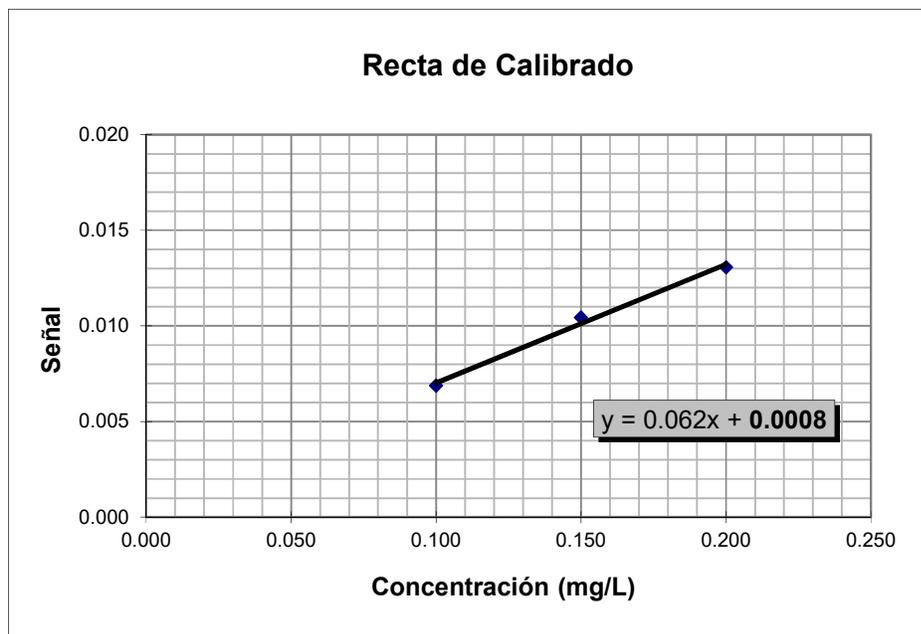


Figura N° 11 - Curva de Calibrado Absorbancia vs. Concentración para el cálculo del límite de detección y Cuantificación

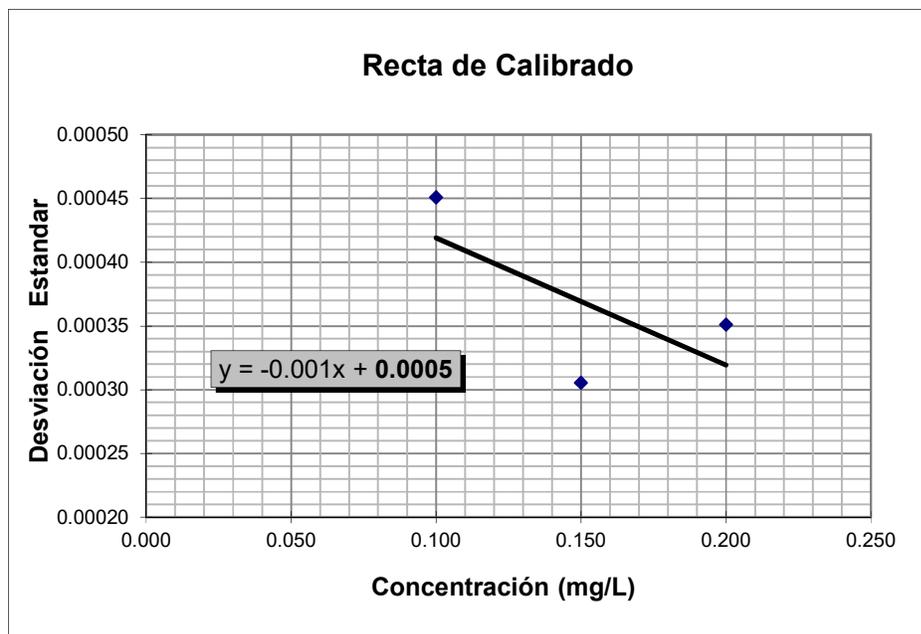


Figura N° 12 - Curva de Calibrado Desviación estándar vs. Concentración para el cálculo del límite de detección y Cuantificación

Para el cálculo de los parámetros se utilizó la ecuación de recta del análisis de regresión lineal de las curvas en conjunto (tabla N° 29 Regresión Lineal Combinada),

Tabla N° 31 - Resultados del cálculo del límite de Detección y límite de Cuantificación

Señal del Blanco (Y_{bk})	Desviación Estándar de Blanco (S_{bk})	Limite de Detección (LD)		Limite de Cuantificación (LC)	
		mg/L	mg/kg	mg/L	mg/kg
0,0008	0,0005	0,03	3,0	0,09	9,0

Sensibilidad

Se evaluó la sensibilidad en tres días tomando como referencia una solución patrón de 3,0 mg/L

Tabla N° 32 – Resultados del cálculo de la sensibilidad

Día	Concentración (mg/L)	Absorbancia	Sensibilidad (mg/L)
1	3,00	0,2011	0,0656
2	3,00	0,2007	0,0658
3	3,00	0,2004	0,0659
Promedio			0,0658

Robustez

Siguiendo el diseño de Plackett y Burman, para el análisis de robustez, se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en las tablas N° 33 y 34.

Tabla N° 33 - Resultados obtenidos en los ensayos para la determinación de Robustez

	Valor Observado	Valor Tabla	Conclusión
Variable A	0,515	0,665	El factor no influye
Variable B	0,225	0,665	El factor no influye
Variable C	0,425	0,665	El factor no influye

Tabla N° 34 - Resultado de la evaluación de la robustez

Variable	1	2	3	4
A o a	A	A	a	a
B o b	B	B	B	b
C o c	C	C	c	C
Resultado	100,86	100,21	99,92	100,12
S _r	0,47			

ANEXO N° 2: ANALISIS ESTADISTICO DE CROMO

Tabla N° 35 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Cromo realizado el 20/05/2013

Concentración (mg/L)	Absorbancia Media	%RSD
0,00	0,0002	>100
0,20	0,0162	3,22
0,50	0,0388	1,56
1,00	0,0796	0,91
1,50	0,1192	0,67
2,00	0,1571	0,74

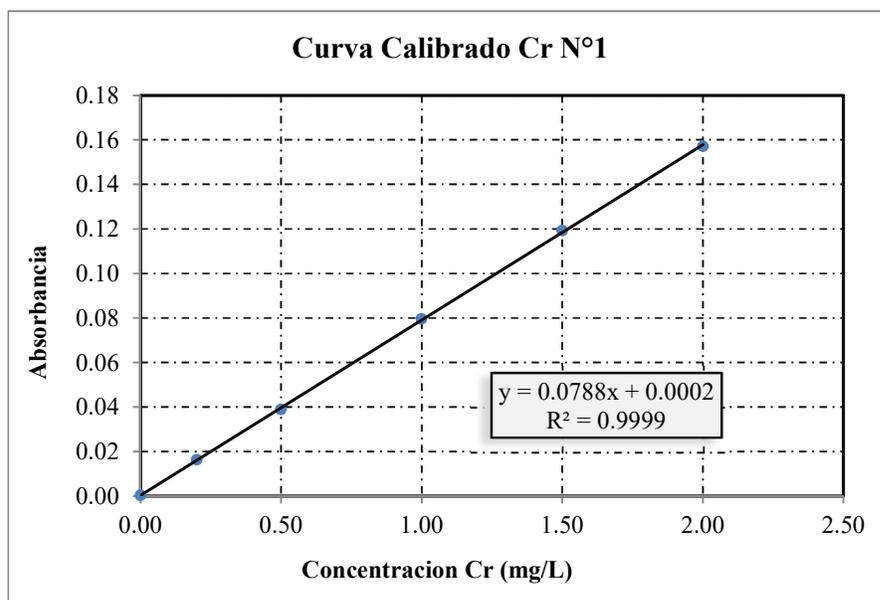


Figura N° 13 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 35

Tabla N° 36 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Cromo realizado el 21/05/2013

Concentración (mg/L)	Absorbancia Media	%RSD
0,00	0,0005	>100
0,20	0,0159	2,98
0,50	0,0395	1,65
1,00	0,0794	1,02
1,50	0,1190	0,98
2,00	0,1569	0,67

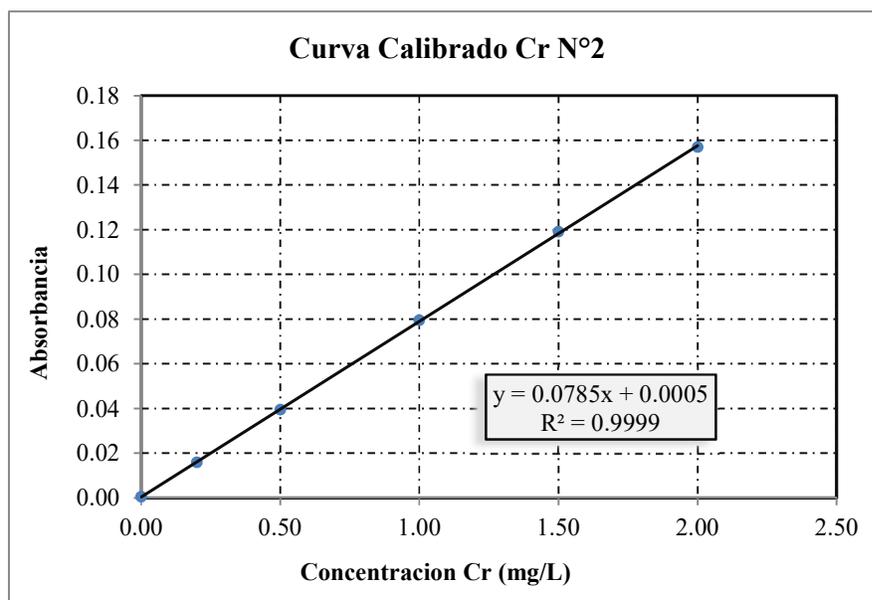


Figura N° 14 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 36

Tabla N° 37 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Cromo realizado el 22/05/2013

Concentración (mg/L)	Absorbancia Media	%RSD
0,00	-0,0005	>100
0,20	0,0157	3,67
0,50	0,0393	2,33
1,00	0,0796	1,73
1,50	0,1192	0,92
2,00	0,1555	0,57

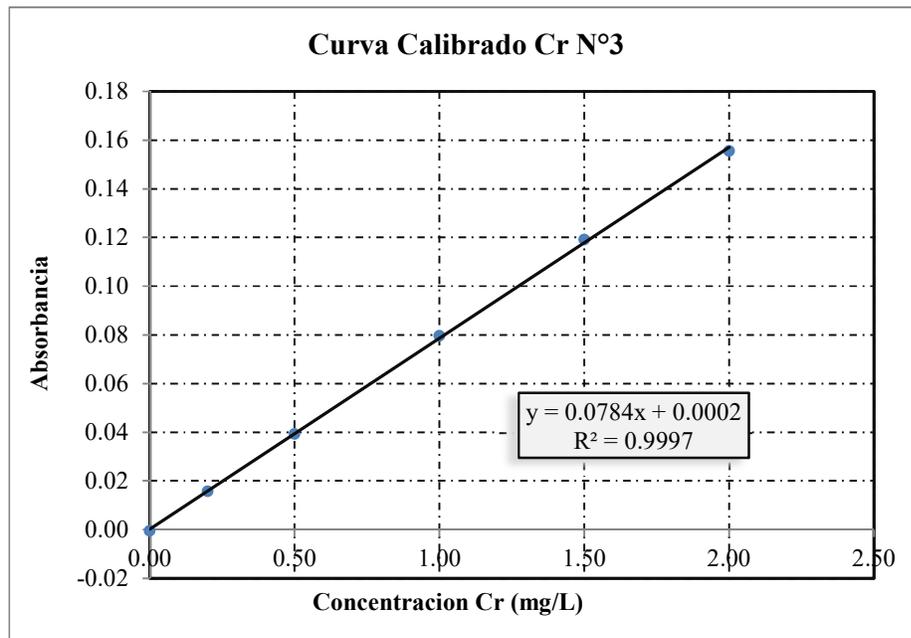


Figura N° 15 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 37

Tabla N° 38 - Resultados de la verificación de las Curvas de Calibrado de Cromo

Curva de Calibrado	Concentración obtenida del Patrón Control de Cr			
	Inicio (mg/L)	% Recuperación	Final (mg/L)	% Recuperación
1	0,965	96,5	0,978	97,8
2	0,978	97,8	0,998	99,8
3	0,998	99,8	0,989	98,9

3.5 Expresión de Resultados

La muestra utilizada fue suelo homogenizado y tamizado, las 30 replicas se analizaron en tres días diferentes; en condiciones de repetibilidad. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos:

Tabla Nº 39 - Determinación de Cromo en Suelos

Nro.	Concentración (mg Cr/Kg muestra)		
	20/05/2013	21/05/2013	22/05/2013
1	38,56 ± 1,85	37,84 ± 1,88	37,82 ± 1,87
2	38,28 ± 1,86	38,51 ± 1,83	38,90 ± 1,83
3	38,52 ± 1,85	38,54 ± 1,77	39,21 ± 1,79
4	38,95 ± 1,81	38,98 ± 1,79	39,29 ± 1,88
5	38,47 ± 1,82	38,41 ± 1,81	38,70 ± 1,82
6	38,71 ± 1,79	38,16 ± 1,82	38,64 ± 1,80
7	39,04 ± 1,76	38,42 ± 1,79	38,43 ± 1,86
8	38,85 ± 1,82	38,79 ± 1,78	38,52 ± 1,78
9	38,49 ± 1,83	38,00 ± 1,86	38,75 ± 1,77
10	39,35 ± 1,79	38,74 ± 1,85	39,25 ± 1,85
Media	38,72	38,44	38,75
Desviación Estándar	0,3	0,4	0,4
Media General	38,64		
Desviación Estándar General	0,39		

3.6 Tratamiento Estadístico de los Datos

Prueba de Normalidad de los datos

A continuación se muestra la Prueba de Normalidad de Anderson Darling aplicado a las 30 réplicas analizadas, para ello se contó con el paquete estadístico Minitab 16.

Ho: Los datos presentan una distribución de probabilidad normal.

Ha: Los datos no presentan una distribución de probabilidad normal.

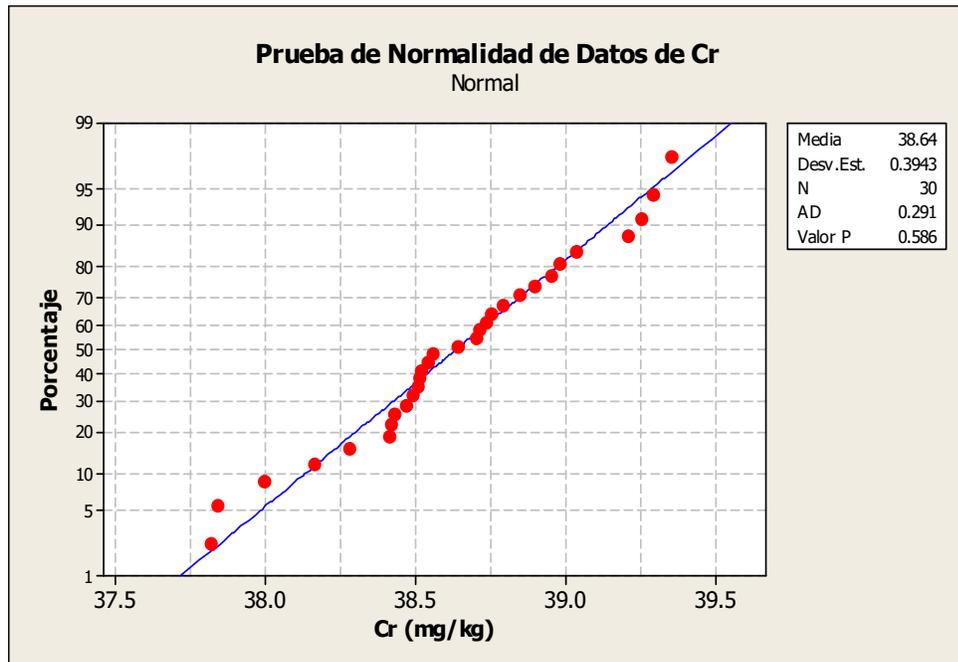


Figura N°16 - Resultado de la Prueba de Normalidad por Anderson Darling de los datos de la tabla N° 39

El Valor P obtenido es 0,586 mayor al nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Aceptamos la hipótesis nula, por lo tanto los resultados presentan una distribución de probabilidad normal al 95% de confianza.

Prueba de Grubbs

La existencia de datos anómalos o atípicos en los resultados de la tabla N° 39 se verificó con la prueba de Grubbs:

Tabla N° 40 - Parámetros obtenidos de la Prueba de Grubbs de los datos de la tabla N° 39

Puntos Atípicos de Grubbs

Para poder aplicar este test, los datos deben de ser normales y aleatorios. Mediante este Test se prueba si existen datos atípicos, para eliminarlos del trabajo de investigación

Estadístico de Contraste

$$G = \frac{(x_{m\acute{a}x-m\acute{i}n} - \bar{x})}{S}$$

$x_{m\acute{a}x}$ o $x_{m\acute{i}n}$: Valores extremos: Máximos o Mínimos
 \bar{x} : Promedio de los resultados
 s : Desviación Estándar de conjunto de datos

Cálculos

Cr (mg/kg)		
Día 1	Día 2	Día 3
38.56	37.84	37.82
38.28	38.51	38.90
38.52	38.54	39.21
38.95	38.98	39.29
38.47	38.41	38.70
38.71	38.16	38.64
39.04	38.42	38.43
38.85	38.79	38.52
38.49	38.00	38.75
39.35	38.74	39.25

Promedio	38.638
Máximo Valor	39.35
Mínimo Valor	37.82
Desv. Estándar	0.394

Valores Experimentales	
G_{mínimo}	2.071
G_{máximo}	1.817

Significancia	0.05
N	30
K	3.74

Valores De Tabla	
G ($\alpha = 0,05$)	3.058

Conclusión

No existen valores atípicos en este conjunto de resultados

Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Bartlett

Se realizó a través de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Fisher. Esta prueba permitió verificar las varianzas, por tanto, la precisión de los datos obtenidos en días diferentes son significativamente iguales.

