



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

“VALIDACIÓN DEL MÉTODO GENERADOR DE HIDRUROS POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO EN AGUAS NATURALES, DE CONSUMO Y RESIDUALES”

Trabajo de titulación

Tipo: Proyecto Técnico

Presentado para optar por el grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: STEPHANIE ELIZABETH PINTADO MOROCHO

DIRECTOR: Dr. PhD. FABIAN ERNESTO ARIAS ARIAS

Riobamba – Ecuador

2020

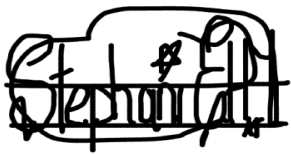
©2020, Stephanie Elizabeth Pintado Morocho

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el derecho de Autor.

Yo, Stephanie Elizabeth Pintado Morocho, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 31 de agosto de 2020

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Stephanie Elizabeth Pintado Morocho', enclosed within a hand-drawn rectangular border.

Stephanie Elizabeth Pintado Morocho

C.C: 210056953-8

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

El Tribunal de trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación Tipo: Proyecto Técnico, **“VALIDACIÓN DEL MÉTODO GENERADOR DE HIDRUROS POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE SELENIO EN AGUAS NATURALES, DE CONSUMO Y RESIDUALES”**, realizado por la Señorita **STEPHANIE ELIZABETH PINTADO MOROCHO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

CARLOS
PILAMUNGA
CAPUS

Firmado digitalmente por CARLOS
PILAMUNGA CAPUS
Número de reconocimiento (DN): c=EC,
o=SECURITY DATA S.A., ou=ESTADO DE
CERTIFICACION DE INFORMACION,
serialNumber=15082020428, cn=CARLOS
PILAMUNGA CAPUS
Fecha: 2020.11.18 18:20:03 -05'00'

Dr. Carlos Pilamunga Capus

2020-08-31

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

 Firmado electrónicamente por:
**FABIAN
ERNESTO**

Dr. PhD. Fabián Ernesto Arias Arias

2020-08-31

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

ANGEL
RIGOBERTO
SILVA DELGADO

Digitally signed by
ANGEL RIGOBERTO
SILVA DELGADO
Date: 2020.11.20

Dr. Ángel Rigoberto Silva Delgado

2020-08-31

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación está dedicado a mi familia por toda la ayuda y el apoyo brindado: a mi padre Luis Pintado por su apoyo incondicional para el cumplimiento de mi carrera y lograr con éxito mi meta, a mi madre Aracelly Morocho por todo su amor hacia mí, por todo lo que me ha dado sin pedirme nada a cambio, quiero agradecer eternamente a mis padres por darme la vida, por enseñarme valores y principios, y por permitirme formarme profesionalmente con mi carrera universitaria.

A mis hermanos, porque de una u otra manera fueron mi pequeña inspiración para ser profesional y me supieron brindar su ayuda durante mi fase de estudio en la universidad. Con mucho cariño dedico a mis abuelos maternos, seres maravillosos que Dios puso en mi vida, a mi abuelo el señor Leonidas Morocho y a mi abuela la señora Luz Ofelia Heredia que hoy no se encuentra junto a nosotros, pero desde el cielo sé que me sonreirá y estará orgullosa de mí, gratitud por todos sus consejos y porque siempre tuvieron fe de que lograría culminar mis estudios. En especial a mis dos hijos, Sebastián y Cristel que llegaron a mi vida para ser el impulso y la motivación para seguir adelante y no darme por vencida, ni rendirme ante ningún obstáculo.

Finalmente, a cada uno de mis queridos docentes que formaron parte de mi instrucción académica en el transcurso del tiempo, y en especial a mi Tutor de tesis el Dr. Fabián Arias que me ha guiado en la realización de mi tesis.

Stephanie

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por todo lo que tengo y por todo lo que soy, por ser mi guía y fortaleza en momentos difíciles, por haberme permitido vivir esta experiencia enriquecedora de formación académica y profesional, por cada día que me da para ser una mejor persona y cumplir con mis metas y objetivos, por darme una familia, por mis queridos padres, por mis dos hermanos y por permitirme ser madre de dos maravillosos niños.

A mis amados padres Luis y Aracelly por ser los principales promotores de mis sueños quienes con mucho esfuerzo y sacrificios me dieron la oportunidad de estar aquí y ahora cumpliendo una de las metas más importantes de mi vida, la primera de muchas más; gracias por creer en mí y permitirme culminar esta etapa de formación académica, por todo el apoyo brindado y por cada palabra de amor y comprensión que me supieron brindar en el transcurso del tiempo, por no permitir que me detuviera en el camino y por ser quienes nunca se rindieron y ni escatimaron esfuerzos. Gracias Padres por todo y por ustedes soy lo que soy.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Escuela de Ciencias por darme la oportunidad de formarme como Ingeniera en Biotecnología Ambiental, por su excelencia académica, por prestarme sus aulas donde adquirí los conocimientos necesarios para mi vida en el campo profesional como personal. Quiero agradecer a todos los docentes que fueron mis maestros y cada una de las personas que conforman la ESPOCH mis más sinceros agradecimientos por poner su corazón en cada enseñanza, experiencia y apoyo. En especial a mi Tutor de Tesis el Dr Fabián Arias y al Dr Ángel Silva por toda la colaboración entregada para la realización de mi trabajo de titulación, quienes son las mejores personas que he tenido el honor de conocer en este largo caminar, gracias por guiarme por compartir sus conocimientos, experiencias, motivaciones y amistad, por darme sus esfuerzos y dedicación para la culminación de este trabajo de titulación.

A todo el personal Administrativo y Técnico del Laboratorio Aqlab en la ciudad de Francisco de Orellana por permitirme trabajar junto con ellos en este proyecto de validación como mi tema de Tesis, por prestarme sus instalaciones, instrumentaría, equipos y reactivos necesarios; y por todo el apoyo personal para obtener resultados con éxito. Además, quiero agradecer a todos mis profesores, técnicos docentes, amigos, familiares y demás personas que también fueron parte de este proceso de titulación, gracias a cada una de las personas que en algún momento dado me brindaron algún consejo, me dieron su mano y su amistad. Gracias a todos por haber hecho esta etapa de mi vida una experiencia inolvidable e irrepetible.

Stephanie

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|-----------------------------|------|
| ÍNDICE DE TABLAS..... | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xi |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS..... | xii |
| ÍNDICE DE ANEXOS..... | xiii |
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS..... | xiv |
| RESUMEN..... | xv |
| ABSTRACT..... | xv |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |

CAPÍTULO I

| | |
|---------------------------------------|---|
| 1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA..... | 2 |
| 1.1. Identificación del problema..... | 2 |
| 1.2. Justificación..... | 4 |
| 1.3. Objetivos..... | 5 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| 2. REVISIÓN DE LA LITERATURA O FUNDAMENTOS TEÓRICOS..... | 6 |
| 2.1. Antecedentes de la investigación..... | 6 |
| 2.2. Marco conceptual..... | 7 |
| 2.2.1. <i>Selenio</i> | 7 |
| 2.2.2. <i>Selenio en el agua</i> | 8 |
| 2.2.2.1. <i>Toxicidad y esencialidad del selenio</i> | 9 |
| 2.2.2.2. <i>Importancia del análisis del Selenio</i> | 10 |
| 2.2.2.3. <i>Agua y su control de calidad</i> | 10 |
| 2.2.3. <i>Normativas Ambientales</i> | 13 |
| 2.2.3.1. <i>Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente</i> | 13 |
| 2.2.3.2. <i>Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1108:2014</i> | 13 |
| 2.2.3.3. <i>Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador 1215.</i> | 14 |
| 2.2.3.4. <i>Ordenanza Municipal del Cantón Francisco de Orellana</i> | 14 |
| 2.2.4. <i>Espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros</i> | 14 |
| 2.2.4.1. <i>Espectrometría de Absorción atómica</i> | 15 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.2.4.2. | <i>Componentes del espectrómetro de absorción atómica</i> | 15 |
| 2.2.4.3. | <i>Interferencias en Absorción Atómica</i> | 17 |
| 2.2.4.4. | <i>Aplicación</i> | 19 |
| 2.2.5. | Generador de hidruros | 19 |
| 2.2.5.1. | <i>Métodos para formación de Hidruros</i> | 20 |
| 2.2.5.2. | <i>Interferencias en la generación de hidruros</i> | 21 |
| 2.2.6. | Optimización de Generador de hidruros | 22 |
| 2.2.7. | Validación e incertidumbre de métodos analíticos | 24 |
| 2.2.7.1. | <i>Métodos y guías de referencia</i> | 24 |
| 2.2.7.2. | <i>Métodos estándar</i> | 24 |
| 2.2.7.3. | <i>Guía Eurachem para la Validación de Métodos</i> | 24 |
| 2.2.7.4. | <i>Norma NTE-INEN ISO/IEC 17025:2017</i> | 25 |
| 2.2.7.5. | <i>Validación de métodos analíticos</i> | 25 |
| 2.2.7.6. | <i>Proceso de validación</i> | 25 |
| 2.2.7.7. | <i>Parámetros relacionados con la calidad de un método analítico</i> | 26 |
| 2.2.7.8. | <i>Incertidumbre</i> | 32 |
| 2.2.7.9. | <i>Contribuciones de la incertidumbre</i> | 33 |
| 2.2.7.10. | <i>Formas de expresar la incertidumbre</i> | 34 |
| 2.2.7.11. | <i>Distribución de probabilidad</i> | 35 |
| 2.2.7.12. | <i>Criterios generales para la validación de un método</i> | 36 |