Ho: No existe diferencia significativa entre las varianzas

Ha: Al menos una de las varianzas es distinta a las otras

Tabla N° 41 - Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Cromo.

Prueba de Homogeneidad de Varianzas al 95% Confianza				
Cromo VS Analista				
Día	N	Inferior	Desv. Est.	Superior
1	10	0,206492	0,324144	0,689805
2	10	0,228251	0,358300	0,762492
3	10	0,285828	0,448683	0,954834

Prueba de Bartlett (Distribución Normal)
Estadística de prueba = 0,98 p-value = **0,613**

Prueba de Levene (Cualquier Distribución Continua)
Estadística de prueba = 0,25 p-value = 0,780

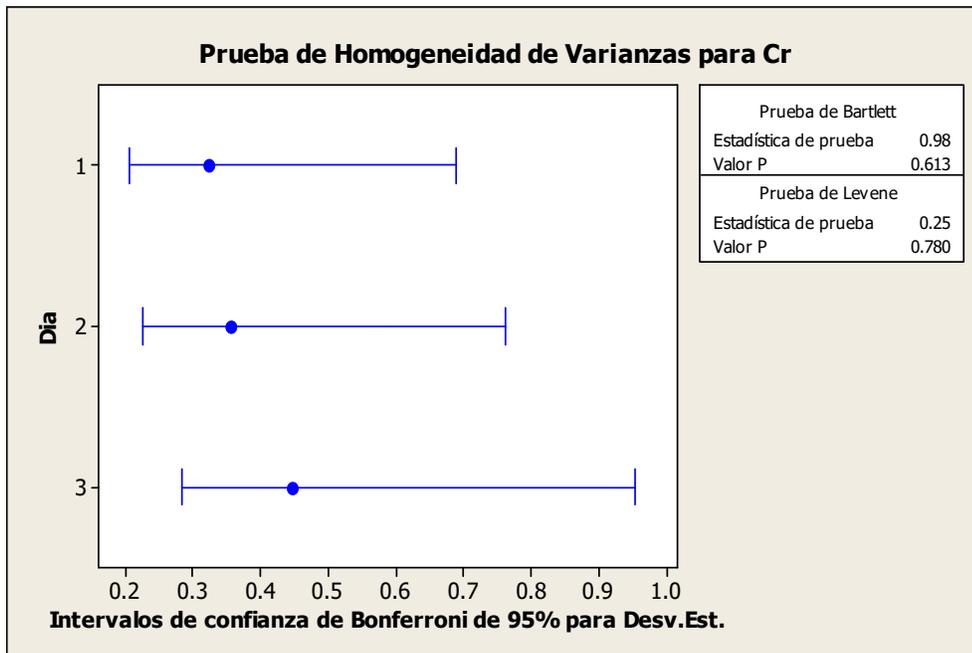


Figura N° 17 - Resultado de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos de la tabla N° 39

El Valor P obtenido es 0,613 mayor al nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Aceptamos la hipótesis nula, por lo tanto podemos concluir que los resultados de los analistas tienen el mismo nivel de precisión al 95% de confianza.

Prueba de Igualdad de Medias de Tendencia Central

Para evaluar que los promedios de los datos obtenidos en diferentes días no difieren significativamente se realizó la prueba de ANOVA de un factor.

Ho: No existe diferencia significativa entre las promedios

Ha: Al menos una de los promedios es diferente a los otros.

Tabla N° 42 - Prueba de Igualdad de Medias de Cromo.

Prueba de ANOVA de un factor					
Cromo Vs Analista					
Fuente	GL	SC	MC	F	P
Analista	2	0,596	0,298	2,05	0,148
Error	27	3,913	0,145		
Total	29	4,508			

ICs de 95% individuales para la media			
basados en Desv.Est. agrupada			
Dia	N	Media	Desv. Est.
1	10	38,724	0,324
2	10	38,439	0,358
3	10	38,751	0,449

--+-----+-----+-----+-----
(-----*-----)
(-----*-----)
(-----*-----)
--+-----+-----+-----+-----
38,25 38,50 38,75 39,00

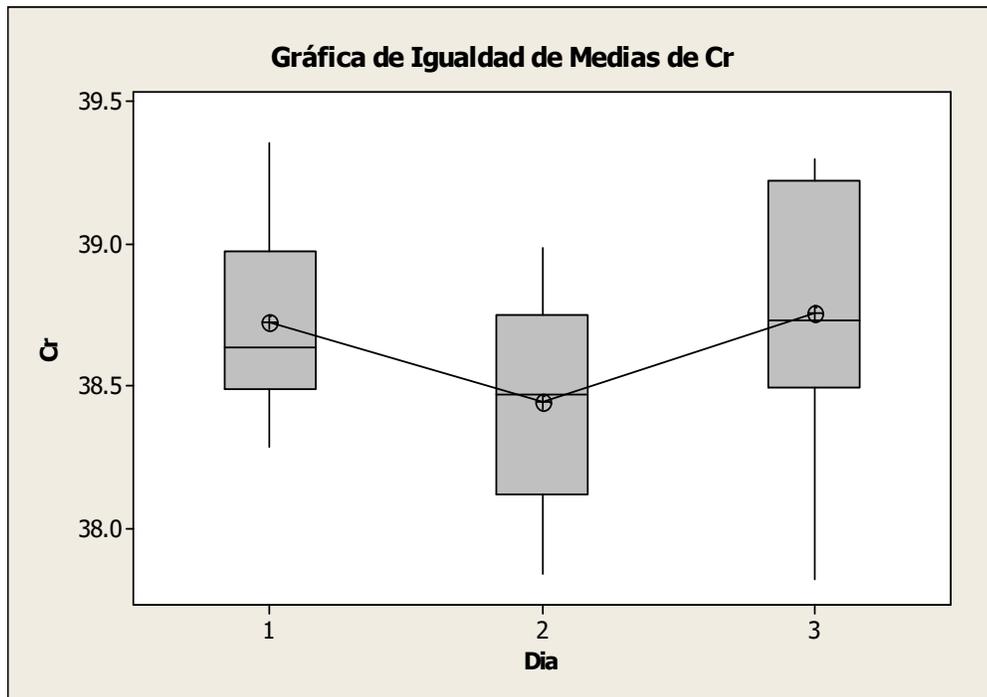


Figura N° 18 - Resultado de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos de la tabla N° 39

Como podemos observar el P-Value es igual 0,148 es mayor que el nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Aceptamos la hipótesis nula, por lo tanto no existe diferencia significativa entre los promedios al 95% de confianza.

Veracidad

La fortificación de la muestra se realizó en tres niveles teniendo cuidado que la suma de ambas cantidades, la del analito nativo y analito adicionado no supere la máxima cantidad cuantificable según la recta de calibrado, a continuación se muestran los resultados (ver tabla N° 43). Para evaluar la veracidad el promedio de todas las recuperaciones se sometió a una prueba de t de Student y se verificó que no existan diferencias significativas con el 100% de recuperación

Tabla N° 43 - Resultados de los ensayos de Recuperación realizado en tres niveles

MRC Adicionada (mg/kg)	Concentración Obtenida (mg Cr/Kg)			%Recuperación		
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
11,60	49,91	55,34	60,38	97,9	100,6	97,2
17,40	50,12	55,80	61,78	102,1	99,4	98,6
23,20	49,92	56,28	62,64	98,3	101,9	101,0
	50,69	56,96	62,48	101,2	103,3	99,9
	50,48	55,33	62,15	103,5	97,2	101,1
	49,96	55,96	61,56	97,0	102,3	98,8
	50,67	55,61	62,15	100,3	98,8	102,2
	50,55	55,82	61,97	100,9	97,9	101,1
	50,68	55,76	62,39	105,1	102,1	101,9
	50,87	55,79	62,68	99,3	98,0	101,0
Promedio	50,39	55,87	62,02	100,53	100,15	100,29
Desviación Estándar	0,37	0,47	0,68	2,56	2,18	1,60

Prueba T de una muestra: %Re Adición Cr

Variable	N	Media	Desv. Est.	Error estandar de la media	Intervalo de Confianza	P-Value
%Re Adición Cr	30	100,322	2,08	0,38	99,545 - 101,098	0,404

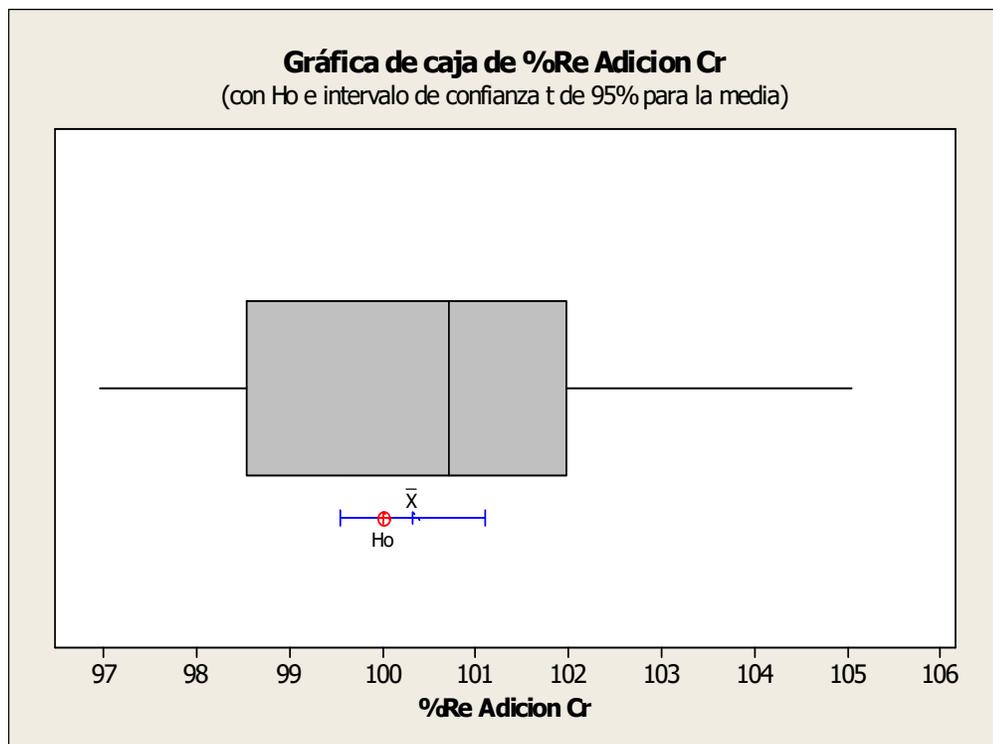


Figura N° 19 - Diagrama de Caja de la Prueba de t de Student

Precisión

La precisión fue estimada en condiciones de repetibilidad; analizando 30 replicas independientes de la muestra de ensayo, en un periodo de 3 días diferentes.

Tabla N° 44 - Resultados obtenidos para el cálculo de la precisión del Método

Concentración Promedio (mg/kg)	Desviación Estandar Repetibilidad (S_r)	% RSD_R Experimental	% RSD Horwitz	Limite de Repetibilidad (r) (mg/kg)	Criterio de precisión
45,59	0,54	1,20	9,01	1,5	$RSD_{Exp.} < RSD_{Horwitz}$

Linealidad y Rango de trabajo

Para la evaluación de la linealidad se utilizó las tres curvas de calibrado diseñadas anteriormente; primero se evaluaron las tres curvas de manera independiente y luego en conjunto.

Tabla N° 45 - Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas de las tablas N° 46, 47 y 48.

CURVA	Intercepto (a)	Pendiente (b)	(r)	Criterio de decisión	Conclusión
DIA 1	0,00024	0,0788	0,99994	$r > 0,9950$	r aceptable
DIA 2	0,00046	0,0785	0,99997		r aceptable
DIA 3	0,00016	0,0784	0,99985		r aceptable

Tabla N° 46 - Curva de Calibración Cr Día 20/05/2013	
Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,000	0,0002
0,200	0,0162
0,500	0,0388
1,000	0,0796
1,500	0,1192
2,000	0,1571
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99994
Coeficiente de determinación R ²	0,99988
R ² ajustado	0,99986
Error típico	0,00074
Observaciones	6
Con lo que podemos afirmar que nuestro R (0,99994)	

Tabla N° 47 - Curva de Calibración Cr Día 21/05/2013	
Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,000	0,0005
0,200	0,0159
0,500	0,0395
1,000	0,0794
1,500	0,1190
2,000	0,1569
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99997
Coeficiente de determinación R ²	0,99993
R ² ajustado	0,99992
Error típico	0,00055
Observaciones	6
Con lo que podemos afirmar que nuestro R (0,99997)	

Tabla N° 48 - Curva de Calibración Cr Día 22/05/2013	
Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,000	-0,0005
0,200	0,0157
0,500	0,0393
1,000	0,0796
1,500	0,1192
2,000	0,1555
<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99985
Coefficiente de determinación R ²	0,99969
R ² ajustado	0,99962
Error típico	0,00120
Observaciones	6
Con lo que podemos afirmar que nuestro R (0,99985)	

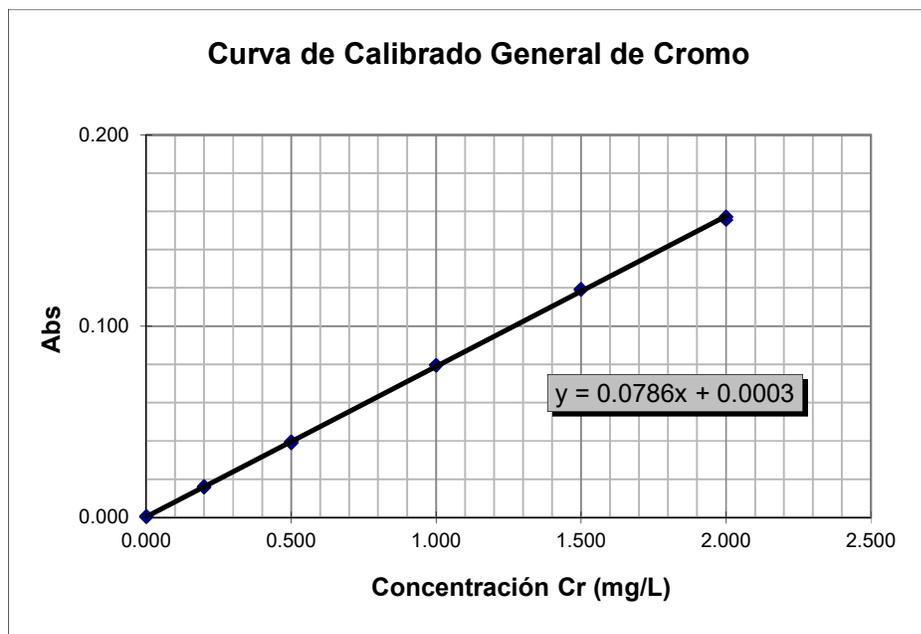


Figura N° 20 - Curva de Calibrado General

ECUACION	Absorbancia = 0,0786x Concentración + 0,0003
COEFICIENTE DE CORRELACION	El "r" obtenido es 0,99992 mayor a 0,9950 por lo tanto es aceptable.
ANALISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN	La regresión es significativa (F es mayor que el valor crítico de F), Por lo tanto la PENDIENTE es distinta de cero
	El INTERCEPTO de la regresión contiene al valor cero pues pertenece al intervalo de: [-0,000332341; 0,000910436]

Tabla Nº 49 – Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas evaluadas en conjunto

ESTADÍSTICAS DE LA REGRESIÓN						
Coefficiente de correlación (r)	0,99991					
Coefficiente de determinación (r^2)	0,99982					
r^2 ajustado	0,99981					
Error típico ($S_{Y/X}$)	0,00079					
Observaciones	18					
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)						
Origen de las Variaciones	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	Probabilidad
Puntos	1	0,056195335	0,056195335	0,933	1,901	0,3387
Réplicas	16	9,95486E-06	6,22179E-07			
Total	17	0,056205289				
INTERVALO DE CONFIANZA DEL INTERCEPTO Y LA PENDIENTE						
	Coefficientes	Error Típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepto (a)	0,0002829	0,0002931	0,98	0,3387	-0,000332341	0,000910436
Pendiente (b)	0,078583	0,0002614	300,53	1,90194E-31	0,078028839	0,079137461

Limite de Detección y Límite de Cuantificación

Los límites de detección y Cuantificación se estimaron por extrapolación a cero en la curva de regresión con soluciones de concentración baja del analito. A continuación se muestra las lecturas de los patrones:

Tabla N° 50 - Resultados de las lecturas de los patrones de concentración baja para el cálculo del límite de Detección y Cuantificación

Concentración (mg/L)	Absorbancia			Absorbancia Media	Desviación Estándar (s)
0,020	0,0075	0,0078	0,0081	0,0078	0,00030
0,025	0,0121	0,0128	0,0123	0,0124	0,00036
0,030	0,0156	0,0155	0,0152	0,0154	0,00021

La estimación de la señal del blanco: Y_{bk} se calculó de la ecuación de recta Absorbancia vs. Concentración (figura N° 21) y se extrapoló la absorbancia a concentración cero. La estimación de la desviación estándar del blanco: S_{bk} se calculó de la ecuación de recta "Concentración vs. Desviación estándar" (figura N° 22) y se extrapoló la desviación estándar a concentración cero.

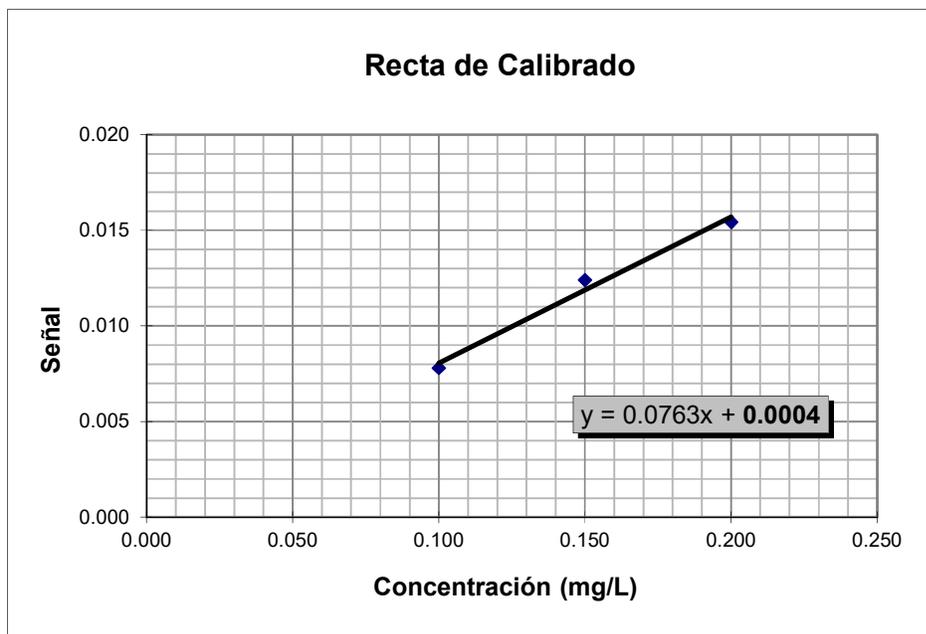


Figura N° 21 - Curva de Calibrado Absorbancia vs. Concentración para el cálculo del límite de detección y Cuantificación

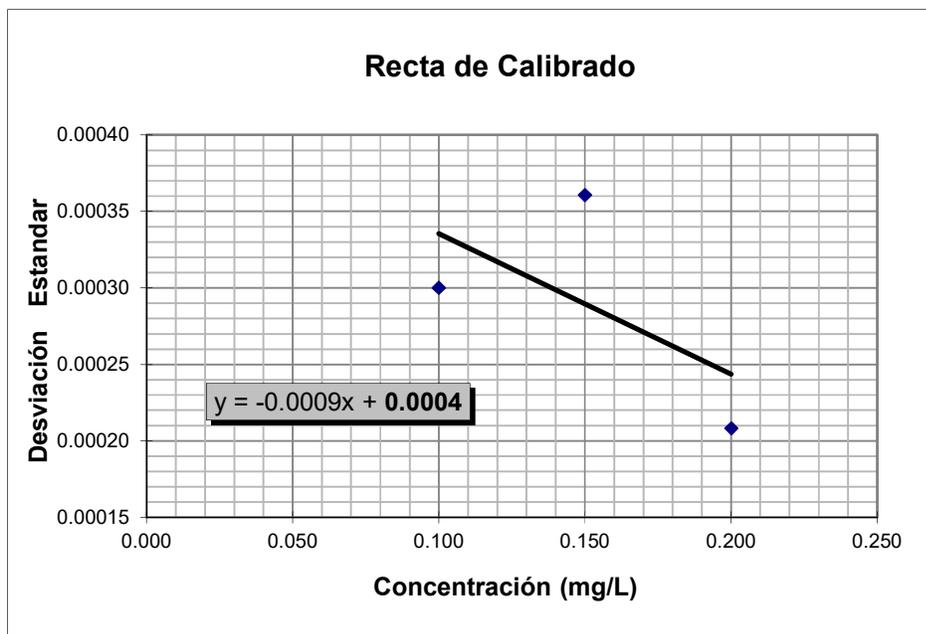


Figura N° 22 - Curva de Calibrado Desviación estándar vs. Concentración para el cálculo del límite de detección y Cuantificación

Para el cálculo de los parámetros se utilizó la ecuación de recta del análisis de regresión lineal de las curvas en conjunto (tabla N° 49 Regresión Lineal Combinada),

Tabla N° 51 - Resultados del cálculo del límite de Detección y límite de Cuantificación

Señal del Blanco (Y_{bk})	Desviación Estándar de Blanco (S_{bk})	Límite de Detección (LD)		Límite de Cuantificación (LC)	
		mg/L	mg/kg	mg/L	mg/kg
0,0004	0,0004	0,02	2,0	0,06	6,0

Sensibilidad

Se evaluó la sensibilidad en tres días tomando como referencia una solución patrón de 2,50 mg/L

Tabla N° 52 – Resultados del cálculo de la sensibilidad

Día	Concentración (mg/L)	Absorbancia	Sensibilidad (mg/L)
1	2,50	0,1987	0,0227
2	2,50	0,1991	0,0229
3	2,50	0,1995	0,0220
Promedio			0,0225

Robustez

Siguiendo el diseño de Plackett y Burman, para el análisis de robustez, se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en las tablas N° 53 y 54.

Tabla N° 53 - Resultados obtenidos en los ensayos para la determinación de Robustez

	Valor Observado	Valor Tabla	Conclusión
Variable A	0,405	0,764	El factor no influye
Variable B	0,715	0,764	El factor no influye
Variable C	0,525	0,764	El factor no influye

Tabla N° 54 - Resultado de la evaluación de la robustez

Variable	1	2	3	4
A o a	A	A	a	a
B o b	B	B	B	b
C o c	C	C	c	C
Resultado	37,75	37,56	38,68	37,44
S _r	0,54			

ANEXO N° 3: ANALISIS ESTADISTICO DE MANGANESO

Tabla N° 55 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Manganeso realizado el 27/05/2013

Concentración (mg/L)	Absorbancia Media	%RSD
0,00	0,0005	>100
1,00	0,0167	2,76
3,00	0,0502	1,54
5,00	0,0838	1,09
7,00	0,1152	0,65
9,00	0,1488	0,87

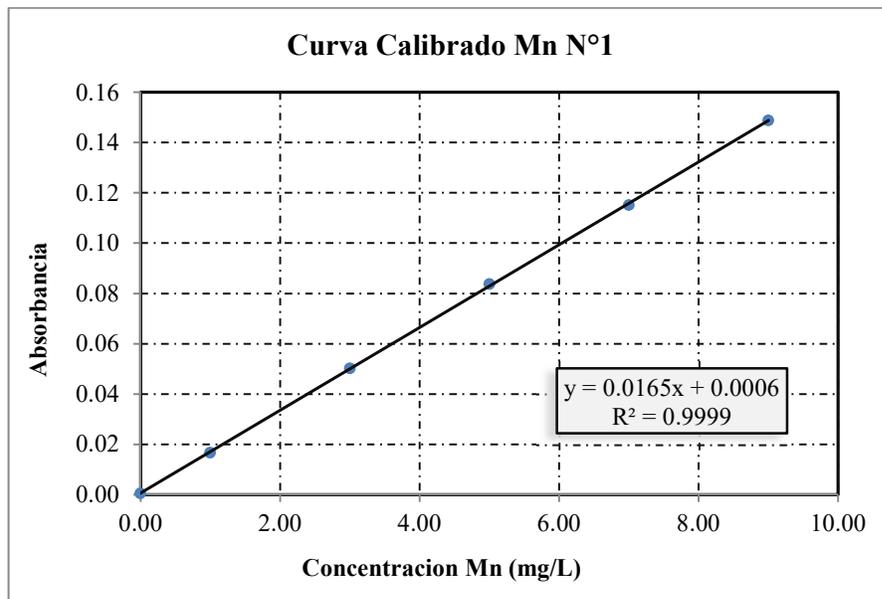


Figura N° 23 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 55

Tabla N° 56 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Manganeso realizado el 28/05/2013

Concentración (mg/L)	Absorbancia Media	%RSD
0,00	-0,0003	>100
1,00	0,0167	3,21
3,00	0,0505	1,98
5,00	0,0837	1,23
7,00	0,1154	0,98
9,00	0,1484	0,65

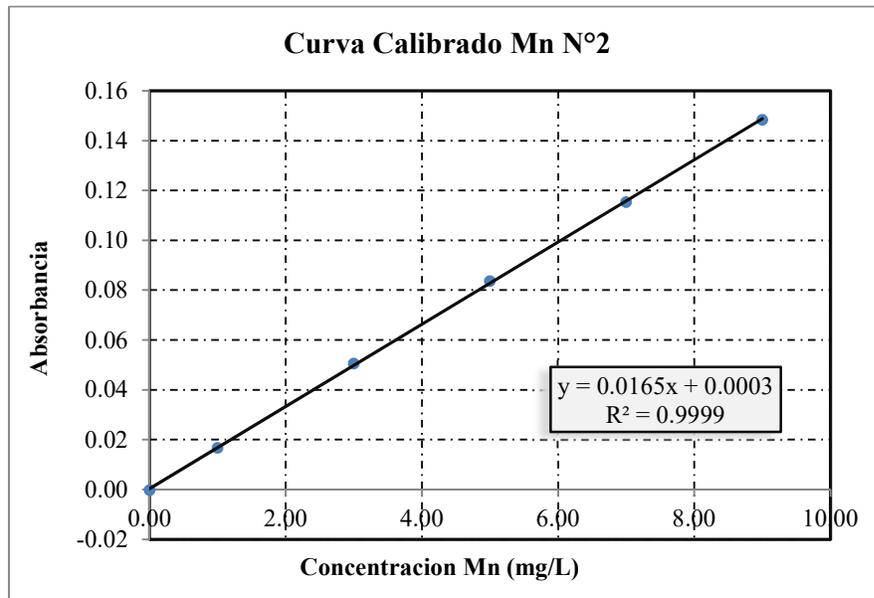


Figura N° 24 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N°56

Tabla N°57 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Manganeso realizado el 29/05/2013

Concentración (mg/L)	Absorbancia Media	%RSD
0,00	0,0007	>100
1,00	0,0167	2,94
3,00	0,0506	1,67
5,00	0,0841	1,09
7,00	0,1155	1,02
9,00	0,1482	0,87

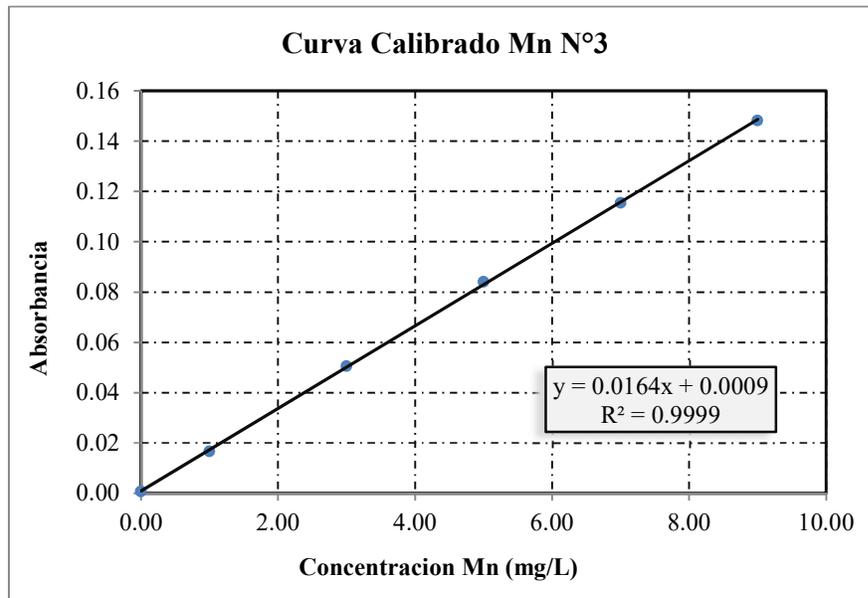


Figura N° 25 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 57

Tabla N° 58 - Resultados de la verificación de las Curvas de Calibrado de Manganeso

Curva de Calibrado	Concentración obtenida del Patrón Control de Mn			
	Inicio (mg/L)	% Recuperación	Final (mg/L)	% Recuperación
1	4,921	98,4	4,965	99,3
2	4,983	99,7	5,016	100,3
3	5,020	100,4	5,031	100,6

3.8 Expresión de Resultados

La muestra utilizada fue suelo homogenizado y tamizado, las 30 replicas se analizaron en tres días diferentes; en condiciones de repetibilidad. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos:

Tabla N°59 - Determinación de Manganeso en Suelos

Nro.	Concentración (mg Mn/Kg muestra)		
	27/05/2013	28/05/2013	29/05/2013
1	163,42 ± 7,42	162,61 ± 7,45	161,50 ± 7,44
2	163,93 ± 7,41	162,55 ± 7,46	163,65 ± 7,39
3	162,10 ± 7,45	162,45 ± 7,38	159,90 ± 7,38
4	162,30 ± 7,37	164,08 ± 7,39	163,83 ± 7,40
5	162,20 ± 7,39	160,59 ± 7,44	163,29 ± 7,41
6	163,63 ± 7,29	164,10 ± 7,40	163,83 ± 7,44
7	162,23 ± 7,38	160,70 ± 7,37	162,56 ± 7,20
8	160,55 ± 7,34	165,68 ± 7,36	162,42 ± 7,39
9	160,40 ± 7,36	165,12 ± 7,31	163,28 ± 7,38
10	162,13 ± 7,31	164,17 ± 7,37	161,50 ± 7,40
Media	162,29	163,20	162,58
Desviación Estándar	1,2	1,7	1,3
Media General	162,69		
Desviación Estándar General	1,40		

3.9 Tratamiento Estadístico de los Datos

Prueba de Normalidad de los datos

A continuación se muestra la Prueba de Normalidad de Anderson Darling aplicado a las 30 réplicas analizadas, para ello se contó con el paquete estadístico Minitab 16.

Ho: Los datos presentan una distribución de probabilidad normal.

Ha: Los datos no presentan una distribución de probabilidad normal.

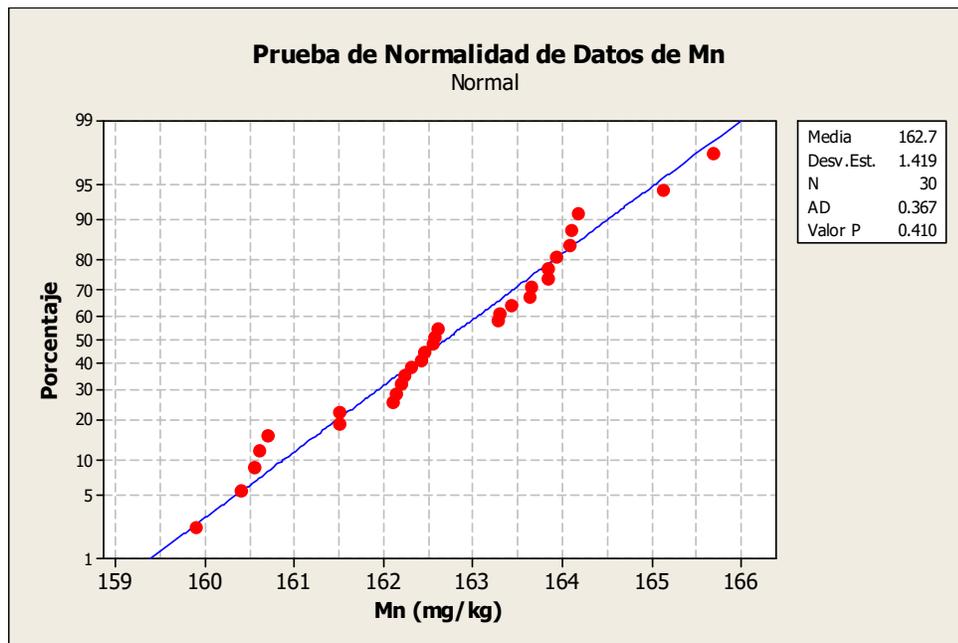


Figura N° 26 - Resultado de la Prueba de Normalidad por Anderson Darling de los datos de la tabla N°59

El Valor P obtenido es 0,410 mayor al nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Aceptamos la hipótesis nula, por lo tanto los resultados presentan una distribución de probabilidad normal al 95% de confianza.

Prueba de Grubbs

La existencia de datos anómalos o atípicos en los resultados de la tabla N°59 se verificó con la prueba de Grubbs:

Tabla N°60 - Parámetros obtenidos de la Prueba de Grubbs de los datos de la tabla N°59

Puntos Atípicos de Grubbs

Para poder aplicar este test, los datos deben de ser normales y aleatorios. Mediante este Test se prueba si existen datos atípicos, para eliminarlos del trabajo de investigación

Estadístico de Contraste

$$G = \frac{(x_{\text{máx-min}} - \bar{x})}{S}$$

$x_{\text{máx 0 mín}}$: Valores extremos: Máximos o Mínimos

\bar{x} : Promedio de los resultados

S : Desviación Estándar de conjunto de datos

Cálculos

Mn (mg/kg)		
Día 1	Día 2	Día 3
163.42	162.61	161.50
163.93	162.55	163.65
162.10	162.45	159.90
162.30	164.08	163.83
162.20	160.59	163.29
163.63	164.10	163.83
162.23	160.70	162.56
160.55	165.68	162.42
160.40	165.12	163.28
162.13	164.17	161.50

Promedio	162.690
Máximo Valor	165.68
Mínimo Valor	159.90
Desv. Estándar	1.419

Valores Experimentales	
$G_{\text{mínimo}}$	1.969
$G_{\text{máximo}}$	2.111

Significancia	0.05
N	30
K	3.74

Valores De Tabla	
G ($\alpha = 0,05$)	3.058

Conclusión

No existen valores atípicos en este conjunto de resultados

Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Bartlett

Se realizó a través de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Fisher. Esta prueba permitió verificar las varianzas, por tanto, la precisión de los datos obtenidos en días diferentes son significativamente iguales.