CAPITULO III

| | | |
|--------|--|----|
| 3. | MARCO METODOLÓGICO | 39 |
| 3.1. | Tipo de Investigación | 39 |
| 3.1.1. | <i>Población de estudio y unidad de análisis</i> | 39 |
| 3.2. | Metodología | 39 |
| 3.2.1. | <i>Técnicas e instrumentos analíticos</i> | 39 |
| 3.2.2. | <i>Recolección, preservación y almacenamiento de muestras</i> | 40 |
| 3.2.3. | <i>Limpieza de materiales</i> | 40 |
| 3.2.4. | <i>Condiciones ambientales</i> | 41 |
| 3.3. | Diseño experimental | 41 |
| 3.3.1. | <i>Detección de la necesidad analítica</i> | 41 |
| 3.3.2. | <i>Puesto a punto</i> | 41 |
| 3.3.3. | <i>Fijación de objetivos y parámetros de validación</i> | 41 |
| 3.3.4. | <i>Determinación del diseño experimental y estadístico de validación</i> | 42 |
| 3.3.5. | <i>Elaboración de curva de calibración</i> | 43 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.3.6. | <i>Operaciones de análisis</i> | 44 |
| 3.3.7. | <i>Tratamiento estadístico de los datos obtenidos</i> | 44 |
| 3.4. | Optimización de Generador de Hidruros | 45 |
| 3.5. | Cálculos | 45 |
| 3.5.1. | <i>Tratamiento estadístico</i> | 46 |
| 3.5.2. | <i>Análisis de repetibilidad (r) de los datos primarios</i> | 47 |
| 3.5.3. | <i>Análisis de reproducibilidad (R) de los datos primarios</i> | 47 |
| 3.5.4. | <i>Análisis de varianza ANOVA</i> | 47 |
| 3.6. | Incertidumbre | 48 |
| 3.6.1. | <i>Incertidumbre de calibración</i> | 49 |
| 3.6.2. | <i>Incertidumbre de los estándares a partir del estándar de 1000 mg/L</i> | 49 |
| 3.6.3. | <i>Incertidumbre de la función respuesta UFR = Sxy (global)</i> | 51 |
| 3.6.4. | <i>Incertidumbre de resolución (Ures)</i> | 51 |

CAPITULO IV

| | | |
|----------|--|----|
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 52 |
| 4.1. | Obtención de resultados | 52 |
| 4.1.1. | <i>Lectura o datos primarios del analito validado</i> | 52 |
| 4.1.2. | <i>Determinación de la linealidad de la función respuesta del método selenio en aguas</i> | 53 |
| 4.1.3. | <i>Análisis de repetibilidad (r) de los datos primarios</i> | 55 |
| 4.1.4. | <i>Análisis de reproducibilidad (R) de los datos primarios</i> | 56 |
| 4.1.5. | <i>Análisis de varianza ANOVA</i> | 58 |
| 4.1.6. | <i>Incertidumbre</i> | 59 |
| 4.1.6.1. | <i>Incertidumbre de los estándares a partir del estándar de 1000 mg/L</i> | 59 |
| 4.1.6.2. | <i>Incertidumbre de la función respuesta UFR = Sxy (global).</i> | 62 |
| 4.1.6.3. | <i>Incertidumbre de resolución (Ures).</i> | 63 |
| 4.1.6.4. | <i>Cálculo de la incertidumbre del método selenio en aguas y lixiviados.</i> | 63 |
| 4.2. | Discusiones | 65 |
| 4.2.1. | <i>Discusión de parámetros críticos de validación del método selenio</i> | 65 |
| | CONCLUSIONES | 66 |
| | RECOMENDACIONES | 67 |
| | GLOSARIO | |
| | BIBLIOGRAFÍA | |
| | ANEXOS | |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1-2: Estándares de calidad de agua para consumo humano. | 11 |
| Tabla 2-2: Estándares internacionales de calidad de agua para consumo humano | 11 |
| Tabla 3-2: Características del lixiviado que hacen peligroso a un residuo tóxico al ambiente | 12 |
| Tabla 4-2: Norma de Calidad Ambiental y de descarga de Efluentes al recurso agua | 13 |
| Tabla 5-2: Límites máximo permisibles para el selenio según la INEN 1108:2014..... | 13 |
| Tabla 6-2: Límites máximos permisibles para el selenio según la RAOHE 1215. | 14 |
| Tabla 7-2: Límites permisibles para selenio según Ordenanza Municipal de Orellana | 14 |
| Tabla 8-2: Programación del sistema FIAS | 22 |
| Tabla 9-2: Tubo de bomba recomendado para GH sistema FIAS | 22 |
| Tabla 10-2: Condiciones estándar de absorción atómica para Se | 24 |
| Tabla 11-2: Ecuaciones para el Análisis de la Varianza | 31 |
| Tabla 12-2: Parámetros a considerarse en una validación de métodos analíticos..... | 37 |
| Tabla 13-2: Parámetros que se consideran en el diseño experimental de métodos analíticos ... | 38 |
| Tabla 1-3: Parámetros de validación y fijación de objetivos para analíticos metálicos..... | 42 |
| Tabla 2-3: Diseño experimental y estadístico para la validación del selenio..... | 42 |
| Tabla 3-3: Estándares para la realización de las curvas de calibración..... | 44 |
| Tabla 4-3: Condiciones experimentales óptimas obtenidas | 45 |
| Tabla 5-3: Condiciones para el control de la sensibilidad del equipo..... | 46 |
| Tabla 1-4: Datos primarios para validación de selenio en aguas para el intervalo de trabajo 0,01 a 0.5 mg/l..... | 52 |
| Tabla 2-4: Datos de la curva de calibración para el método selenio en aguas..... | 53 |
| Tabla 3-4: Parámetros estadísticos de la función respuesta del método selenio en aguas. | 54 |
| Tabla 4-4: Interceptos y pendientes máximas y mínimas para el control de curva de calibración. | 54 |
| Tabla 5-4: Repetibilidad para cada nivel de concentración Analista 1. | 55 |
| Tabla 6-4: Repetibilidad para cada nivel de concentración Analista 2. | 55 |
| Tabla 7-4: Análisis estadístico T student para Analista 1 y Analista 2. | 56 |
| Tabla 8-4: Porcentaje de variación para estándar de trabajo de Se en el intervalo 0.01 a 0.5 mg /l | 57 |
| Tabla 9-4: Límites de control para el estándar de trabajo de Se en aguas..... | 57 |
| Tabla 10-4: Resultados del análisis de varianza en todos los niveles de concentración, Se en aguas | 58 |
| Tabla 11-4: Cálculo de T Fisher en todos los niveles de concentración de Selenio en aguas..... | 58 |
| Tabla 12-4: Incertidumbre de calibración de cada nivel de concentración de Selenio en aguas.... | 59 |

| | |
|---|----|
| Tabla 13-4: Incertidumbre de las soluciones patrón Upp..... | 60 |
| Tabla 14-4: Incertidumbre de material volumétrico U(Vf)..... | 62 |
| Tabla 15-4: Función respuesta de las curvas de calibración..... | 63 |
| Tabla 16-4: Desviación estándar de reproducibilidad (Anova)..... | 63 |
| Tabla 17-4: Incertidumbre del método Selenio en aguas y lixiviados. | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1-2: Selenio Nativo..... | 8 |
| Figura 2-2: Proceso de absorción atómic..... | 15 |
| Figura 3-2: Componentes de un espectrómetro de absorción atómica. | 16 |
| Figura 4-2: Lámpara de cátodo hueco | 16 |
| Figura 5-2: Monocromador..... | 17 |
| Figura 6-2: Generador de Hidruros de flujo continuo. | 20 |
| Figura 7-2: Configuración recomendada de tubos FIAS con un sistema de bomba simple. | 23 |
| Figura 8-2: Esquema de precisión y exactitud..... | 30 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1-2: Distribución normal..... | 35 |
| Gráfico 2-2: Distribución rectangular | 35 |
| Gráfico 3-2: Distribución rectangular..... | 36 |
| Gráfico 1-4: Absorbancia vs Concentración. Linealidad de las curvas de calibración..... | 53 |

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: DECLARACIÓN DE VALIDACIÓN DE SELENIO EN AGUAS

ANEXO B: PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES Y MUESTRAS

ANEXO C: DIGESTIÓN, FILTRACIÓN Y AFORO DE MATRIZ, MUESTRAS
FORTIFICAS Y ESTÁNDARES

ANEXO D: LECTURA DE MUESTRAS.

ANEXO E: DETERMINACIÓN DEL SELENIO EN AGUAS (ITE-AQLAB-46)

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| SAE | Servicio de Acreditación Ecuatoriano |
| SDR | Desviación estándar |
| STD | Estándar |
| U | Incertidumbre |
| K | Intervalo de confianza |
| INEN | Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización |
| ISO | Organización Internacional de Normalización |
| IEC | Comisión Electrotécnica Internacional |
| Se | Selenio |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| GH | Generador de hidruros |
| EAA | Espectrometría de Absorción Atómica |
| NMC | Nivel Máximo Contaminante |
| USEPA | Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos |
| USPHS | Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos y algunos países americanos |
| TULSMA | Texto Unificado Legislación Secundaria de Medio Ambiente |
| RAOHE | Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador |
| EAA | Espectrometría de Absorción Atómica |
| AA | Absorción Atómica |
| HCL | Lámpara de Cátodo Hueco |
| FIAS | Sistema de análisis de inyección de flujo para espectroscopía atómica |
| P1 | Bomba simple |
| FI | Inyección de Flujo |
| PTFE | Politetrafluoroetileno |
| LD | Límite de Detección |
| LC | Límite de Cuantificación |
| ITE | Instructivo Técnico de Ensayo |
| ITU | Instructivo Técnico de Uso |
| r | Repetibilidad |
| R | Reproducibilidad |

RESUMEN

El objetivo fue la validación del método generador de hidruros asociado con espectrometría de absorción atómica para la determinación de selenio (Se) en aguas naturales, de consumo y residuales para el laboratorio Aqlab. Se realizó esta validación por la necesidad de disponer de métodos analíticos validados y acreditados por el Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE), lo que permitirá ampliar el alcance de acreditación técnica basada en la norma INEN ISO IEC 17025:2017. Este trabajo inició con revisión del método normalizado para el análisis de metales en aguas SM 3114 C, 3500-Se. Se validó el método en el intervalo de trabajo de 0,01- 0,5 mg/l, en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. Las muestras de agua potable, fueron aciduladas con HCL al 10%, mientras que las muestras de agua residual fueron digeridas con H₂SO₄ 2,5 N y K₂S₂O₈ al 5%. Se utilizaron HCl al 10% v/v (9 ml/min) como solución de transporte, NaBH₄ al 0,2% p/v (4 ml/min) diluido en NaOH al 0,05% como agente reductor y argón (120 ml/min) como gas de arrastre, a una temperatura de 900°C de la celda de cuarzo. Los parámetros de desempeño determinados, mediante análisis estadístico con un nivel de confianza del 95%, son: linealidad (0,005-0,01 mg/l), límite de detección (LD= 0,005 mg/l), límite de cuantificación (LC= 0,01 mg/l), precisión, exactitud (recuperación 94,80-102,00%), e incertidumbre (U±17%). Los cuales cumplen con los objetivos de validación predefinidos y con los criterios de rendimiento y aceptación tales como: coeficiente de variación de repetibilidad y reproducibilidad SDR <10% e incertidumbre U≤ 30%, el método proporcionó resultados válidos con un nivel de confianza aceptable, datos reproducibles y exactos bajo las condiciones controladas en las que se trabaja en el laboratorio, por lo que la declaración de validación fue aceptada.

Palabras clave: <BIOTECNOLOGÍA>, <SELENIO (Se)>, <ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA>, <LINEALIDAD DEL MÉTODO>, <PRECISIÓN DEL MÉTODO>, <EXACTITUD DEL MÉTODO>, <INCERTIDUMBRE COMBINADA>, <INTERVALO DE TRABAJO>.



Firmado electrónicamente por:
JHONATAN RODRIGO
PARREÑO UQUILLAS



28-09-2020

ABSTRACT

The purpose of the research was the validation of the hydride generator method associated with the atomic absorption spectroscopy for determining the selenium (Se) in drinking water for consumption, and sewage for Aqlab laboratory. This validation was carried out due to the need of having analytical methods which are validated and recognized by the Ecuadorian Accreditation Organization (SAE), this will allow widening the range of technical accreditation based on the INEN ISO IEC 17025:2017 norm. This research started with the revision of the standardized method for the analysis of metals in waters SM 3114 C, 3500-Se. The method was validated considering the work interval from 0,01 to 0,5 mg/l, in repetitiveness and reproducibility conditions. The drinking water samples were acidulated HCL at 10%, while sewage samples were digested H₂SO₄ 2,5 N and K₂ S₂ O₈ at 5%. HCl at 10% v/v (9ml/min) were used as transporting solution, NaBH₄ at 0,2% p/v (4ml/min) diluted in NaOH at 0,5% as reducing agent and argon (120 ml/min) as carrier gas at a temperature of 900°C in the quartz cell. The performance parameters determined through a statistical analysis with a level of trust of 95% are: linearity (0,005-0,01 mg/l), detection limit (LD=0,005 mg/l), quantification limit (LC=0,01 mg/l), precision, accuracy (recovery 94,80-102,00%) and uncertainty (U±17%). This parameters fulfil the predefined validation objectives as well as the performance and acceptance criteria such as: repetitiveness variation coefficient and reproducibility SDR <10% and uncertainty $U \leq 30\%$, the method reflected valid results with and acceptable level of trust reproducible and accurate data under controlled conditions in which the laboratory works; thus, the validation statement was accepted.

Key words: <BIOTECHNOLOGY>, <SELENIUM (SE)>, <ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY>, <METHOD LINEARITY>, <METHOD ACCURACY>, <COMBINED UNCERTAINTY>, <WORK INTERVAL>.

INTRODUCCIÓN

La validación de un método de ensayo es un proceso documentado de confirmación y verificación mediante exámenes, estudios sistemáticos de laboratorio y aportes de evidencias objetivas de que se ha cumplido con los requisitos particulares, con características técnicas y limitaciones de dicho método, además de cumplir con sus especificaciones relativas para una utilización o aplicación específica prevista de los resultados analíticos.

Determinar el selenio en muestras de aguas es importante, así como también su extracción y cuantificación para determinar el grado de contaminación, el perjuicio a la salud humana y al medio ambiente. El método generador de hidruros con espectrometría de Absorción Atómica, permite determinar los elementos que forman hidruros volátiles y detecta concentraciones pequeñas del analito de interés en una matriz agua, para esto; es necesario la extracción del analito, eliminar interferencias de las muestras con tratamiento previo; como filtración o digestión y preservación. Con los datos obtenidos se realizará la validación del método analítico con análisis estadísticos donde se determina el límite de detección, límite de cuantificación, precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad), exactitud, incertidumbre y el intervalo de trabajo. Este método estandarizado es fiable y rápido, presenta adecuadas características de desempeño, al ser preciso y veraz dando resultados correctos y fiables, además de ser una guía a nivel internacional.