Ho: No existe diferencia significativa entre las varianzas

Ha: Al menos una de las varianzas es distinta a las otras

Tabla N°61 - Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Manganeso

Prueba de Homogeneidad de Varianzas al 95% Confianza				
Manganeso VS Analista				
Dia	N	Inferior	Desv. Est.	Superior
1	10	0,74836	1,17476	2,49998
2	10	1,09822	1,72394	3,66869
3	10	0,81748	1,28325	2,73086

Prueba de Bartlett (Distribución Normal)
Estadística de prueba = 1,45 p-value = **0,485**

Prueba de Levene (Cualquier Distribución Continua)
Estadística de prueba = 1,44 p-value = 0,254

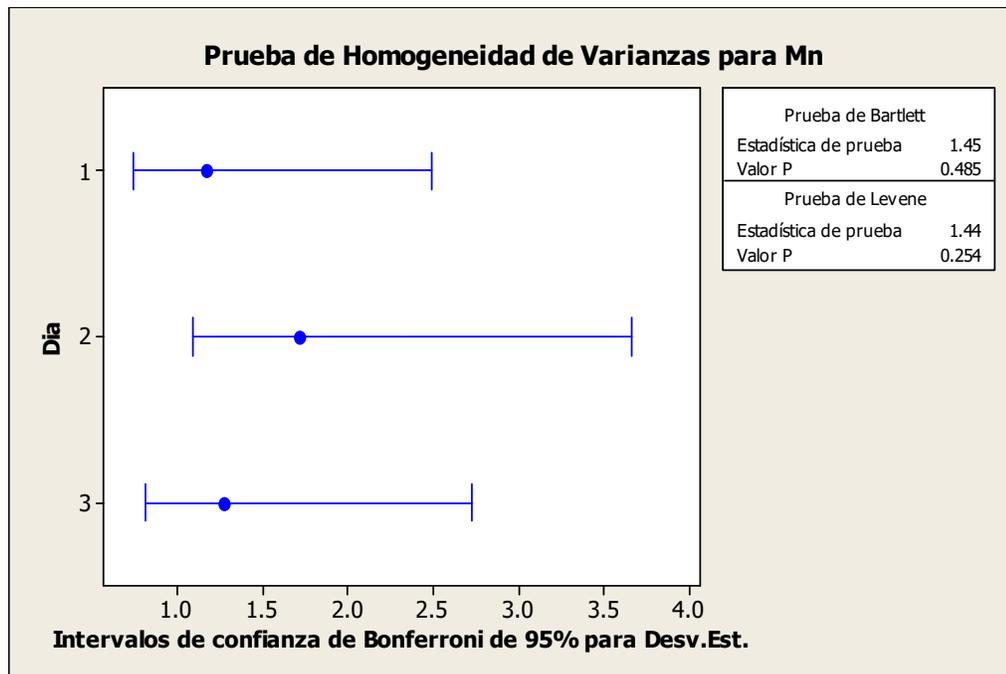


Figura N° 27 - Resultado de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos de la tabla N°59

El Valor P obtenido es 0,485 mayor al nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Aceptamos la hipótesis nula, por lo tanto podemos concluir que los resultados de los analistas tienen el mismo nivel de precisión al 95% de confianza.

Prueba de Igualdad de Medias de Tendencia Central

Para evaluar que los promedios de los datos obtenidos en diferentes días no difieren significativamente se realizó la prueba de ANOVA de un factor.

Ho: No existe diferencia significativa entre las promedios

Ha: Al menos una de los promedios es diferente a los otros.

Tabla N°62 - Prueba de Igualdad de Medias de Manganeso.

Prueba de ANOVA de un factor					
Manganeso Vs Analista					
Fuente	GL	SC	MC	F	P
Analista	2	4,39	2,19	1,1	0,348
Error	27	53,99	2,00		
Total	29	58,37			

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada			
Dia	N	Media	Desv. Est.
1	10	162,290	1,170
2	10	163,200	1,720
3	10	162,580	1,280

-----+-----+-----+-----+-----
(-----*-----)
(-----*-----)
(-----*-----)
-----+-----+-----+-----+-----
161,70 162,40 163,10 163,80

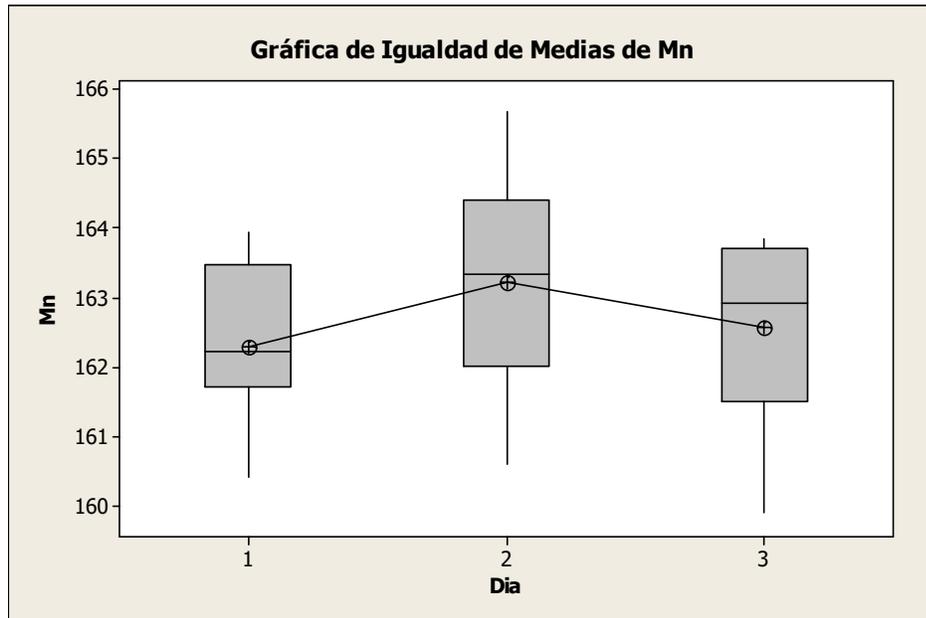


Figura N° 28 - Resultado de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos de la tabla N° 59

Como podemos observar el P-Value es igual 0.348 es mayor que el nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Aceptamos la hipótesis nula, por lo tanto no existe diferencia significativa entre los promedios al 95% de confianza.

Veracidad

La fortificación de la muestra se realizó en tres niveles teniendo cuidado que la suma de ambas cantidades, la del analito nativo y analito adicionado no supere la máxima cantidad cuantificable según la recta de calibrado, a continuación se muestran los resultados (ver tabla N°63). Para evaluar la veracidad el promedio de todas las recuperaciones se sometió a una prueba de t de Student y se verificó que no existan diferencias significativas con el 100% de recuperación

Tabla N° 63 - Resultados de los ensayos de Recuperación realizado en tres niveles

MRC Adicionada (mg/kg)	Concentración Obtenida (mg Mn/Kg)			%Recuperación		
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
115,40	279,33	335,11	391,14	100,4	99,7	99,5
173,10	280,36	336,15	393,58	100,9	100,3	99,6
230,80	279,58	334,12	392,47	101,8	99,2	100,8
	279,69	336,44	392,07	101,7	99,6	98,9
	276,98	334,51	397,58	99,5	100,5	101,5
	278,84	339,14	393,05	99,8	101,1	99,3
	276,59	333,36	396,15	99,1	99,7	101,2
	276,95	341,59	391,11	100,9	101,6	99,1
	274,56	339,64	397,58	98,9	100,8	101,5
	274,61	334,20	389,31	97,5	98,2	98,7
Promedio	277,75	336,43	393,40	100,05	100,07	100,01
Desviación Estándar	2,11	2,78	2,84	1,36	1,00	1,12

Prueba T de una muestra: %Re Adición Mn

Variable	N	Media	Desv. Est.	Error estándar de la media	Intervalo de Confianza	P-Value
%Re Adición Mn	30	100,045	1,129	0,206	99,623 - 100,466	0.829

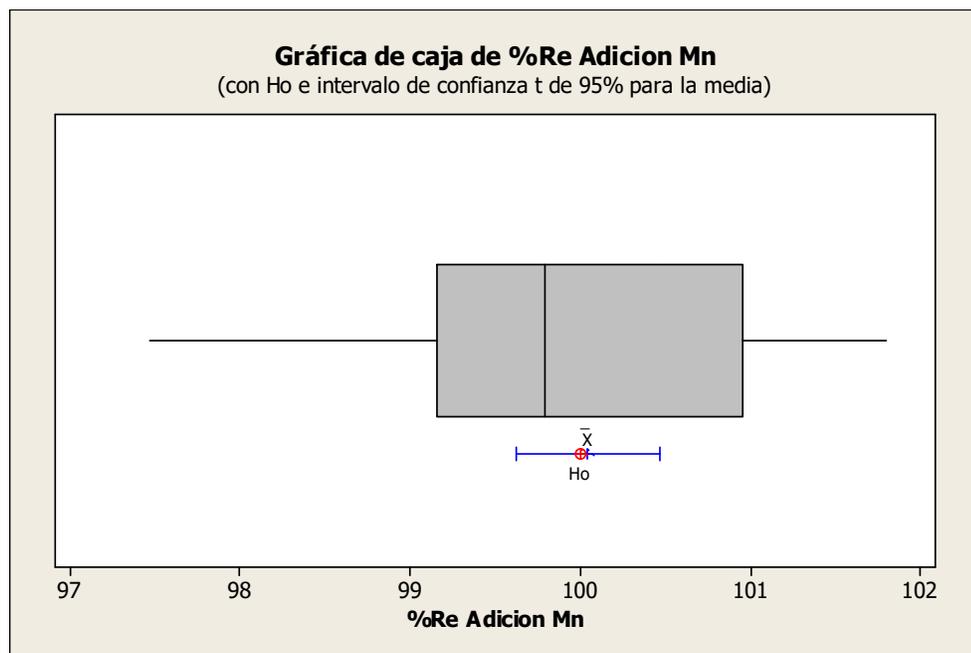


Figura N° 29 - Diagrama de Caja de la Prueba de t de Student

Precisión

La precisión fue estimada en condiciones de repetibilidad; analizando 30 replicas independientes de la muestra de ensayo, en un periodo de 3 días diferentes.

Tabla N°64 - Resultados obtenidos para el cálculo de la precisión del Método

Concentración Promedio (mg/kg)	Desviación Estandar Repetibilidad (S _r)	% RSD _R Experimental	% RSD Horwitz	Limite de Repetibilidad (r) (mg/kg)	Criterio de precisión
231,02	1,75	0,80	7,05	4,9	RSD _{Exp.} < RSD Horwitz

Linealidad y Rango de trabajo

Para la evaluación de la linealidad se utilizó las tres curvas de calibrado diseñadas anteriormente; primero se evaluaron las tres curvas de manera independiente y luego en conjunto.

Tabla N° 65 - Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas de las tablas 66, 67 y 68.

CURVA	Intercepto (a)	Pendiente (b)	(r)	Criterio de decisión	Conclusión
DIA 1	0,00058	0,0165	0,99996	r > 0,9950	r aceptable
DIA 2	0,00034	0,0165	0,99994		r aceptable
DIA 3	0,00089	0,0164	0,99993		r aceptable

Tabla N°66 - Curva de Calibración Mn Día 27/05/2013	
Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,000	0,0005
1,000	0,0167
3,000	0,0502
5,000	0,0838
7,000	0,1152
9,000	0,1488
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99996
Coefficiente de determinación R ²	0,99992
R ² ajustado	0,99990
Error típico	0,00059
Observaciones	6
Con lo que podemos afirmar que nuestro R (0,99996)	

Tabla N° 67 - Curva de Calibración Mn Día 28/05/2013	
Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,000	-0,0003
1,000	0,0167
3,000	0,0505
5,000	0,0837
7,000	0,1154
9,000	0,1484
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99994
Coefficiente de determinación R ²	0,99988
R ² ajustado	0,99985
Error típico	0,00070
Observaciones	6
Con lo que podemos afirmar que nuestro R (0,99994)	

Tabla N° 68 - Curva de Calibración Mn Día 29/05/2013	
Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,000	0,0007
1,000	0,0167
3,000	0,0506
5,000	0,0841
7,000	0,1155
9,000	0,1482
<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99993
Coeficiente de determinación R ²	0,99987
R ² ajustado	0,99983
Error típico	0,00074
Observaciones	6
Con lo que podemos afirmar que nuestro R (0,99993)	

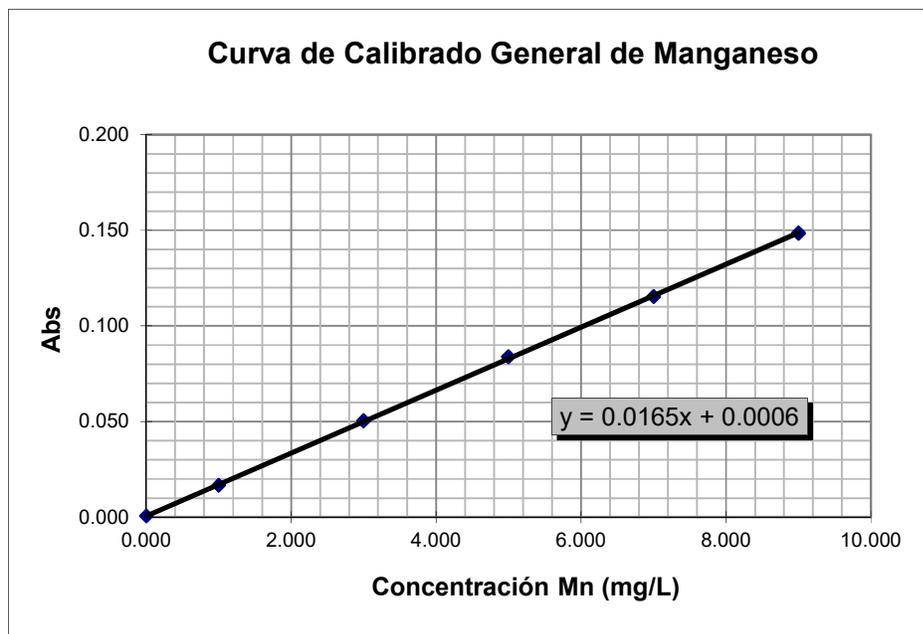


Figura N° 30 - Curva de Calibrado General

ECUACION	Absorbancia = 0,0165x Concentración + 0.0006
COEFICIENTE DE CORRELACION	El "r" obtenido es 0.99994 mayor a 0.9950 por lo tanto es aceptable.
ANALISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN	<p>La regresión es significativa (F es mayor que el valor crítico de F), Por lo tanto la PENDIENTE es distinta de cero</p> <p>El INTERCEPTO de la regresión contiene al valor cero pues pertenece al intervalo de: [-0,000102285; 0,0001100455]</p>

Tabla N°69 – Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas evaluadas en conjunto

ESTADÍSTICAS DE LA REGRESIÓN						
Coefficiente de correlación (r)	0,99994					
Coefficiente de determinación (r ²)	0,99988					
r ² ajustado	0,99987					
Error típico (S _{YIX})	0,00061					
Observaciones	18					
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)						
Origen de las Variaciones	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	Probabilidad
Puntos	1	0,049451053	0,049451053	0,416	1,896	0,021
Réplicas	16	5,88526E-06	3,67829E-07			
Total	17	0,049456938				
INTERVALO DE CONFIANZA DEL INTERCEPTO Y LA PENDIENTE						
	Coefficientes	Error Típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepto (a)	0,000601	0,0002354	2,55	0,021	-0,000102285	0,001100455
Pendiente (b)	0,016461	4,48943E-05	366,66	0,000	0,016365833	0,016556176

Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Los límites de detección y Cuantificación se estimaron por extrapolación a cero en la curva de regresión con soluciones de concentración baja del analito. A continuación se muestra las lecturas de los patrones:

Tabla N° 70 - Resultados de las lecturas de los patrones de concentración baja para el cálculo del límite de Detección y Cuantificación

Concentración (mg/L)	Absorbancia			Absorbancia Media	Desviación Estándar (s)
0,10	0,0037	0,0031	0,0034	0,0034	0,00030
0,15	0,0043	0,0044	0,0044	0,0044	0,00006
0,20	0,0049	0,0051	0,0049	0,0050	0,00012

La estimación de la señal del blanco: Y_{bk} se calculó de la ecuación de recta Absorbancia vs. Concentración (figura N° 31) y se extrapoló la absorbancia a concentración cero. La estimación de la desviación estándar del blanco: S_{bk} se calculó de la ecuación de recta "Concentración vs. Desviación estándar" (figura N° 32) y se extrapoló la desviación estándar a concentración cero.