El presente trabajo de titulación tiene como objetivo validar el método generador de hidruros por espectrometría de absorción atómica para la determinación de selenio en aguas naturales, de consumo y residuales para el laboratorio Aqlab, para prestar servicios de análisis de laboratorio de alta calidad, ampliar su capacidad de servicio, realizar instructivos técnicos internos evaluados y aceptados para concluir con la validación bajo el cumplimiento de normativa.

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1. Identificación del problema

El selenio (Se) es un elemento mineral natural ampliamente distribuido en la naturaleza presente en su mayoría en las rocas y suelos, presenta cuatro estados de oxidación Se-2, Se0, Se+4, Se+6

El selenio se halla en los minerales de sulfuros metálicos y su principal fuente es el refinamiento electrolítico del cobre (Marval, 2015)

Los procesos responsables de su distribución incluyen actividad volcánica, la quema de combustibles fósiles, la erosión de las rocas y de los suelos, el transporte a través de aguas subterráneas, la precipitación de minerales, la adsorción, reducción y oxidación química o bacteriana, así como la absorción y liberación metabólica por plantas y animales. (Marval, 2015)

Además, se encuentra naturalmente presente en los fertilizantes fosfatados, donde se agrega como nutriente traza. La agricultura no sólo puede incrementar el contenido de selenio en el suelo, sino que también en el agua superficial debido a que las aguas de drenaje de irrigación contienen selenio, además el Se es usado en la industria eléctrica (manufactura de componentes eléctricos, celdas fotoeléctricas y rectificadoras), en suplementos nutricionales (aditivo en la alimentación para aves y ganado), en la industria del vidrio, como un componente de los pigmentos en plásticos, en productos farmacéuticos, en formulaciones de plaguicidas, pigmentos en plásticos, pinturas, barnices, vidrio, cerámica y tintas. (Ávila, 2018)

El Selenio (Se) es un micronutriente antioxidante importante para el ser humano contra enfermedades cardiovasculares, estimula el sistema inmunológico, disminuye el proceso de envejecimiento celular. (Gutiérrez, 2015)

Las fuentes principales son los alimentos como los cereales, carnes y pescado y en el agua de consumo. a dosis altas de Se Las deficiencias en la ingestión de selenio pueden ocasionan problemas cardíacos y musculares pero la exposición prolongada (mayor de 900 µg/d), puede producir selenosis, cuyos síntomas principales son caída del cabello, fragilidad de las uñas, elevada prevalencia de caries y problemas neurológicos. En los animales impide la formación adecuada de los huesos y causa la “enfermedad de álcali y del vértigo ciego”. (Alvarez, 2014)

El selenio es un elemento esencial y la ingesta diaria recomendada para adultos se sitúa alrededor de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal. (OMS, 2013)

En aguas naturales el selenio se presenta como seleniato y en menor proporción como selenito, en aguas superficiales como subterráneas, la concentración de selenio oscila entre 0.02 y 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, pero su nivel de concentración influye por factores geológicos, llegando a superar los 6 mg/L en aguas subterráneas. (Nieto, 2015)

La alteración de la acidez en las aguas y suelos da lugar procesos de biotransformación. Por ejemplo, en presencia de hierro el selenio precipita como selenito férrico, insoluble en agua a pH inferior a 7, mientras que a pH básicos ocurre la oxidación a seleniatos solubles, lo que incrementa la concentración normal de selenio en aguas por encima de 10 a 400 $\mu\text{g}/\text{L}$. (Nieto, 2015)

Para descargas de efluentes a cuerpos de agua deben cumplir con el límite permisible establecido en la normativa, 0.01 mg/L , previniendo posibles contaminaciones ambientales que afecten a la flora y fauna. Para fuentes de agua de consumo humano y doméstico que solo requieren desinfección el límite permisible es 0.01 mg/L . Para la preservación de la vida acuática y silvestre en aguas dulces el límite permisible de selenio es de 0.001 mg/L en aguas dulces (Ambiente, 2015).

Para la determinación de selenio se usará el método de generación de hidruros acoplada a la espectrometría de absorción atómica en análisis de aguas naturales, de consumo y residuales, este método permite determinar los elementos que forman hidruros volátiles. Cuantificando el selenio en aguas se podrá evaluar el impacto ambiental que estos podrían producir y dar forma de disminuir dichas concentraciones. Este método estandarizado es fiable y rápido, presenta adecuadas características de desempeño, al ser preciso y veraz dando resultados correctos y fiables, además de ser una guía a nivel internacional.

1.2. Justificación

La legislación ecuatoriana en lo referente a análisis de muestras ambientales exige que los laboratorios que realicen este tipo de análisis cuenten con métodos analíticos validados y acreditados por el SAE que garanticen a sus clientes resultados veraces.

Aqlab es un laboratorio de Análisis y Evaluación Ambiental ubicado en la ciudad de Puerto Francisco de Orellana en la Provincia de Orellana, enmarca sus actividades dentro de un Sistema de Gestión de Calidad bajo la acreditación de la norma INEN NTE/ISO/IEC 17025:2017 “Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y de calibración y criterios de acreditación del Servicio de Acreditación Ecuatoriano”. El laboratorio presta servicios de análisis de aguas, suelos, lixiviados y alimentos, atendiendo la demanda al sector académico, industrial y de la ciudadanía en general.

“Aqlab” y su filosofía de mejora continua busca la acreditación de ensayo para determinar Se en matriz agua, para tal fin, deben validarse el método analítico de acuerdo con los requerimientos de la norma antes mencionada, estableciendo criterios, guías y documentos externos que respalden la fiabilidad del método analítico y la calidad de los resultados. La determinación del selenio es importante porque este se encuentra en el agua y son perjudiciales a la salud, también influye en el área industrial/ petrolera.

El agua es un recurso vital e indispensable para la vida en el planeta tierra, es el medio donde prosperan diversas formas de vida y es el recurso natural más utilizado en las actividades humanas. Por lo tanto, es imprescindible la conservación de la calidad del agua. La contaminación generada por el selenio en el recurso agua, puede generar afectaciones al ser humano y a los animales si se encuentran en altas concentraciones. La importancia de selenio radica, en que es un elemento esencial que interviene en los procesos metabólicos formando parte de enzimas como la glutadiona peroxidasa, que cataliza la reducción de los peróxidos previniendo así el envejecimiento de las células. Además, el selenio está relacionado con enfermedades que implican el deterioro de los tejidos, la enfermedad de Keshan (enfermedad cardíaca), la enfermedad de Kashin-Beck (enfermedad de los Huesos) y el cretinismo endémico mixedematoso. Hoy en día existen estudios médicos que relacionan el contenido de selenio con enfermedades de gran importancia en la sociedad actual como el sida, alzhéimer, diabetes, etc.

Los resultados de la validación determina la calidad y fiabilidad de la validación, permite el cumplimiento de normativas, ayuda a optimizar procesos y mejora en la productividad con calidad y reducción de costos.

1.3. Objetivos

General

- Validar el método Generador de Hidruros por Espectrometría de Absorción Atómica para la determinación de Selenio en muestras de aguas naturales, de consumo y residuales para el Laboratorio AQLAB en la Ciudad de Orellana.

Específicos

- Determinar las condiciones óptimas de operación del Generador de Hidruros PERKIN ELMER FIAS 100.
- Determinar el tratamiento adecuado para las muestras de aguas naturales, de consumo y residuales con el fin de obtener una recuperación mayor al 80% del analito.
- Utilizar tratamientos estadísticos adecuados para el procesamiento de los resultados analíticos para determinar el alcance del método de análisis.