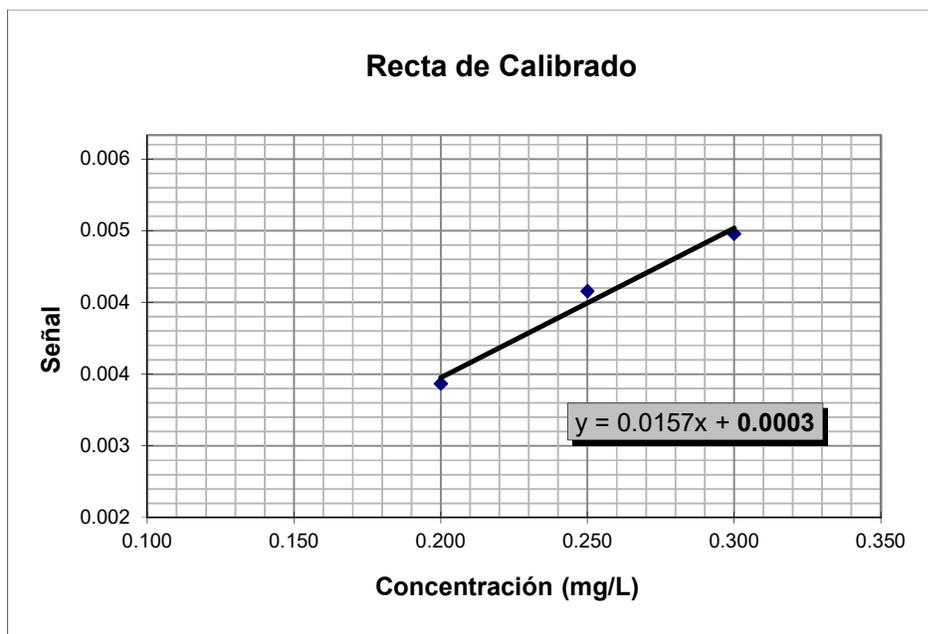


Figura N° 31 - Curva de Calibrado Absorbancia vs. Concentración para el cálculo del límite de detección y Cuantificación

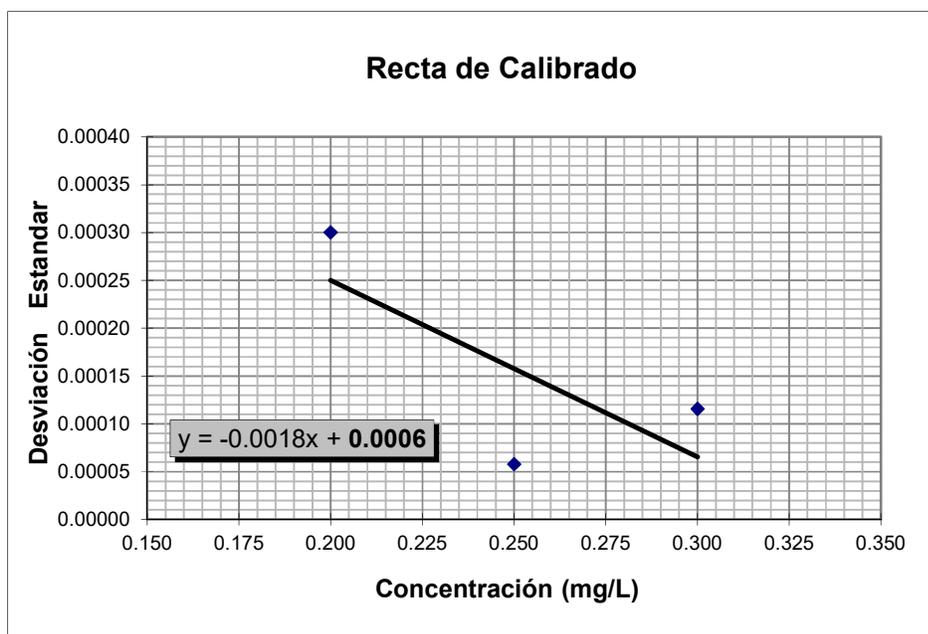


Figura N° 32 - Curva de Calibrado Desviación estándar vs. Concentración para el cálculo del límite de detección y Cuantificación

Para el cálculo de los parámetros se utilizó la ecuación de recta del análisis de regresión lineal de las curvas en conjunto (tabla N° 69- Regresión Lineal Combinada),

Tabla N° 71 - Resultados del cálculo del límite de Detección y límite de Cuantificación

Señal del Blanco (Y_{bk})	Desviación Estándar de Blanco (S_{bk})	Límite de Detección (LD)		Límite de Cuantificación (LC)	
		mg/L	mg/kg	mg/L	mg/kg
0,0003	0,0006	0,02	2,0	0,06	6,0

Sensibilidad

Se evaluó la sensibilidad en tres días tomando como referencia una solución patrón de 12,0 mg/L

Tabla N°72 – Resultados del cálculo de la sensibilidad

Día	Concentración (mg/L)	Absorbancia	Sensibilidad (mg/L)
1	12,00	0,1965	0,0987
2	12,00	0,1959	0,1051
3	12,00	0,1971	0,0997
Promedio			0,1012

Robustez

Seguendo el diseño de Placket y Burman, para el análisis de robustez, se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en las tablas N°73 y 74.

Tabla N° 73 - Resultados obtenidos en los ensayos para la determinación de Robustez

	Valor Observado	Valor Tabla	Conclusión
Variable A	0,755	2,475	El factor no influye
Variable B	0,335	2,475	El factor no influye
Variable C	0,365	2,475	El factor no influye

Tabla N°74 - Resultado de la evaluación de la robustez

Variable	1	2	3	4
A o a	A	A	a	a
B o b	B	b	B	b
C o c	C	c	c	C
Resultado	162,96	162,26	163,35	163,38
S _r	1,75			

ANEXO N° 4: ANALISIS ESTADISTICO DE NIQUEL

Tabla N°75 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Niquel realizado el 03/06/2013

Concentración (mg/L)	Absorbancia Media	%RSD
0,00	0,0003	>100
0,50	0,0498	2,54
1,00	0,1005	1,25
1,50	0,1506	0,95
2,00	0,1994	0,74
2,50	0,2479	0,85

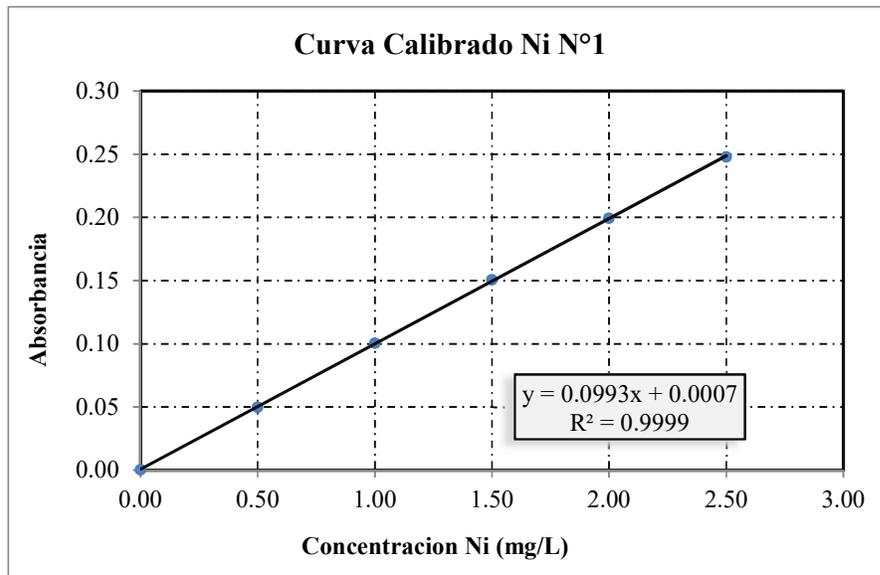


Figura N° 44 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N°75

Tabla N°76 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Niquel realizado el 04/06/2013

Concentración (mg/L)	Absorbancia Media	%RSD
0,00	0,0000	>100
0,50	0,0502	3,14
1,00	0,1008	1,81
1,50	0,1511	1,01
2,00	0,1998	0,47
2,50	0,2481	0,65

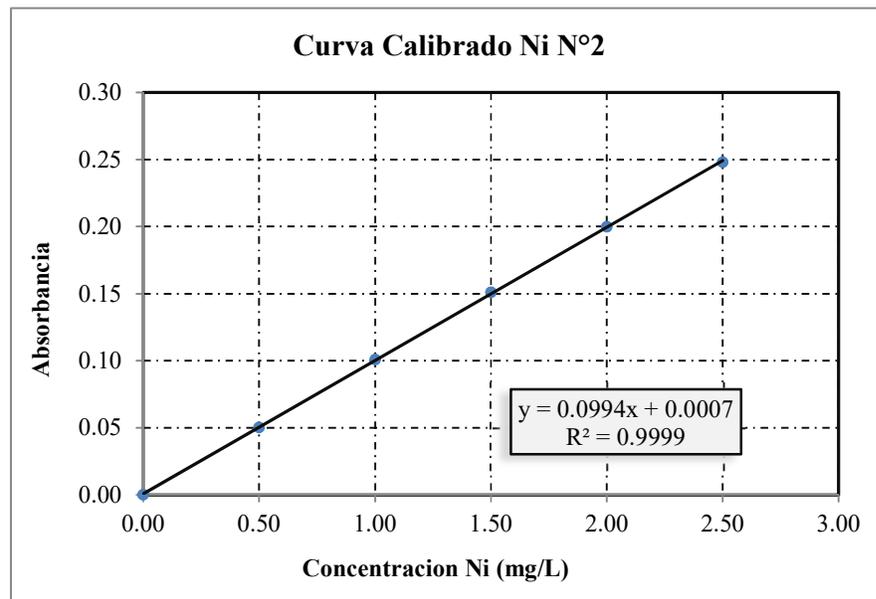


Figura N° 34 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N° 76

Tabla N°77 - Absorbancias media de los patrones utilizados en la Curva de Calibrado Niquel realizado el 05/06/2013

Concentración (mg/L)	Absorbancia Media	%RSD
0,00	-0,0002	>100
0,50	0,0505	1,59
1,00	0,1007	0,93
1,50	0,1510	0,61
2,00	0,1998	0,58
2,50	0,2482	0,74

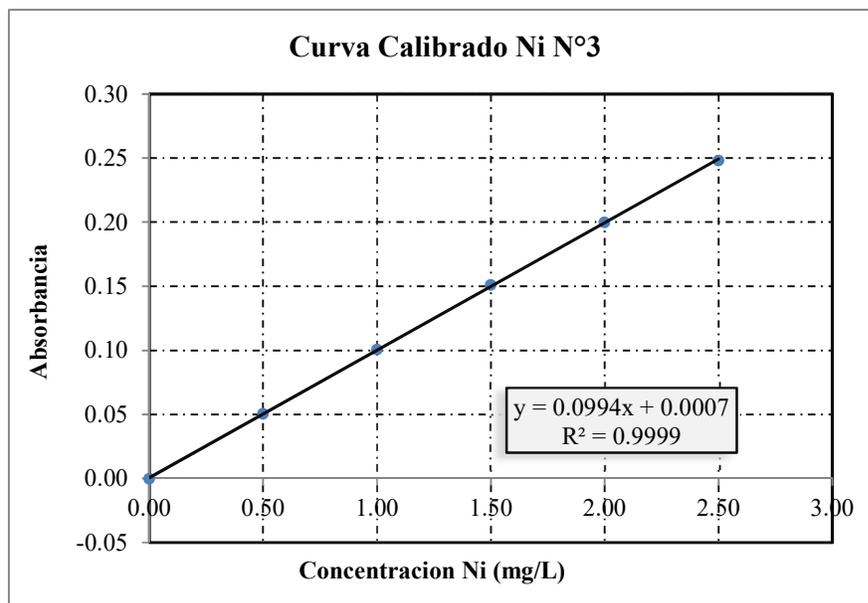


Figura N° 35 - Curva de Calibrado realizado con los patrones de la tabla N°77

Tabla N°78 - Resultados de la verificación de las Curvas de Calibrado de Niquel

Curva de Calibrado	Concentración obtenida del Patrón Control de Ni			
	Inicio (mg/L)	% Recuperación	Final (mg/L)	% Recuperación
1	0,992	99,2	0,996	99,6
2	0,998	99,8	1,012	101,2
3	1,021	102,1	1,013	101,3

3.11 Expresión de Resultados

La muestra utilizada fue suelo homogenizado y tamizado, las 30 replicas se analizaron en tres días diferentes; en condiciones de repetibilidad. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos:

Tabla N°79 - Determinación de Ni en Suelos

Nro.	Concentración (mg Ni/Kg muestra)		
	03/06/2013	04/06/2013	05/06/2013
1	42,06 ± 1,80	42,26 ± 1,81	41,73 ± 1,80
2	41,79 ± 1,79	41,51 ± 1,75	41,65 ± 1,81
3	41,26 ± 1,77	41,87 ± 1,77	41,26 ± 1,75
4	42,69 ± 1,76	42,00 ± 1,76	42,03 ± 1,76
5	42,34 ± 1,60	41,92 ± 1,74	41,94 ± 1,81
6	41,83 ± 1,75	42,38 ± 1,76	41,89 ± 1,79
7	42,60 ± 1,68	42,70 ± 1,77	41,97 ± 1,81
8	41,48 ± 1,78	41,91 ± 1,81	42,35 ± 1,75
9	42,02 ± 1,80	42,50 ± 1,79	42,55 ± 1,73
10	42,36 ± 1,71	42,84 ± 1,80	42,86 ± 1,77
Media	42,04	42,19	42,02
Desviación Estándar	0,5	0,4	0,5
Media General	42,09		
Desviación Estándar General	0,44		

3.12 Tratamiento Estadístico de los Datos

Prueba de Normalidad de los datos

A continuación se muestra la Prueba de Normalidad de Anderson Darling aplicado a las 30 réplicas analizadas, para ello se contó con el paquete estadístico Minitab 16.

H₀: Los datos presentan una distribución de probabilidad normal.

H_a: Los datos no presentan una distribución de probabilidad normal

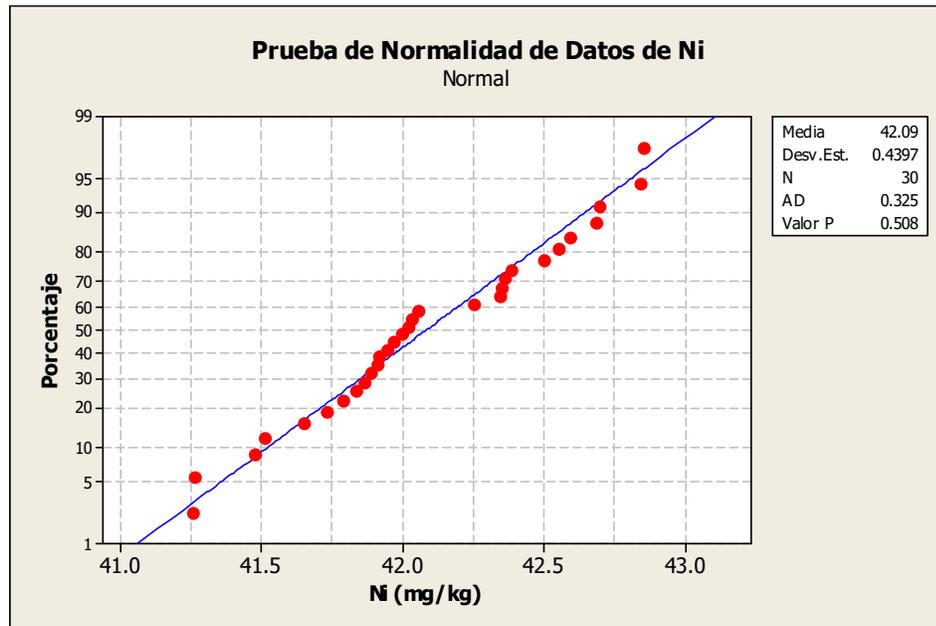


Figura N° 36 - Resultado de la Prueba de Normalidad por Anderson Darling de los datos de la tabla N° 79.

El Valor P obtenido es 0,508 mayor al nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Aceptamos la hipótesis nula, por lo tanto los resultados presentan una distribución de probabilidad normal al 95% de confianza

Prueba de Grubbs

La existencia de datos anómalos o atípicos en los resultados de la tabla N°79 se verificó con la prueba de Grubbs:

Tabla N° 80 - Parámetros obtenidos de la Prueba de Grubbs de los datos de la tabla N° 79.

Puntos Atípicos de Grubbs

Para poder aplicar este test, los datos deben de ser normales y aleatorios. Mediante este Test se prueba si existen datos atípicos, para eliminarlos del trabajo de investigación

Estadístico de Contraste

$$G = \frac{(x_{\text{máx-min}} - \bar{x})}{S}$$

$x_{\text{máx 0 mín}}$: Valores extremos: Máximos o Mínimos
 \bar{x} : Promedio de los resultados
 s : Desviación Estándar de conjunto de datos

Cálculos

Ni (mg/kg)		
Día 1	Día 2	Día 3
42.06	42.26	41.73
41.79	41.51	41.65
41.26	41.87	41.26
42.69	42.00	42.03
42.34	41.92	41.94
41.83	42.38	41.89
42.60	42.70	41.97
41.48	41.91	42.35
42.02	42.50	42.55
42.36	42.84	42.86

Promedio	42.085
Máximo Valor	42.86
Mínimo Valor	41.26
Desv. Estándar	0.440

Valores Experimentales	
$G_{\text{mínimo}}$	1.879
$G_{\text{máximo}}$	1.756

Significancia	0.05
N	30
K	3.74

Valores De Tabla	
$G(\alpha = 0,05)$	3.058

Conclusión

No existen valores atípicos en este conjunto de resultados

Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Bartlett

Se realizó a través de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Fisher. Esta prueba permitió verificar las varianzas, por tanto, la precisión de los datos obtenidos en días diferentes son significativamente iguales.

Ho: No existe diferencia significativa entre las varianzas

Ha: Al menos una de las varianzas es distinta a las otras

Tabla N°81 - Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Niquel.