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA O FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Antecedentes de la investigación

El selenio es un mineral esencial, puede ser beneficioso o perjudicial para los seres vivos, dependiendo de su concentración en el medio, en dosis altas de Se (mayor de 900 $\mu\text{g}/\text{d}$) produce selenosis cuyos síntomas son caída del cabello, fragilidad de las uñas, elevada prevalencia de caries, problemas neurológicos y su deficiencia ocasiona problemas cardíacos y musculares en los seres humanos. (Alvarez, 2014). Es un micronutriente antioxidante importante para el ser humano contra enfermedades cardiovasculares, estimula el sistema inmunológico, disminuye el proceso de envejecimiento celular. (Gutiérrez, 2015). Además de sus implicaciones en la nutrición humana, se usa como pigmento en la coloración del vidrio, en la producción de celdas solares y aplicaciones electrónicas debido a sus propiedades fotovoltaicas y fotoconductoras. (Nieto, 2015)

El selenio es un oligoelemento que puede comportarse como elemento tóxico o esencial en la bioquímica de los seres vivos, dependiendo de su concentración, de su forma química, y de los estados de oxidación del selenio. El selenio con estados de oxidación (IV), (VI) dan lugar a compuestos inorgánicos como haluros (SeF_4 , SeF_6), óxidos (SeO_2 , SeO_3) y ácidos (H_2SeO_3 , H_2SeO_4) y sales inorgánicas (selenitos y seleniatos) que son solubles en agua. (Nieto, 2015).

El contenido de selenio en aguas subterráneas y superficiales es variable pudiendo ir de 0,1 $\mu\text{g}/\text{l}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{l}$. En las aguas potables la cantidad de selenio es más variable siendo normalmente \leq a 0,01 mg/l . La concentración del selenio depende de factores naturales y de actividades antropogénicas. (Jaffé, 2012). Las concentraciones de selenio en el agua de consumo varían en función de la región geográfica, pero pueden ser \leq 0.01 mg/l . La contaminación del agua por selenio proviene de las diferentes actividades antropogénicas, por ejemplo; la producción anual de selenio en el mundo es de 1300 a 1500 toneladas, gran parte es como subproducto en el refinado de otros metales. (Nieto, 2015)

Las Normas Internacionales para el agua potable de la OMS de 1958 recomendaron una concentración máxima admisible de selenio de 0,05 mg/l , basándose en sus posibles efectos perjudiciales para la salud. En 1963 se redujo este valor a 0,01 mg/l , el cual se mantuvo como límite superior provisional de concentración en las Normas Internacionales de 1971. (OMS, 2013).

En la primera edición de las guías para la calidad del agua potable, publicada en 1984, se mantuvo el valor de referencia de 0,01 mg/l de selenio. Las guías de 1993 propusieron un valor de referencia basado en efectos sobre la salud de 0,01 mg/l, derivado de estudios realizados con personas. (Salud, 2003)

En la Normativa Ecuatoriana los límites legales de potabilidad se encuentran entre 0,01 mg/l y 0,04 mg/l según las normativas NTE INEN 2178 para aguas naturales y NTE INEN 1108 para agua de consumo humano, respectivamente. (INEN, 2014)

En 1999 se desarrollaron las primeras aplicaciones de la técnica de generación de hidruros (HG), produciendo arsina mediante el proceso de ácido – zinc atrapándolo criogénicamente con nitrógeno y trasportándolo a una llama en un espectrofotómetro de absorción atómica para determinar arsénico. En los años siguientes la técnica fue aplicada a otros elementos formadores de hidruros volátiles para determinar selenio y arsénico en la EAA con llama. (Alvarez, 2014)

El desarrollo y optimización de diversas metodologías para cuantificar el selenio, se han efectuado en el transcurso del tiempo como el método de espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros, espectrometría de absorción atómica con horno de grafito y espectrometría de fluorescencia atómica con generación de hidruros. (López, 2015) Además (Vaca, 2013), validó esta técnica para determinar arsénico, mercurio y selenio en lixiviados, logrando una recuperabilidad para Se mayor al 110 %, un límite de repetibilidad de Selenio de 2.50 ppb.

Para la determinación de selenio se usará el método de generación de hidruros acoplada a la espectrometría de absorción atómica en análisis de aguas naturales, de consumo y residuales, este método permite determinar los elementos que forman hidruros volátiles. Cuantificando el selenio en aguas se podrá evaluar el impacto ambiental que estos podrían producir. Este método estandarizado es fiable y rápido, presenta adecuadas características de desempeño, al ser preciso y veraz dando resultados correctos y fiables, además de ser una guía a nivel internacional.

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Selenio

El selenio es un elemento de importancia ambiental, biológica y toxicológica. Se presenta de forma natural en el medio ambiente como impureza en forma de selenuro (Se^{2-}) de sulfuros metálicos o con minerales de plata, cobre, plomo o níquel. Es liberado a través de procesos naturales y actividades humanas. (Alvarez, 2014)

Los procesos de emisión natural de selenio ocurren en la erosión de las rocas y suelos, emisiones volcánicas, actividades microbiológicas y plantas. La principal fuente antropogénica de selenio es la combustión de carbón y fósiles. La actividad industrial y agrícola ha acelerado la liberación del elemento de fuentes geológicas y lo ha puesto a disposición de la vida silvestre en los ecosistemas acuáticos y terrestres en todo el mundo. (Gutiérrez, 2015)

El selenio presenta cuatro estados de oxidación (-II), 0, (IV), (VI), posee propiedades físico-químicas intermedias entre metal y no metal. En su forma natural es un sólido, de aspecto gris metálico (Figura 1-2), y rara vez se presenta en su estado elemental en la naturaleza. (Vaca, 2013)



Figura 1-2: Selenio Nativo.

Realizado por: (Asmundis, 2018)

2.2.2. *Selenio en el agua*

El selenio con estados de oxidación (IV), (VI) forman compuestos inorgánicos como haluros, óxidos, ácidos y sales inorgánicas (selenitos y seleniatos) solubles en agua. El selenio es absorbido de la tierra en mayor proporción como seleniato, SeO_4^{2-} y como selenito, SeO_3^{2-} en menor proporción. Cuando el selenio está presente en formas solubles en el agua es absorbido fácilmente por las plantas. (Nieto, 2015). En aguas superficiales y subterráneas, el nivel de concentración de selenio total es bajo, oscilando entre $0.02 \mu\text{g/l}$ y $10 \mu\text{g/l}$ sin embargo, el contenido puede verse notablemente afectado por factores geológicos, llegando a superar los 6 mg/l en aguas subterráneas. (Nieto, 2015)

El medio marino es considerado como disolvente para varias especies de selenio como los selenitos, seleniatos y compuestos orgánicos. En la superficie del agua, los compuestos organoselénicos forman el 80 % del selenio disuelto total mientras que, en el fondo se encuentran especies inorgánicas. En aguas marinas el nivel de selenio encontrado como selenito es $0,004 \mu\text{g/l}$ en las superficies y de $0,06 \mu\text{g/l}$ en el fondo y como seleniato de $0,03 \mu\text{g/l}$ y $0,12 \mu\text{g/l}$ respectivamente. (Asmundis, 2018)

La contaminación del selenio en ecosistemas acuáticos, incluyendo océanos, se produce por los vertidos urbanos e industriales. Por ejemplo, a través de la agricultura se drena agua con un contenido medio de selenio de 1,4 µg/l, y se ha estimado que el vertido de selenio al mar es 8000 toneladas anuales, el selenio vertido puede sufrir transformaciones químicas, aunque puede ser bioconcentrado. La adición del selenito sódico a aguas de lagos interacciona en el metabolismo del mercurio, limitando la disponibilidad de éste por los organismos marinos. (Nieto, 2015)

En aguas y suelos la alteración de la acidez da lugar a procesos de biotransformación, por ejemplo; en presencia de hierro el selenio precipita como selenito férrico, insoluble en agua a pH inferior a 7 mientras y a pH básicos, ocurre la oxidación a selenatos solubles lo que incrementa la concentración normal de selenio en aguas por encima de 10 µg/l a 400 µg/l. (Nieto, 2015)

2.2.2.1. Toxicidad y esencialidad del selenio

La toxicidad del selenio depende de su dosis, la intoxicación aguda por selenio produce infecciones cutáneas, irritación nasal y ocular, deficiencia respiratoria y caries, inclusive produce daños en órganos internos edema vascular, hemorragias, edema pulmonar, taquicardia y parálisis. Las caries dentales son también hallazgos frecuentes en habitantes de zonas seleníferas (Miles, 2017). Y la intoxicación crónica produce enfermedades cardiovasculares, cirrosis e incluso cáncer. (Asmundis, 2018).

La esencialidad del selenio para el ser humano se descubrió en 1979, la deficiencia produce la enfermedad de Keshan que es una miocardiopatía juvenil, afectación muscular que se presenta como una cardiomiopatía congestiva con desenlace fatal por la insuficiencia cardíaca, es el aumento de tamaño del corazón, la arritmia y modificaciones electrocardiográficas.

La osteoaricular o enfermedad Kaschin-Beck caracterizada por una necrosis del cartílago y una distrofia del músculo esquelético. Cada una de estas dos enfermedades, se ha observado en zonas rurales de China y Rusia (Siberia oriental) donde los niveles de selenio en suelo son bajos. (Jaffé, 2012) Además, la deficiencia de selenio es un factor en la concurrencia de otras enfermedades causadas por ARNVirus (por ejemplo, sarampión, influenza, hepatitis y SIDA) (Marval, 2015)

El selenio protege al organismo del estrés oxidativo y al metabolismo de las hormonas tiroideas, la ingesta de selenio se ha asociado a la prevención de enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares, hipertensión, así como diversos tipos de cáncer. También una ingesta adecuada de selenio actúa como protección contra el daño neuronal causado por lesiones cerebrales excitotóxicas. (Marval, 2015)

2.2.2.2. *Importancia del análisis del Selenio*

El análisis del selenio en aguas potables y residuales es importante porque este elemento puede ser beneficioso o tóxico dependiendo de su concentración en el medio, este puede afectar al ser humano, a sistemas de tratamientos de aguas residuales, aguas superficiales y subterráneas. (Nieto, 2015)

El selenio existe en el ambiente como producto de procesos naturales y actividades contaminantes derivados de las actividades humanas. Este elemento es estable y persistente en ambientes acuáticos y su importancia radica en que es un oligoelemento esencial para el metabolismo de organismos, el problema con el selenio es la estrecha diferencia entre lo beneficioso y tóxico. (Asmundis, 2018). El selenio disuelto en forma iónica es absorbido con mayor facilidad, y en forma reducida aumenta las posibilidades de su oxidación y retención por los diversos órganos. La toxicidad del selenio es proporcional a la facilidad de absorción de los seres vivos, bioacumulándose en los tejidos de los organismos (Jaffé, 2012)

2.2.2.3. *Agua y su control de calidad*

El control de la calidad del agua se basa en reglamentos y legislaciones, estableciéndose límites deseables y tolerables, así como orientadores (guías) de calidad. Las aguas se clasifican según su calidad y utilización:

Agua para consumo humano: Para realizar una correcta clasificación se usan unos 20 parámetros de los que los más importantes son: DQO, DBO₅, NH₄⁺, NTK, conductividad, recuentos microbiológicos y metales. (Romero, 2012). El mayor uso que tiene el agua es para el consumo humano, por lo tanto su regulación y control de calidad es indispensable y depende del cumplimiento de las normas y del manejo de este recurso de cada país.

En la tabla 1-2 se indican el nivel máximo contaminante (NMC) para el selenio permitido en agua potable por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), así como también los posibles efectos sobre la salud por exposición que supere dicho límite, las fuentes comunes de contaminación en agua potable y algunas opciones de tratamiento para el contaminante selenio.

Tabla 1-2: Estándares de calidad de agua para consumo humano.

| Estándares de calidad de agua para consumo humano (USEPA, ENERO DE 2018) | | | | |
|---|-----------|---|--|--|
| Contaminante | NMC- mg/l | Posibles efectos sobre la salud por exposición que supere el NMC | Fuentes de contaminación comunes en agua potable | Tratamiento |
| Químicos Inorgánicos | | | | |
| Selenio | 0,05 | Caída de cabello o de las uñas; adormecimiento de los dedos de la mano y de los pies; problemas circulatorios y nerviosos | Efluentes de refinerías de petróleo; erosión de depósitos; naturales; efluentes de minas | Ablandamiento con cal. Coagulación con filtración, alúmina activada, osmosis inversa |

Fuente: (Romero, 2012)

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2019

En la tabla 2-2 se pueden comparar los niveles de calidad para el selenio exigidos en aguas de consumo humano por la Organización Mundial de la Salud (OMS), Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) y Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos (USPHS) y algunos países americanos. (Romero, 2012)

Tabla 0-1: Estándares internacionales de calidad de agua para consumo humano

| Estándares de calidad de agua para consumo humano Sustancia inorgánica (mg/l) | | | | | | |
|--|---------------|------------------|---------------|-------------|----------------------|-----------------|
| Sustancia | USPHS | USEPA | Brasil | OMS | Chile | Canadá |
| Selenio | (1962) | (2002) | (1977) | (1984) | (1984) | (1989) |
| (Se), | 0,01 | 0,05 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| Valor admisible | Canadá (1989) | Argentina (1994) | México (1994) | Perú (1995) | Unión Europea (1998) | Colombia (1998) |
| | 0,01 | --- | --- | 0,01 | 0,01 | 0,01 |

Fuente: (Romero, 2012)

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2019

Agua natural – agua de río: Son cuerpos de agua natural, marino o continental superficial como ríos, lagos y aguas subterráneas. El límite máximo permitido para descargar residuos líquidos a aguas naturales superficiales con respecto al elemento selenio es de 0,01 mg/l. (MSGP, 2018)

Aguas residuales: Son aguas usadas que han sido contaminadas, contienen materia orgánica e inorgánica, material disuelto y en suspensión. Se dividen en aguas residuales domésticas y aguas residuales industriales.

Agua de descargas industriales: Son aguas contaminadas como resultado de procesos, actividades o servicios e industrias que son descargadas desde una fuente emisora, a un cuerpo receptor. La caracterización del agua residual industrial a un cuerpo receptor se determina por varios parámetros, el límite permisible de selenio es de 0,01 mg/l. (MSGP, 2018)

Lixiviados: Es agua que se ha contaminado por componentes de los residuos cuando se filtra a través de un sitio de disposición de residuos. Se forman de procesos de descomposición microbiana, reacciones químicas y bioquímicas propias del lixiviado y de componentes de los residuos. (Cañizares, 2002). Los elementos comunes en lixiviados son: Pb, Hg, As, Se, Ba, Ag, Cr, Cu, Cd y la carga contaminante dependen del origen del lixiviado, si son de rellenos sanitarios tendrán más carga de materia orgánica y si proceden de desechos industriales o de perforación minera tendrán más materia inorgánica por ende más concentración de metales. (Cañizares, 2002)

La norma mexicana establece las características de los residuos y los límites que hacen a un residuo tóxico al ambiente. Los límites permisibles de lixiviados para la disposición final de lodos y ripsos de perforación en superficie se observan en la tabla 3-2. (SEMARNAT, 1993)

Tabla 3-2: Características del lixiviado que hacen peligroso a un residuo tóxico al ambiente

| Constituyentes inorgánico | Concentración Máxima Permitida (mg/l) |
|---------------------------|---------------------------------------|
| Selenio | 1,0 |
| Arsénico | 5,0 |
| Bario | 100 |
| Cadmio | 1,0 |
| Cromo hexavalente | 5,0 |
| Níquel | 5,0 |
| Mercurio | 0,2 |
| Plata | 5,0 |
| Plomo | 5,0 |

Fuente: (SEMARNAT, 1993)

Realizado por: Stephanie Pintado, 2020

2.2.3. Normativas Ambientales

2.2.3.1. Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente

La reforma del TULSMA, el libro VI establece los principios básicos y el enfoque general para el control de la contaminación del agua, los criterios de calidad del agua para sus distintos usos, los límites permisibles, disposiciones y prohibiciones para las descargas en cuerpos de aguas. Para el selenio establece los límites permisibles que se describen en la siguiente tabla 4-2. (TULSMA, 2015. Anexo 1 del libro VI del TULSMA)

Tabla 4-2: Norma de Calidad Ambiental y de descarga de Efluentes al recurso agua

| 097-A Reforma Texto Unificado Legislación Secundaria Medio Ambiente libro VI Anexo 1 del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente: Norma de Calidad Ambiental y de descarga de Efluentes al recurso agua | |
|---|--------------------------|
| Criterios de calidad de las aguas | Límite permisible |
| Tabla 1: Criterios de calidad de fuentes de agua para consumo humano y doméstico | 0.01 mg/l |
| Tabla 2: Criterios de calidad admisibles para la preservación de la vida acuática y silvestre en aguas dulces, marinas y estuarios | 0.001 mg/l |
| Tabla 3: Criterios de calidad de aguas para riego agrícola | 0.02 mg/l |
| Normas generales para descarga de efluentes. | |
| Tabla 8: Límites de descarga al sistema de alcantarillado | 0.5 mg/l |
| Tabla 9: Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce | 0.1 mg/l |

Fuente: (TULSMA, 2015. Anexo 1 del libro VI del TULSMA)

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2019

2.2.3.2. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1108:2014

Esta norma es usada para el control del agua potable y sus requisitos necesarios en los sistemas de abastecimientos públicos y privados. (INEN, 2014). Para selenio ver tabla 5-2.