Prueba de Homogeneidad de Varianzas al 95% Confianza				
Niquel VS Analista				
Dia	N	Inferior	Desv. Est.	Superior
1	10	0,295951	0,464574	0,988651
2	10	0,267176	0,419403	0,892524
3	10	0,293953	0,461436	0,981974
Prueba de Bartlett (Distribución Normal) Estadística de prueba = 0,11 p-value = 0,947				
Prueba de Levene (Cualquier Distribución Continua) Estadística de prueba = 0,05 p-value = 0,952				

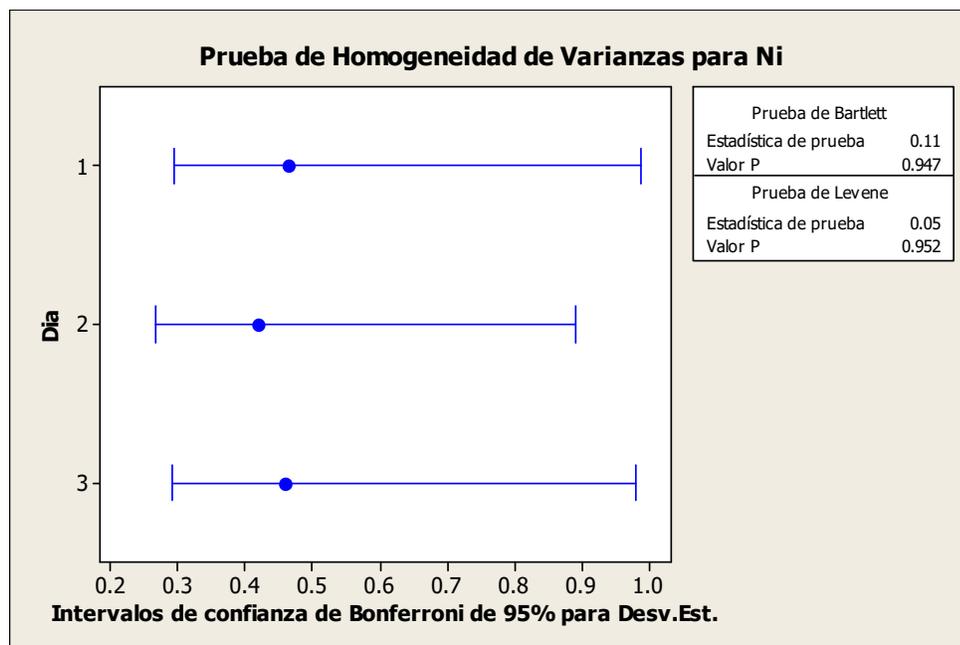


Figura N° 37 - Resultado de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos de la tabla N° 79.

El Valor P obtenido es 0,947 mayor al nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Aceptamos la hipótesis nula, por lo tanto podemos concluir que los resultados de los analistas tienen el mismo nivel de precisión al 95% de confianza.

Prueba de Igualdad de Medias de Tendencia Central

Para evaluar que los promedios de los datos obtenidos en diferentes días no difieren significativamente se realizó la prueba de ANOVA de un factor.

Ho: No existe diferencia significativa entre las promedios

Ha: Al menos una de los promedios es diferente a los otros.

Tabla N° 82 - Prueba de Igualdad de Medias de Niquel.

Prueba de ANOVA de un factor					
Niquel Vs Analista					
Fuente	GL	SC	MC	F	P
Analista	2	0,164	0,082	0,41	0,669
Error	27	5,442	0,202		
Total	29	5,606			

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada			
Dia	N	Media	Desv. Est.
1	10	42,044	0,465
2	10	42,189	0,419
3	10	42,023	0,461

---+-----+-----+-----+-----			
(-----*-----)			
(-----*-----)			
(-----*-----)			
---+-----+-----+-----+-----			
41.80	42.00	42.20	42.40

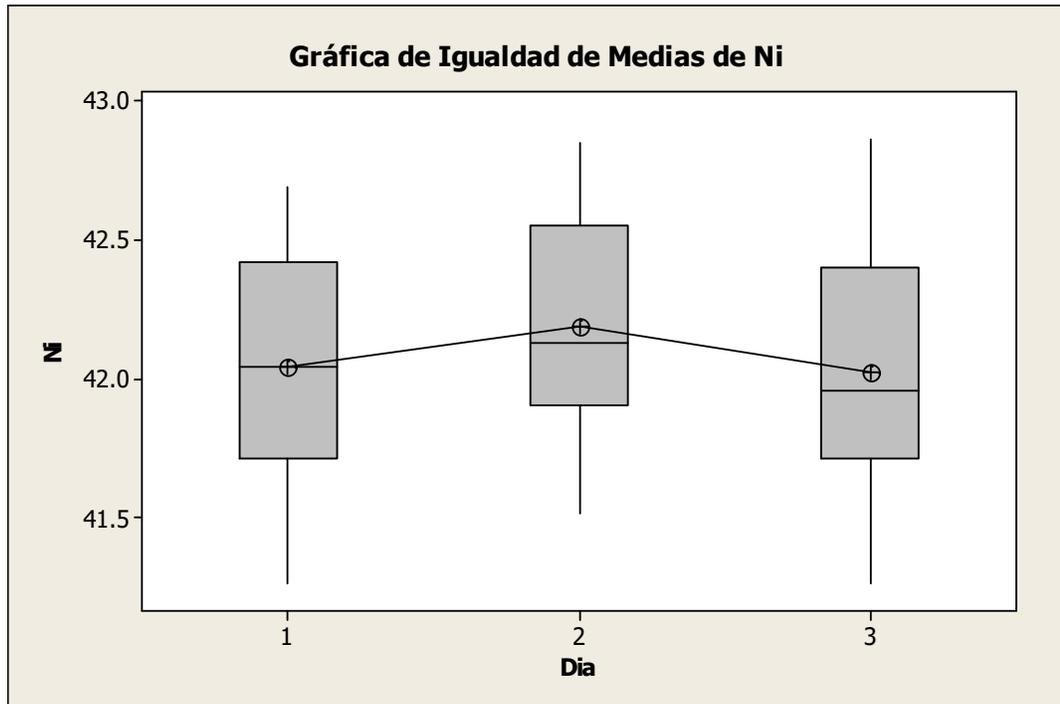


Figura N° 38 - Resultado de la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos de la tabla N° 79.

Como podemos observar el P-Value es igual 0.669 es mayor que el nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Aceptamos la hipótesis nula, por lo tanto no existe diferencia significativa entre los promedios al 95% de confianza.

Veracidad

La fortificación de la muestra se realizó en tres niveles teniendo cuidado que la suma de ambas cantidades, la del analito nativo y analito adicionado no supere la máxima cantidad cuantificable según la recta de calibrado, a continuación se muestran los resultados (ver tabla N°83). Para evaluar la veracidad el promedio de todas las recuperaciones se sometió a una prueba de t de Student y se verificó que no existan diferencias significativas con el 100% de recuperación

Tabla N° 83 - Resultados de los ensayos de Recuperación realizado en tres niveles

MRC Adicionada (mg/kg)	Concentración Obtenida (mg Ni/Kg)			%Re		
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
11,80	53,96	59,86	64,89	100,9	99,5	98,1
17,70	53,85	59,11	65,59	102,2	99,4	101,4
23,60	53,13	59,87	64,66	100,6	101,7	99,2
	54,05	59,80	65,93	96,3	100,6	101,3
	53,98	59,93	65,21	98,6	101,8	98,6
	53,60	59,97	64,94	99,7	99,4	97,7
	54,45	59,78	65,47	100,5	96,5	99,6
	53,68	59,11	66,23	103,4	97,2	101,2
	53,42	60,58	66,47	96,6	102,1	101,4
	54,36	60,95	66,88	101,7	102,3	101,8
Promedio	53,85	59,90	65,63	100,04	100,04	100,02
Desviación Estándar	0,41	0,56	0,74	2,30	2,04	1,56

Prueba T de una muestra: %Re Adición Ni

Variable	N	Media	Desv. Est.	Error estándar de la media	Intervalo de Confianza	P-Value
%Re Adición Ni	30	100,03	1,921	0,351	99,313 - 100,748	0,931

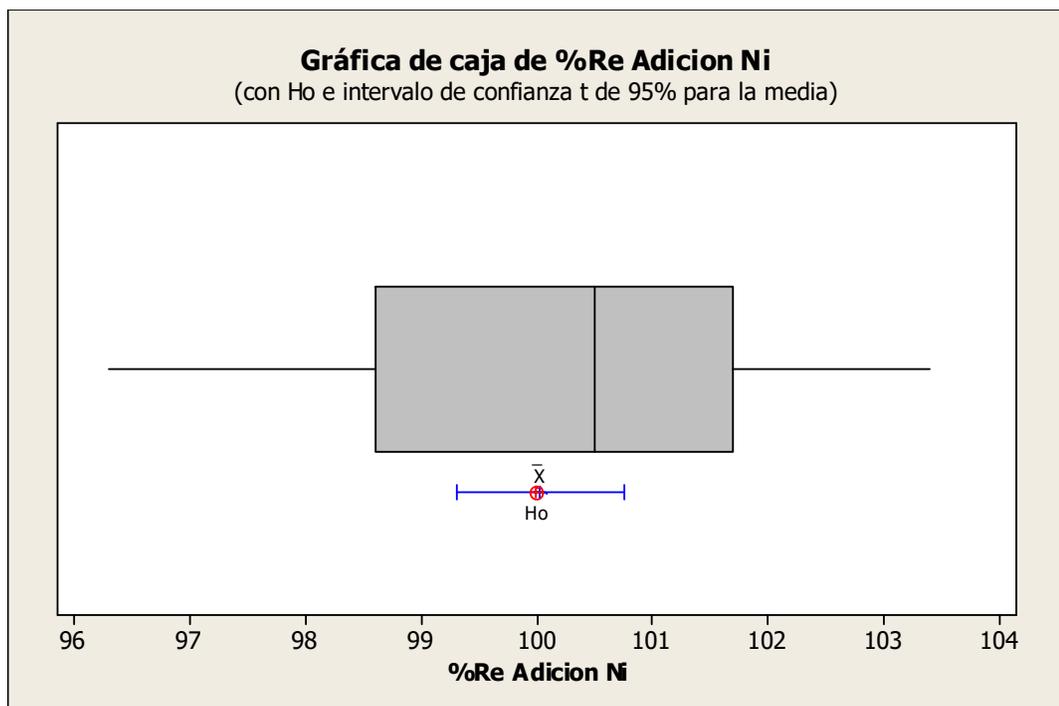


Figura N° 39 - Diagrama de Caja de la Prueba de t de Student

Precisión

La precisión fue estimada en condiciones de repetibilidad; analizando 30 replicas independientes de la muestra de ensayo, en un periodo de 3 días diferentes.

Tabla N° 84 - Resultados obtenidos para el cálculo de la precisión del Método

Concentración Promedio (mg/kg)	Desviación Estandar Repetibilidad (S_r)	% RSD _R Experimental	% RSD Horwitz	Limite de Repetibilidad (r) (mg/kg)	Criterio de precisión
57,24	0,74	1,34	8,70	2,1	RSD _{Exp.} < RSD Horwitz

Linealidad y Rango de trabajo

Para la evaluación de la linealidad se utilizó las tres curvas de calibrado diseñadas anteriormente; primero se evaluaron las tres curvas de manera independiente y luego en conjunto.

Tabla N°85 - Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas de las tablas N° 86, 87 y 88.

CURVA	Intercepto (a)	Pendiente (b)	(r)	Criterio de decisión	Conclusión
DIA 1	0,00069	0,0993	0,99997	r > 0,9950	r aceptable
DIA 2	0,00074	0,0994	0,99995		r aceptable
DIA 3	0,00070	0,0994	0,99996		r aceptable

Tabla N° 86 - Curva de Calibración Ni Día 03/06/2013	
Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,000	0,0003
0,500	0,0498
1,000	0,1005
1,500	0,1506
2,000	0,1994
2,500	0,2479
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99997
Coefficiente de determinación R ²	0,99994
R ² ajustado	0,99992
Error típico	0,00082
Observaciones	6
Con lo que podemos afirmar que nuestro R (0,99997)	

Tabla N° 87 - Curva de Calibración Ni Día 04/06/2013	
Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,000	0,0000
0,500	0,0502
1,000	0,1008
1,500	0,1511
2,000	0,1998
2,500	0,2481
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99995
Coefficiente de determinación R ²	0,99991
R ² ajustado	0,99988
Error típico	0,00100
Observaciones	6
Con lo que podemos afirmar que nuestro R (0,99995)	

Tabla N° 88 - Curva de Calibración Ni Día 05/06/2013	
Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,000	-0,0002
0,500	0,0505
1,000	0,1007
1,500	0,1510
2,000	0,1998
2,500	0,2482
<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99996
Coeficiente de determinación R ²	0,99991
R ² ajustado	0,99989
Error típico	0,00096
Observaciones	6
Con lo que podemos afirmar que nuestro R (0,99996)	

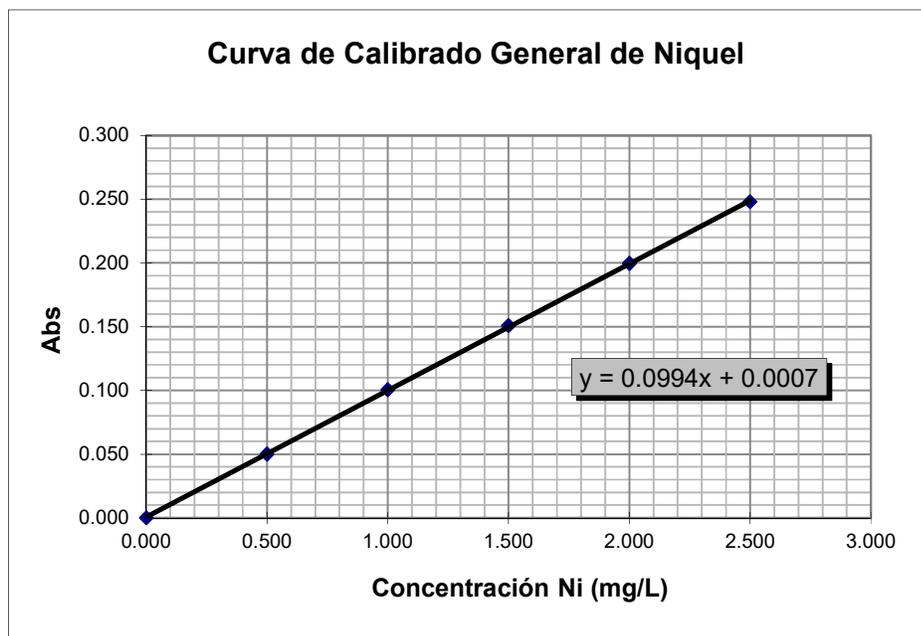


Figura N° 40 - Curva de Calibrado General

ECUACION	Absorbancia = 0,0994xConcentración + 0,0007
COEFICIENTE DE CORRELACION	El "r" obtenido es 0,99996 mayor a 0,9950 por lo tanto es aceptable.
ANALISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN	<p>La regresión es significativa (F es mayor que el valor crítico de F), Por lo tanto la PENDIENTE es distinta de cero</p> <p>El INTERCEPTO de la regresión contiene al valor cero pues pertenece al intervalo de: [-1,50242E-05; 0,001434072]</p>

Tabla N° 89 – Resultados del Análisis de Regresión Lineal de las Curvas evaluadas en conjunto

ESTADÍSTICAS DE LA REGRESIÓN						
Coefficiente de correlación (r)	0,99996					
Coefficiente de determinación (r ²)	0,99992					
r ² ajustado	0,99991					
Error típico (S _{YIX})	0,00082					
Observaciones	18					
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)						
Origen de las Variaciones	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	Probabilidad
Puntos	1	0,12959028	0,12959028	0,104	1,254	0,054
Réplicas	16	1,07046E-05	6,69036E-07			
Total	17	0,129600985				
INTERVALO DE CONFIANZA DEL INTERCEPTO Y LA PENDIENTE						
	Coefficientes	Error Típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepto (a)	0,0007095	0,000341783	2,08	0,054	-1,50242E-05	0,001434072
Pendiente (b)	0,099365	0,000225775	440,11	0,000	0,0988887094	0,099844335

Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Los límites de detección y Cuantificación se estimaron por extrapolación a cero en la curva de regresión con soluciones de concentración baja del analito. A continuación se muestra las lecturas de los patrones:

Tabla N° 90 - Resultados de las lecturas de los patrones de concentración baja para el cálculo del límite de Detección y Cuantificación

Concentración (mg/L)	Absorbancia			Absorbancia Media	Desviación Estándar (s)
0,05	0,0052	0,0048	0,0055	0,0052	0,00035
0,10	0,0106	0,0105	0,0107	0,0106	0,00010
0,15	0,0153	0,0152	0,0153	0,0153	0,00006

La estimación de la señal del blanco: Y_{bk} se calculó de la ecuación de recta Absorbancia vs. Concentración (figura N° 41) y se extrapoló la absorbancia a concentración cero. La estimación de la desviación estándar del blanco: S_{bk} se calculó de la ecuación de recta "Concentración vs. Desviación estándar" (figura N° 42) y se extrapoló la desviación estándar a concentración cero.