Tabla 5-2: Límites máximo permisibles para el selenio según la INEN 1108:2014

| Límites máximos permisibles para Selenio de la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de efluentes al recurso agua. | |
|--|--------------------------|
| Normativas | Límite permisible |
| NTE INEN 1108 , Sexta revisión, para agua potable y requisitos | 0.04 mg/l |

Fuente: (TULSMA, 2015. Anexo 1 del libro VI del TULSMA)

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2019

2.2.3.3. *Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador 1215.*

RAOHE presenta el reglamento ambiental y las normas técnicas ambientales que se aplican en todas las operaciones hidrocarburíferas (RAOHE). El límite permisible para selenio según la RAOHE está en la tabla 6-2.

Tabla 6-2: Límites máximos permisibles para el selenio según la RAOHE 1215.

| Límite máximo permisible para Selenio de la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de efluentes al recurso agua. | |
|---|--------------------------|
| Normativa | Límite permisible |
| RAOHE 1215 , en Anexo 3. Tabla 10. Parámetros adicionales y límites permisibles para aguas y descargas líquidas en la exploración, producción, industrialización, transporte, almacenamiento y comercialización de hidrocarburos y sus derivados | < 0.5 mg/l |

Fuente: (TULSMA, 2015. Anexo 1 del libro VI del TULSMA)

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2019

2.2.3.4. *Ordenanza Municipal del Cantón Francisco de Orellana*

La Ordenanza presenta criterios exigidos de calidad de agua superficiales destinadas al consumo humano y producción de agua potable, ver los límites permisibles para selenio en la tabla 7-2.

Tabla 7-2: Límites permisibles para selenio según Ordenanza Municipal de Orellana .

| Criterios de calidad para aguas superficiales para el consumo humano y producción de agua potable | |
|--|---------------------------------|
| Parámetro | Límite permisible (mg/l) |
| Selenio (Se) | 0,1 |

Fuente: (Orellana, 2017)

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2019

2.2.4. *Espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros.*

La generación de hidruros es un proceso importante para la determinación eficaz de selenio que se acopla a un espectrómetro de absorción atómica. La reacción de obtención del hidruro de selenio tiene un alto rendimiento y su procedimiento ofrece buena detectabilidad y versatilidad, permite la separación del analito en matrices complejas y consigue alcanzar límites de detección bajos. (APHA, 2012)

Las muestras de agua se digieren con ácidos oxidantes y a temperaturas elevadas para convertir todo el selenio Se^{+6} a Se^{+4} . Los Selenatos⁺⁶ se reducen a Selenito⁺⁴ con ácido clorhídrico, y posteriormente, él Se^{+4} reacciona con el borohidruro de sodio para la obtención de hidruro de selenio. (Montel, 2016). El hidruro de selenio se transporta por un flujo de gas (normalmente argón) a una celda de cuarzo situada en la trayectoria de un haz de luz de un espectrómetro de absorción

atómica. La celda es calentada eléctricamente o por medio de una llama para romper el hidruro en átomos de selenio. (Ruiz, 2017)

2.2.4.1. Espectrometría de Absorción atómica

La espectrometría de absorción atómica permite determinar la concentración de un elemento en una muestra acuosa mediante la relación absorbancia/concentración del elemento objeto de análisis. (Montel, 2016).

La absorción atómica es el proceso que ocurre cuando un átomo en estado fundamental es capaz de absorber energía radiante a una longitud de onda específica. (Razmilic, 1994). La Absorbancia es la cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra, expresada en logaritmo que surge del vínculo entre la intensidad que sale y la intensidad que ingresa a la sustancia. (Skoog, 2008)

La EAA se basa en la ley de Beer-Lambert, que expresa la proporción directa entre la absorción de luz con las propiedades del material que la luz atraviesa. Relaciona la intensidad de luz entrante en un medio con la intensidad saliente después de que en dicho medio se produzca absorción. (APHA, 2012). Los elementos químicos tienen un número específico de electrones asociados con su núcleo. La configuración orbital normal y más estable de un átomo se conoce como el "estado fundamental". Al aplicar energía a un átomo, la energía se absorberá y se promoverá un electrón externo a una configuración menos estable conocida como "estado excitado". Como ese estado es inestable, el átomo volverá inmediatamente al "estado fundamental", liberando energía de la luz (Elmer, 1996). Al medir la cantidad de luz absorbida, se puede cuantificar de la cantidad de analito (Higuera, 2017). El proceso de absorción atómica se ilustra en la figura 2-2.

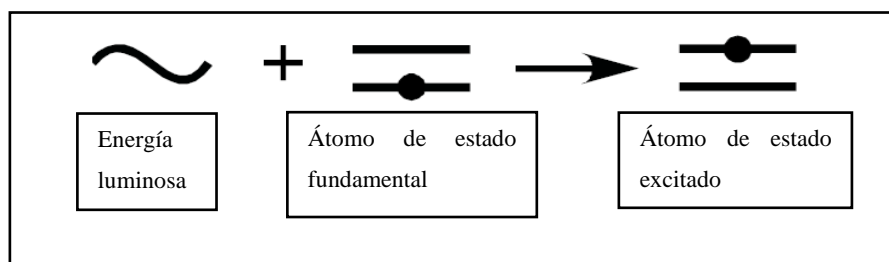


Figura 0-1: Proceso de absorción atómico

Realizado por: (Elmer, 1996)

2.2.4.2. Componentes del espectrómetro de absorción atómica

Existe cinco componentes básicos de un instrumento de absorción atómica (Montel, 2016) como se observa en la figura 3-2.

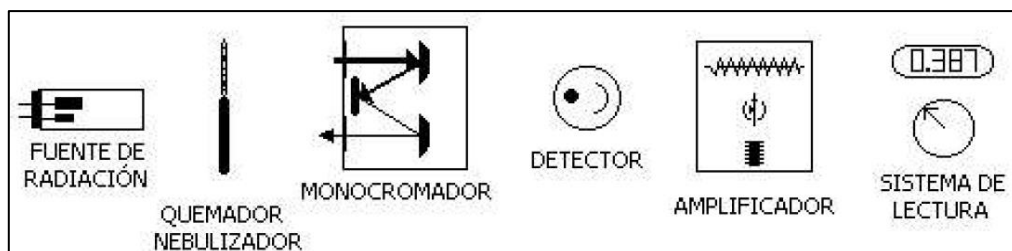


Figura 3-2: Componentes de un espectrómetro de absorción atómica.

Realizado por: (Rocha, 2020)

Fuente de radiación: Fuente de luz que emite una línea o espectro específico correspondiente a la necesaria para efectuar la transición en los átomos del elemento analizado. Como los átomos absorben la luz en longitudes de onda muy específicas, es necesario utilizar una fuente de línea estrecha que emita los espectros de línea estrecha del elemento de interés. Las fuentes de línea estrecha proporcionan alta intensidad y hacen de la absorción atómica una técnica analítica específica. (Higuera, 2017)

Lámparas de cátodo hueco (HCL) son fuentes de energía utilizadas en la Absorción Atómica, están formadas por un cilindro de vidrio que contiene un ánodo y un cátodo cilíndrico hueco que están cerrados herméticamente en un tubo de vidrio lleno de un gas amortiguador (neón o argón) a una presión de 1 a 5 Torr. El cátodo tiene forma de cilindro hueco está enteramente hecho del metal a analizar o en su interior está depositado en forma de una capa el elemento o metal cuyo espectro se desea obtener y el ánodo es un alambre grueso hecho de níquel o tungsteno (Aqlab, 2019). Ver figura 4-2.