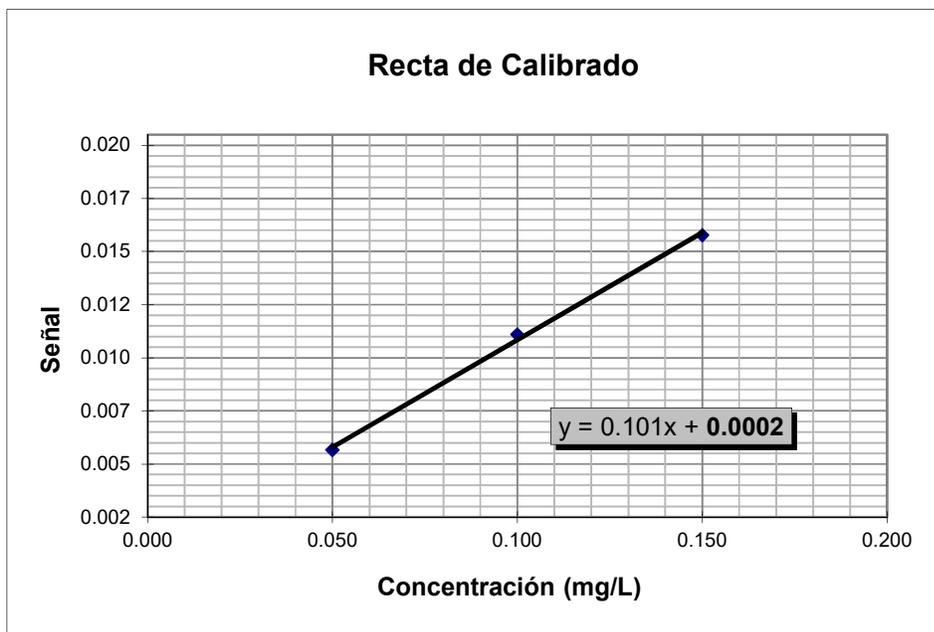


Figura N° 41 - Curva de Calibrado Absorbancia vs. Concentración para el cálculo del límite de detección y Cuantificación

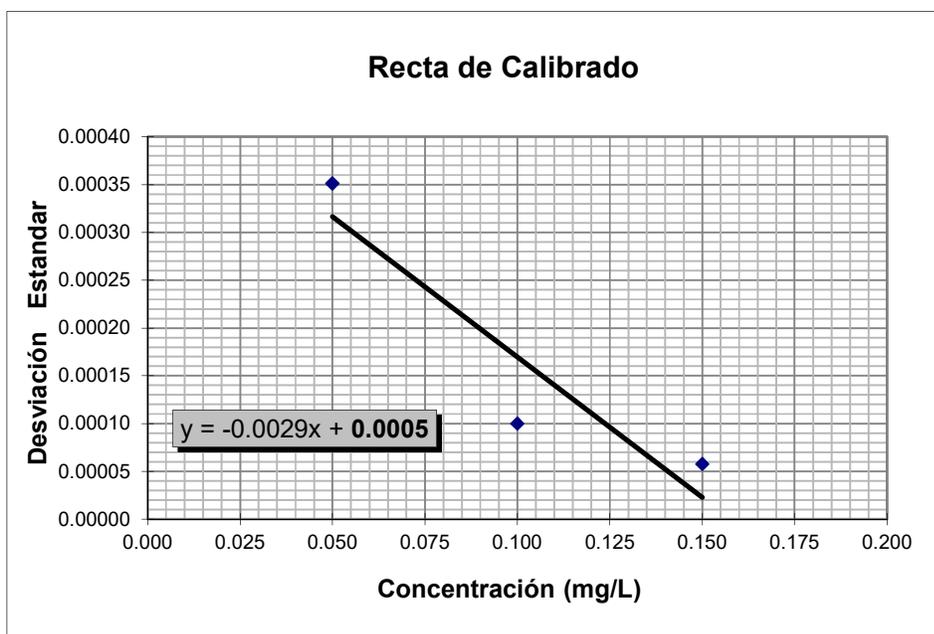


Figura N° 42 - Curva de Calibrado Desviación estándar vs. Concentración para el cálculo del límite de detección y Cuantificación

Para el cálculo de los parámetros se utilizó la ecuación de recta del análisis de regresión lineal de las curvas en conjunto (tabla N° 86 Regresión Lineal Combinada),

Tabla N°91 - Resultados del cálculo del límite de Detección y límite de Cuantificación

Señal del Blanco (Y_{bk})	Desviación Estándar de Blanco (S_{bk})	Límite de Detección (LD)		Límite de Cuantificación (LC)	
		mg/L	mg/kg	mg/L	mg/kg
0,0002	0,0005	0,02	2,0	0,06	6,0

Sensibilidad

Se evaluó la sensibilidad en tres días tomando como referencia una solución patrón de 2,0 mg/L

Tabla N°92 – Resultados del cálculo de la sensibilidad

Día	Concentración (mg/L)	Absorbancia	Sensibilidad (mg/L)
1	2,00	0,1994	0,0441
2	2,00	0,1998	0,0440
3	2,00	0,1998	0,0440
Promedio			0,0441

Robustez

Seguendo el diseño de Plackett y Burman, para el análisis de robustez, se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en las tablas N°93 y 94.

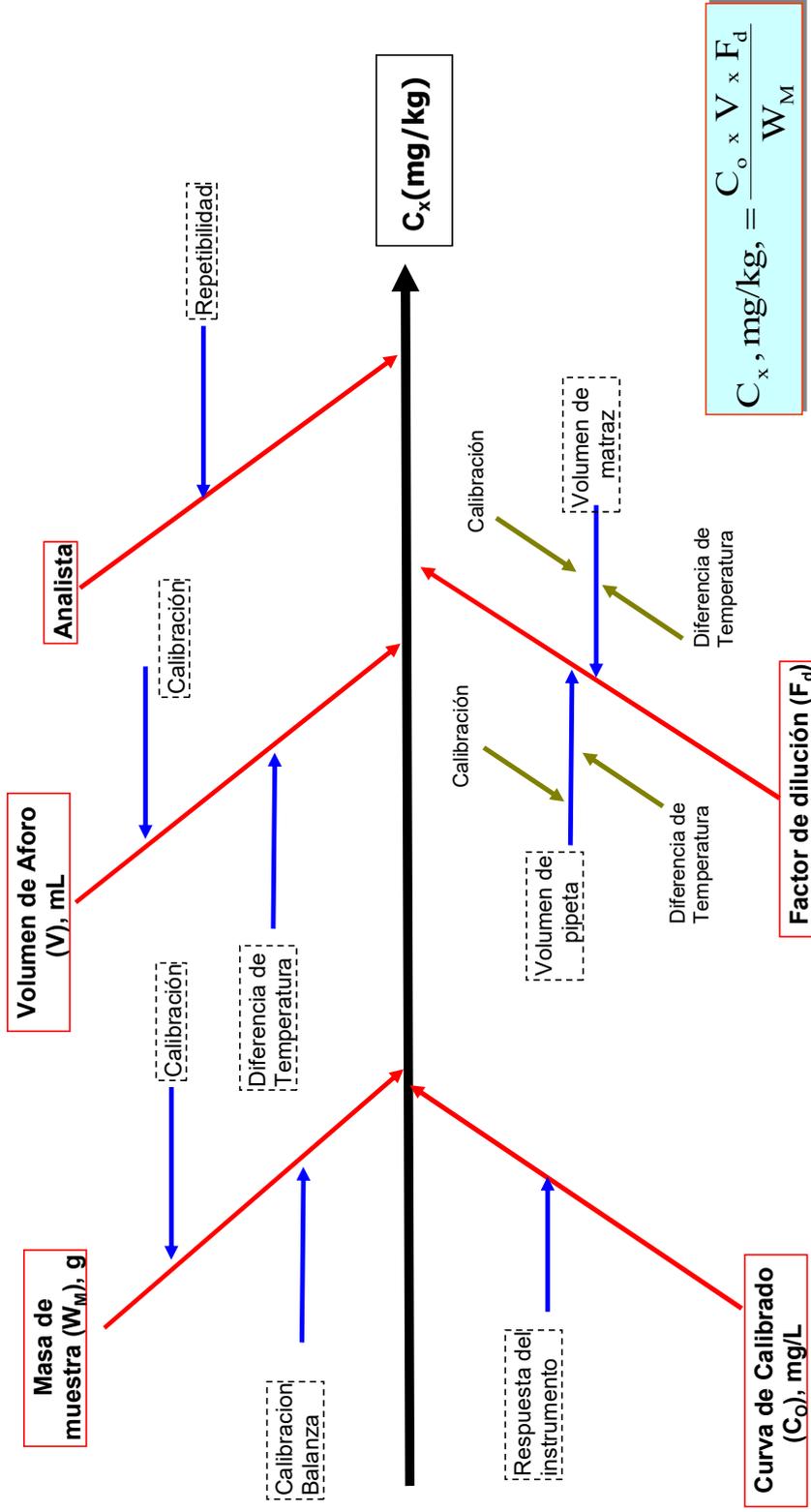
Tabla N°93 - Resultados obtenidos en los ensayos para la determinación de Robustez

	Valor Observado	Valor Tabla	Conclusión
Variable A	0,135	1,047	El factor no influye
Variable B	0,215	1,047	El factor no influye
Variable C	0,375	1,047	El factor no influye

Tabla N°94 - Resultado de la evaluación de la robustez

Variable	1	2	3	4
A o a	A	A	a	a
B o b	B	B	B	b
C o c	C	c	c	C
Resultado	42,57	41,98	42,06	42,22
S _r	0,74			

ANEXO N° 5 - DETERMINACION DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE EN EL ENSAYO DE Cu, Cr, Mn y Ni



- C_x : Concentración de Cu, Cr, Mn y Ni en mg/kg
- C_o : Concentración de cu, Cr, Mn y Ni en mg/L
- V : Volumen de aforo inicial, en mL
- F_d : Factor de dilución de la muestra
- W_M : Masa de muestra, en g



ANEXO N° 6: ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA DETERMINACIÓN DE Cu, Cr, Mn y Ni

Método:	EPA 3050B
Matriz:	Suelos

1er factor: Metodología

Metal mg/kg	42.60
±U mg/kg	1.79

MODELO MATEMÁTICO:

$$C_x, \text{mg/kg} = \frac{C_o \times V \times F_d}{W_M} \quad (28)$$

Factores	Descripción
C_x	Concentración de Cu, Cr, Mn y Ni [mg/kg]
C_o	Concentración de Cu, Cr, Mn y Ni obtenido a través de la curva de calibrado [mg/L]
V	Volumen de aforo inicial [mL]
F_d	Factor de dilución de la muestra
W_M	Masa de muestra utilizada en el análisis [g]

A. Masa de muestra, en g (W_M)

Masa en gramos
Incertidumbre Estándar de masa en gramos
Coeficiente de Sensibilidad

W_M	1.0000
$u(W_M)$	0.00011
$u(W_M)/W_M$	0.0001

BALANZA	
$U_{(BALANZA)}$	$= 2(0.000000012 \text{ g} + 0.0000000084 \times R^2 \text{ g})^{1/2}$
Certificado de Calibración: M - 1743 - 2012	
$U_{(BALANZA)}$: Incertidumbre expandida de medición. Factor de Cobertura K=2 (95% Nivel de confianza)	
R: Lectura en gramos	

R : **1.0000** g

B. Volumen de aforo inicial, en mL (V)

Volumen en mililitros
Incertidumbre Estándar del volumen en mililitros
Incertidumbre Estándar Relativa del volumen

V	100
$u(V)$	0.037
$u(V)/V$	0.0004

Material Volumétrico: **FIOLA**

1. Calibración / Especificación:

FACTOR	VOLUMEN (mL)	INCERTIDUMBRE EXPANDIDA (mL)		INCERTIDUMBRE ESTANDAR (mL)
Calibración	100	±	0.011	0.006

Distribución	Normal	Rectangular	Triangular
Código	1	2	3

Ingresar Código de distribución

1

Factor **2.000**

2. Efecto debido a la variación de Temperatura:

Intervalo de Temperatura \pm °C

Incertidumbre Estándar mL

Distribución	Normal	Rectangular	Triangular
Código	1	2	3

Ingresar Código de distribución

Factor

c. Factor de Dilución de la muestra (F_d)

$$F_d = \frac{V_2}{V_1} \quad (29)$$

Factor de Dilución (F_d)

Factor de Dilución
Incertidumbre Estándar del Factor de Dilución
Incertidumbre Estándar Relativa del Factor de dilución

F_d	100
$u(F_d)$	0.1399
$u(F_d)/F_d$	0.00140

i. Volumen pipeteado en mL (V_1)

Volumen en mililitros
Incertidumbre Estándar del volumen en mililitros
Incertidumbre Estándar Relativa del volumen

V_1	1
$u(V_1)$	0.0013
$u(V_1)/V_1$	0.0013

Material Volumétrico:

1. Calibración / Especificación:

FACTOR	VOLUMEN (mL)	INCERTIDUMBRE EXPANDIDA (mL)	INCERTIDUMBRE ESTANDAR (mL)
Calibración	1	\pm	0.003
			0.0013

Distribución	Normal	Rectangular	Triangular
Código	1	2	3

Ingresar Código de distribución

PIPETA VOLUMETRICA (mL)	U (\pm mL)	EMP (\pm mL)
1	0.0026	0.008
2	0.0015	0.010
3	0.0016	0.010
4	0.0041	0.015
5	0.0018	0.010
10	0.005	0.020

Factor

2. Efecto debido a la variación de Temperatura:

Intervalo de Temperatura \pm °C

Incertidumbre Estándar mL

Distribución	Normal	Rectangular	Triangular
Código	1	2	3

Ingresar Código de distribución

Factor

II. Volumen de aforo en mL (V₂)

Volumen en mililitros	V ₂	100
Incertidumbre Estándar del volumen en mililitros	u(V ₂)	0.04
Incertidumbre Estándar Relativa del volumen	u(V ₂)/V ₂	0.0004

Material Volumétrico: **FIOLA**

1. Calibración / Especificación:

FACTOR	VOLUMEN (mL)	INCERTIDUMBRE EXPANDIDA (mL)		INCERTIDUMBRE ESTANDAR (mL)
Calibración	100	±	0.011	0.0055

Distribución	Normal	Rectangular	Triangular
Código	1	2	3

Ingresar Código de distribución

FIOLA VOLUMETRICA (mL)	U (± mL) Certificado	EMP (± mL)
50	0.001	0.060
100	0.011	0.10

1

Factor **2.000**

2. Efecto debido a la variación de Temperatura:

Intervalo de Temperatura ± **3** °C

Incertidumbre Estándar **0.036** mL

Distribución	Normal	Rectangular	Triangular
Código	1	2	3

Ingresar Código de distribución

2

Factor **1.732**

D. Concentración de la solución del analito obtenido a través de la curva de calibrado (C_x)

Concentración del analito, en mg/L
 Incertidumbre Estándar de la concentración del analito en mg/L
 Incertidumbre Estándar Realtiva de la concentración del analito

C _x	0.43
u(C _x)	0.009
u(C _x)/C _x	0.021

Respuesta del Instrumento (X_{obs})

Dada una serie de datos (x_i, y_i), la incertidumbre u(C_{Xobs}) asociada a la concentración del analito X_{obs} debida a la variabilidad aleatoria en los valores de "Y" está dada por:

$$u(X_{obs}) = \frac{S_{y/x}}{m} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(X_{obs} - \bar{X})^2}{S_{XX}}} \quad (30)$$

Donde:

- S_{y/x}: Desviación estándar de los residuales
- m: Pendiente de recta
- p: N° de repeticiones de lectura de muestra
- n: N° de patrones utilizado para obtener la recta de calibrado
- X_{obs}: Concentración del analito en la muestra
- \bar{X} : Valor medio de las concentraciones de los patrones
- X_i: Cada una de las concentraciones de los patrones

$$S_{XX} = \sum (X_i - \bar{X})^2 \quad (31)$$

1. De la ecuación de regresión se registra la siguiente información:

Pendiente de la Ecuación observada :	m	0.0990
Intercepto :	b	0.001110
Desviación estándar de los residuales	S_{y/x}	0.000889
N° de patrones utilizado para obtener la recta de calibrado	n	5
N° de repeticiones de lectura de muestra	p	3
Concentración del analito en la muestra	X_{obs} (mg/L)	0.426

2. Ingresar los valores de la concentración empleados como patrones:

C _i (mg/L)	Concentración
C1	0.500
C2	1.000
C3	1.500
C4	2.000
C5	2.500
\bar{X}	1.500

S_{xx}	2.500
(X_{obs} - \bar{X})²	1.153

Incertidumbre asociada a la respuesta del instrumento

u(X_{obs})	0.009
---------------------------	--------------

	ENSAYO SI/NO
Dilución de muestra	NO

Contenido del analito en la muestra [mg/kg]	C_{Analito}	42.600
Incertidumbre estándar de la concentración del analito en la muestra [mg/kg]	μ(C_{Analito})	0.90

2do factor: Analista

U_{Analista}	0.002	mg/L
-----------------------------	--------------	------

	REALIZA EL ENSAYO SI / NO		Rango	
			D.S. Analista (mg/L) - Bajo	D.S. Analista (mg/L) - Alto
Analista 1: Wilder Condori castro	si	0.005	0.005	0.005

II. INCERTIDUMBRE COMBINADA

μ_c	0.90	mg/kg
----------------------	-------------	-------

III. INCERTIDUMBRE EXPANDIDA AL 95% DE CONFIANZA

U	1.79	mg/kg
----------	-------------	-------

ANEXO N° 7: PROTOCOLO DE MONITOREO DE SUELOS

1. INTRODUCCION

El suelo es el producto de la acción del clima sobre la roca madre situada en la superficie de la corteza terrestre que, modificado por la topografía e hidrología y vegetación, es un constituyente de la naturaleza con componentes minerales, orgánicos y biológicos constituidos por organismos que viven en él.

La alteración física, química y bioquímica de las rocas provoca la formación de nuevos constituyentes minerales reactivos. Así mismo, el componente orgánico y biológico de la superficie del suelo sufre grandes transformaciones que tienen como consecuencia la conexión con las propiedades de intercambiar cationes y/o aniones con algunos contaminantes que dan origen a la variación de la estructura del suelo y deficiencia en sus usos principalmente agrícola.

El presente protocolo, trata de establecer especificaciones generales para el muestreo de suelos, que permite caracterizar los suelos a través de la identificación y cuantificación de metales en el área de estudio.

a. Objetivos

- i. Poner a disposición de los analistas el Protocolo de Monitoreo de Suelos; en el cual se indican las pautas generales de muestreo, manejo de muestras.
- ii. Colectar muestras representativas de suelo del área a evaluar.

2. DEFINICION DE TERMINOS

Suelo: Se entiende por suelo la parte sólida de la corteza terrestre, desde la roca madre hasta la superficie, que incluye tanto sus fases

liquida y gaseosa como los organismos que habitan en él. Con la capacidad de desempeñar funciones naturales como de uso del mismo.

Suelo Potencialmente Contaminado: Un suelo será catalogado como potencialmente contaminado cuando existan indicios razonables que señalen una posible alteración de su calidad.

Suelo Sospechoso: Un suelo será considerado sospechoso de estar contaminado cuando los resultados de la recopilación de información (estudio histórico, visita de campo y análisis del medio físico) indiquen que existen indicios razonables de una potencial alteración de la calidad del suelo, siendo necesario efectuar una investigación con muestreo y análisis químico dirigida a confirmar esta hipótesis.

Suelo Alterado: Se define como aquel que presente alguna alteración significativa de sus características químicas que puede suponer algún condicionante o limitación a las funciones del mismo, siempre y cuando tal circunstancia no conlleve riesgos inaceptables para los usos previstos.

Suelo Contaminado: Se define como aquel que presente una alteración de sus características químicas incompatible con sus funciones, debido a que suponga un riesgo inaceptable para la salud pública o el medio ambiente.

Investigación Exploratoria: Es la fase de investigación cuyo objetivo es confirmar, por un lado, la existencia de los niveles de contaminación que suponga o pueda suponer un riesgo inaceptable para la salud humana y los ecosistemas y, por otro, la hipótesis de distribución espacial de la contaminación. Los datos obtenidos en esta fase deben permitir el diseño óptimo de la fase de investigación detallada.

Investigación Detallada: Es la fase de Investigación cuyo objeto reside en recabar toda la información (característica espacial-horizontal y vertical-temporal de la contaminación, receptores potenciales, etc) que sea necesaria para acometer la evaluación de los riesgos presentes y futuros derivados de la contaminación detectada. La evaluación de riesgos es un elemento esencial de la Investigación Detallada de cara a tomar decisiones sobre posteriores medidas a implantar en el emplazamiento.

Nivel de Acción: El nivel de acción es la concentración de un contaminante en el suelo a partir de la cual se debe implementar alguna medida de intervención ambiental.

Muestreo Selectivo: Consiste en identificar y seleccionar los lugares para el muestreo en base a los objetivos de evaluación y fuentes de recontaminación y/o áreas contaminadas.

Muestreo Sistemático: Donde los puntos de muestreo seleccionados tienen una distribución uniforme, a fin de cubrir toda la cobertura del área evaluada.

Muestreo al Azar: Se basa en la teoría de probabilidades y la necesidad de un riguroso análisis estadístico.

Límite de detección: Es la mínima concentración de un contaminante que puede ser detectado por el método analítico utilizado por el laboratorio.

Cuarteo: Técnica de muestreo que consiste en la toma de varias porciones representativas del medio objeto de análisis, que se componen obteniendo una mezcla homogénea. De esta se toma una alícuota (muestra compuesta) para su posterior análisis.

3. INFORMACION SOBRE EL SITIO

- a. Antes de realizar el muestreo es necesario contar con una idea cabal del área de evaluación.
- b. Se debe realizar un reconocimiento del sitio que incluya el registro de las actividades que se estén realizando o se hayan realizado identificando las posibles fuentes de contaminación al suelo.
- c. Se debe registrar además la información sobre los aspectos relevantes del lugar así como datos históricos disponibles que puedan ser útiles en el momento de analizar los resultados. Esto incluye la observación de las pendientes del terreno, cursos de agua próximos, edificaciones, existencia de residuos (su posible origen), y todo aquello que pueda proveer información importante sobre las limitaciones existentes para el muestreo y la eventual aplicación de medidas de intervención ambiental.

4. TECNICAS DE MUESTREO

Debe tenerse en cuenta, en el momento del muestreo, la importancia que el mismo tiene en el resultado final, razón por la cual la muestra debe ser representativa y debe adecuarse a los niveles de confiabilidad que se desea obtener. La toma de muestra de suelos es la mayor fuente de variabilidad capaz de afectar el resultado de cualquier resultado.

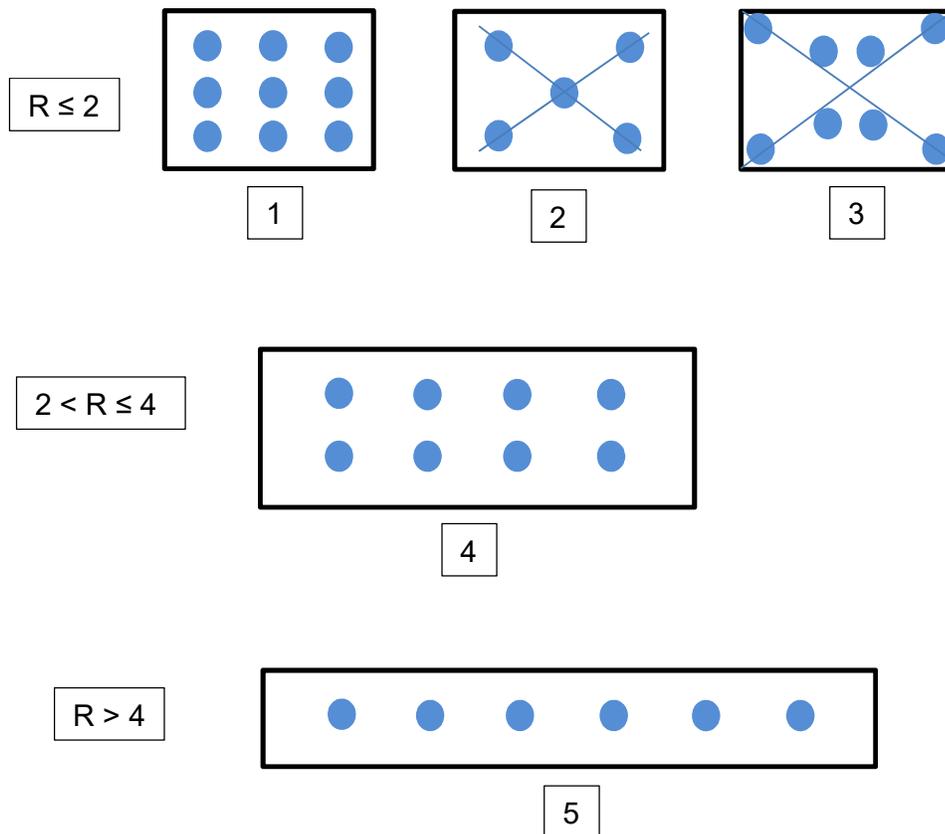
El objetivo del muestreo es asegurar de información relevante de acuerdo con los objetivos de la investigación y con una fiabilidad conocida, dicha información se referirá, en primer lugar, a la existencia y concentración en el emplazamiento de determinados contaminantes y, en segundo lugar, a la relimitación de las sub-áreas que puedan diferenciarse en función del tipo y grado de contaminación esperado.

a. **Distribución espacial de las muestras o submuestras**
(cuadrícula de muestreo):

Las cuadrículas de muestreo propuestos son las que se detallan en la figura N° 54. Se sugiere utilizar los siguientes criterios, con el fin de lograr una distribución espacial homogénea entre los puntos de muestreo:

- Las cuadrículas 1, 2, y 3 se utilizan en aquellos terrenos donde la relación largo-ancho ($R = L/A$) es menor a 2.
- La cuadrícula 4 se utiliza en aquellos terrenos donde la relación largo-ancho ($R = L/A$) es mayor a 2 y menor a 4.
- Las cuadrículas 5 se aplica en aquellos casos donde la relación largo-ancho ($R = L/A$) es mayor a 4.

Figura N° 43 : Cuadrículas de Muestreo de Suelos.



b. **Profundidad a la cual se va a tomar la muestra** (muestras superficiales, a media profundidad o profundo):

- **Muestreo Superficial.**

El muestreo se debe de realizar con una cuchara o espátula de acero inoxidable o plástico.

- **Muestreo Vertical.**

El muestreo vertical se realiza a través de pozos que permitan obtener muestras para determinar el perfil del suelo a la profundidad proyectada.

Para el muestreo vertical se pueden utilizar excavaciones, que permitan el acceso a la toma de muestras, o se pueden utilizar perforaciones para el hinchado de un muestreador manual o mecánico que obtenga un núcleo que permita muestrear el perfil del suelo. Se debe tener precaución de utilizar perforadoras en buen estado que no provoquen contaminación.

c. **Tipo de muestra (compuesta o puntual):**

El tipo de muestreo de suelos debe ser elegido por el muestreador de acuerdo al tamaño y a las características morfológicas del terreno a muestrear, la información precedente, la información que se desea obtener y la viabilidad del muestreo.

Muestra Compuesta:

La muestra compuesta está conformada por un número determinado de muestras simples colectadas del área a evaluar; las muestras simples deben ser mezclados (homogenizadas); se realiza colocando sobre una pieza cuadrada de tela fuerte agarrada, está por dos esquinas en diagonal se lleva una sobre otra, procurando que el suelo se enrolle, esta acción se debe efectuar en promedio unas 10 veces.

Muestra Puntual:

La muestra simple esta referida a la colección de una muestra de suelo, en un punto del área a evaluar.

Material y equipo recomendado para la colecta de muestras:

- i. Herramienta para la colecta de muestras de suelo en campo, fácil de limpiar. Resistente al desgaste y que no contamine las muestras con impurezas.
- ii. Envases con capacidad para contener al menos 500g de muestra.
- iii. Plumas, marcadores y etiquetas.
- iv. Cinta métrica.
- v. Cámara fotográfica.
- vi. Libreta de apuntes.

5. TIPOS DE MUESTREO**Muestreo con cuchara:**

Este tipo de muestreo es efectivo para la toma de muestra en suelos de baja compactación (suelos sueltos, arenosos y polvorientos), no resultando útil en suelos duros. Se utiliza una cuchara de metal tipo jardinero, preferentemente de acero inoxidable, evitando todos los instrumentos que sean pintados.

Preparación del material:

Para la limpieza de todo el equipamiento usando en la extracción de la muestra de suelo es posible utilizar agua potable. Deberá evaluarse si la posibilidad de contaminación de la muestra por esta práctica es despreciable, tomando en cuenta los niveles del metal a analizar en agua.

Toma de muestra:

- Usar un par de guantes limpios para proteger las manos del muestreador y la integridad de la muestra (evitando la contaminación entre diferentes muestras)
- Verificar la limpieza de todo el equipo de muestreo previamente a la toma de una muestra. En caso necesario, limpiar la cuchara hasta que se encuentre visiblemente limpia (utilizando papel, toalla y agua potable).
- Elegir el patrón de muestreo a seguir, de acuerdo al apartado 4, e identificar la cuadrícula de muestreo.
- En cada uno de los puntos identificados en la cuadrícula elegida realizar la preparación del sitio donde se extraerá la submuestra (retirar la cubierta vegetal y todo material que impida el acceso al suelo a muestrear).
- Proceder a la toma de muestra mediante la técnica de cuarteo, la cual consiste en combinar las diferentes submuestras de acuerdo a la cuadrícula elegida, realizando un hoyo con la cuchara de aproximadamente de 5cm de profundidad y de un diámetro de 6cm. Las porciones de suelo removidas (submuestras) se colocan sobre una superficie limpia y plana (por ejem: lámina plástica de polietileno).
- Las submuestras se homogenizan con la cuchara en la misma superficie donde fueron colocadas, obteniendo la muestra compuesta.
- Tomar una porción de la muestra compuesta para el análisis.
- Colocar esta porción en el recipiente colector (bolsas o recipientes plásticos) y sellar el mismo. El recipiente colector debe ser nuevo para evitar cualquier tipo de contaminación.
- Identificar el recipiente colocando un código de identificación, la fecha y lugar de muestreo.

- En caso de que el muestreador lo considere necesario, descartara los guantes y la superficie utilizados durante la toma y composición de la muestra.
- Se debe prevenir la contaminación entre diferentes muestras tomando las medidas de transportes adecuados

6. CONSIDERACIONES PARA LA TOMA DE LAS MUESTRAS DE SUELO

Se debe garantizar que la muestra obtenida sea de un tamaño tal que una vez tamizada contenga por lo menos 250g de residuo fino para su análisis y que facilite y permita, la preparación de muestras compuestas en el muestreo.

Se debe evitar que el equipo de muestreo provoque contaminación entre las diferentes muestras, para lo cual se deberá limpiar con una brocha o cepillo. En caso de la limpieza no sea suficiente, será necesario lavar con agua, entre muestra y muestra, el equipo y los instrumentos de muestreo.

En el muestreo vertical, deben identificarse los diferentes horizontes que forman el suelo en función de su aspecto físico (color, textura, grado de compactación, entre otros). Para horizontes con espesor menor a 30cm, debe tomarse una muestra de canal vertical abarcando todo el espesor del mismo. Para horizontes mayores a 30cm deben tomarse tantas muestras de 30cm como sean necesarias para cubrir el espesor total. Para profundidades mayores a 2m, el intervalo de muestreo deberá ser definido con su justificación correspondiente.

En el muestreo de detalle, cada muestra compuesta se constituye con cinco muestras simples tomadas del área de estudio distribuidas uniformemente. El proceso de homogenización se puede desarrollar en campo asegurando que las muestras simples tengan masas o volumen similares. El homogenizado puede lograrse utilizando bolsas de polietileno, haciendo girar las muestras en todas las direcciones.

En caso de presencia de restos de plantas, se pueden retirar antes del muestreo, salvo que se consideren importantes para el caso en estudio.

En caso de presencia de piedras mayores de 2cm de diámetro (aproximadamente), estas deben ser retiradas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EPA Method 3050B, Acid Digestion of Sediments, Sludgles, and Soils.
2. **Compañó, R. & Ríos, A. (2003). Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos.** 1era edición, editorial síntesis. España
3. **Dajes, J. (2007). Aseguramiento metrológico en ISO 9000.** 2da edición, editorial INDECOPI. Perú.
4. **Erick, Z. & Sadzawka, A. (2007). Implementación del sistema para la validación de los métodos de análisis y mediciones de laboratorio en suelos y lodos.** 1ra Edición. Chile.
5. Johanna Carolina Velandia Castellanos, **Validación del Método Analítico para la Cuantificación de Bacitracina** en el Laboratorio de Control de Calidad de una Industria Farmacéutica Veterinaria, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas, Bogota D,C, Colombia, 2008
6. Guía EURACHEM (1999). **Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas conexos.** 1ra Edición.
7. Guía EURACHEM (2012). **Cuantificación de la incertidumbre en mediciones analíticas.** 3ra Edición.

8. Guia NORMAS LEGALES (2003) **Guia para efectuar validación de métodos de ensayo**. Diario Oficial El Peruano. 1 febrero de 2003. Pag. 238364 - 238366.
9. **Hawley, J.E. & Ingle, J.D. (1975). Improvements in cold vapor atomic absorption determination of mercury.** *Journal of Analytical Chemistry*, 47(4),719-720.
10. **Miller, J.C. (1993). Estadística para Química Analítica.** 2da edición, Addison-Wesley Iberoamerican, S.A. E.U.A.
11. **Morales, C. (2004). Desarrollo y Validación Prospectiva de una Técnica Analítica por Cromatografía Líquida de alta Performance (HPLC) para el enalapril 10 mg tabletas cubiertas.** Tesis para optar el título de licenciado en Químico Farmacéutico. Lima: Universidad Autónoma de Barcelona.
12. NMKL Reporte N° 4 (1998) **Validación de Métodos de Análisis Químicos.** *Comité Nórdico de Alimentos*, versión N° 1, 5-21.
13. UNEP/FAO/IABA (1983) **Sampling of selected marine organism and sample preparation for trace metal analysis.** *Reference Methods for Marine Pollution studies*, N° 7.

14. Manual Operation VARIAN (2004). Vapor Generation Accessory VGA – 77. Publication N° 5810104700. Australia.
15. Norma Técnica Peruana ISO/IEC 17025:2006 **Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración**. 2da edición. Perú.
16. Norma Técnica Peruana ISO/IEC 5725-2:1999 **Exactitud (Veracidad y Precisión) de los métodos y resultados de medición - Parte 2: Método básico para la determinación de la repetibilidad y de la reproducibilidad de un método de medición normalizado**. 1da edición. Perú.
17. Norma Técnica Peruana ISO/IEC 5725-3:2000 **Exactitud (Veracidad y Precisión) de los métodos y resultados de medición - Parte 3: Mediciones intermedias de la precisión de un método de medición normalizado**. 1da edición. Perú.
18. Norma Técnica Peruana ISO/IEC 5725-4:1999 **Exactitud (Veracidad y Precisión) de los métodos y resultados de medición - Parte 4: Métodos básicos para la determinación de la veracidad de un método de medición normalizado**. 1da edición. Perú.

19. Norma Técnica Peruana ISO/IEC 5725-3:2000 **Exactitud (Veracidad y Precisión) de los métodos y resultados de medición - Parte 6: Utilización en la práctica de valores de exactitud.** 1da edición. Perú
20. Organización de la Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación FAO (2005). **Taller Subregional sobre Aseguramiento de Calidad y Validación de Metodología para Análisis Químico.** Colombia.
21. Procedimiento SNM (2010) **Procedimiento para la calibración de material volumétrico de vidrio.** 1era edición. Perú
22. Procedimiento SNM (2010) **Procedimiento para la calibración de medidores de pH.** 1era edición. Perú
23. **Ramis, G. & FGarcía, C.** (2001). **Quimiometría.** 1era edición, editorial síntesis. España.
24. Robles Gutierrez I., Lopez Robles J. P., Carrera Delgado A., Flores de la Torre J. A., Alba Reyes I., Mancera Garcia K. M., Manzanares Acuña E., Letechipia de Leon C. **Determinación de la Cantidad de Plomo en Suelos de Concepción del Oro.**
25. **Sadzawka, A. & Flores, H.** (2007). **Métodos de análisis de suelos y lodos.** 1ra Edición. Chile
26. **Sadzawka, A. & Carrasco, M.** (2004). **Métodos de análisis recomendados para los suelos chilenos.** Comisión de Normalización y

Acreditación. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. 1ra Edición.
Chile.

27. **Wiley**, J. & Sons. (1975). **Atomic Absorption Spectrometry**, ADAM
HILGER LTD. New Oork- Toronto.