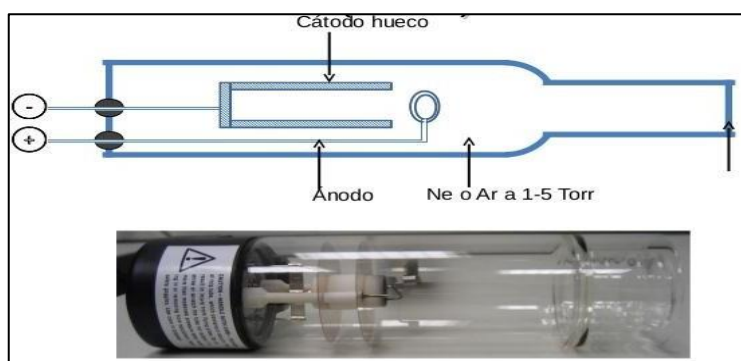


Figura 4-2: Lámpara de cátodo hueco

Realizado por: (Elmer, 2018)

Sistema de generador de hidruros: El sistema de atomización para muestras y patrones utilizado es el generador de hidruros, que forma el hidruro del elemento, usando una "célula de absorción" (FIAS) célula cilíndrica de cuarzo en la que se producen los átomos de la muestra (Ardila, 2017). El sistema permite analizar constituyentes atómicos de muestras acuosas, transforma la solución líquida a estado gaseoso en el generador de hidruros (APHA-AWWA-WPCF, 1992). El generador de

hidruros tiene como función generar átomos en su estado fundamental, trabaja a altas temperaturas para producir la atomización del elemento. (Vergara, 2019)

Monocromador: Sistema óptico tiene como función separar la radiación de longitud de onda de interés de todas las radiaciones emitidas en el proceso. Sirve para la dispersión de la luz, dispone de una rendija de entrada que limita la radiación lumínica producida por la fuente y la confina en un área determinada, es un conjunto de espejos que permite pasar la luz a través del sistema óptico. (Higuera, 2017). Ver figura 5-2.

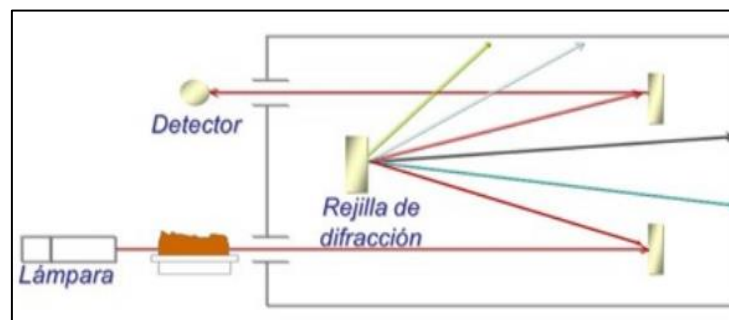


Figura 5-2: Monocromador

Realizado por: (Ardila, 2017)

Detector: Dispositivo que transforma las señales de intensidad de radiación electromagnéticas en intensidad de corriente o luz. (Ardila, 2017). El sistema de detección puede estar diseñado con fotoceldas, fototubos, fotodiodos o fotomultiplicadores, esto depende de los rangos de longitudes de onda, de la sensibilidad y de la velocidad de respuesta requeridas. (Ardila, 2017)

Amplificador: Amplifica la señal eléctrica que se produce para ser procesada por circuitos eléctricos comunes y para convertir la transmitancia medida en absorbancia. (Higuera, 2017)

Sistema de lectura: Dispositivo que convierte la intensidad de corriente emitida en una señal que pueda ser interpretada con facilidad para el operario. (Higuera, 2017). Este sistema de lectura, puede ser una escala de aguja, una escala de dígitos, una serie de datos que pueden ser procesados a su vez por una computadora, por ejemplo en unidades de absorbancia. (Montel, 2016).

2.2.4.3. Interferencias en Absorción Atómica

Las interferencias que se producen en espectroscopia de absorción atómica se clasifican en:

Interferencias físicas: Son efectos causados por las propiedades físicas de la muestra en disolución. Estas pueden afectar a la aspiración y eficiencia de la nebulización en el sistema del

generador de hidruros. Si las soluciones presentan diferencias de viscosidad y/o tensión superficial, la eficiencia de nebulización no será igual y los resultados analíticos se verán afectados. (Elmer, 1997)

Interferencias químicas: Es la influencia de ciertos elementos sobre otros por formar compuestos, alteran el número total de átomos libres formados por unidad de volumen, debido a la formación compuestos estables. Son interferencias poco comunes en la técnica de EAA y se eliminan usando lámparas de un solo elemento y/o utilizando la técnica de adición de estándares. También la adición de agentes liberadores en la muestra, que son cationes que reaccionan con la interferencia impidiendo así su interferencia con el analito de interés, por ejemplo: la interferencia de fosfato en la determinación de magnesio es eliminada mediante la adición de lantano y a la interferencia del silicato en la determinación de manganeso se reduce añadiendo calcio a la muestra y a los patrones. (Higuera, 2017)

Interferencias por ionización: Es cuando la especie de interés pierde algún electrón, formando los iones y se producen en los elementos de fácil ionización, como alcalinos y alcalinotérreos. Para eliminar estas interferencias se adiciona un supresor de ionización, el cual es un elemento que proporciona una concentración de electrones relativamente alta, con lo que inhibe la ionización del elemento de interés. La ionización es indeseable debido al error que causa en las lecturas del analito. (Higuera, 2017)

Interferencia por absorción de fondo: En la absorción molecular y la dispersión de la luz causadas por partículas sólidas en la flama pueden causar errores positivos y para evitar estas interferencias se debe utilizar una corrección de fondo, para obtener valores precisos. (EAA, 2019). El método de corrección de fondo en fuente continua usa una lámpara de deuterio o el efecto Zeeman como fuente de radiación continua. (Higuera, 2017)

Interferencias espectrales: Son causadas por señales alteradas de la longitud de onda de radiación electromagnética seleccionada, la radiación del elemento a determinar es directamente influenciada existiendo interferencias de bandas, por dispersión de partículas e interferencias de líneas atómica. (EAA, 2019)

Interferencias no espectrales: Son aquellas que causan errores y que pueden dar origen a lecturas mayores o menores a los valores normales. Las interferencias de este tipo son interferencias por volatilización de soluto. (Samaniego., 2017)

2.2.4.4. *Aplicación*

La espectrometría de absorción con generador de hidruros, es una técnica analítica más utilizadas, sirve para detectar y determinar cuantitativamente elementos y/o metales en estado fundamental como en estado analítico, es aplicable para una gran variedad de matrices.

Algunas aplicaciones son: análisis de cualquier tipo de agua, lodos, lixiviados, alimentos, muestras geológicas, muestras orgánicas, metales y aleaciones, petróleo y subproductos; y en industrias químicas y farmacéuticas. La EAA tiene ventajas de especificidad, sensibilidad y fácil operación. (Cañizares, 2002).

2.2.5. *Generador de hidruros*

Existen elementos difíciles de volatilizar con llama u horno, para estos elementos se utiliza el sistema generador de hidruros, formando el hidruro metálico volátil del elemento en el seno de la disolución donde se halla el analito, como el arsénico, selenio, telurio, antimonio, bismuto y estaño o directamente vapores como en el caso del mercurio. (Gallarta, 1992)

El generador de hidruros de flujo continuo (ver figura 6-2), consta de una bomba peristáltica que bombea la muestra y reactivos a un tubo manifold (tubo múltiple) donde se produce la mezcla. La solución se mezcla y fluye a través de un tubo serpentín donde se forma el hidruro del elemento junto con hidrógeno. Con la ayuda del gas portador (argón), el hidruro (junto con el hidrógeno) entra a un recipiente separador gas - líquido donde el hidruro gaseoso es removido de la solución. (EAA, 2019).

Posteriormente el hidruro gaseoso es transportado hasta la celda de absorción de cuarzo, que está montada sobre el mechero y calentada con llama aire-acetileno. Como la celda está en el paso óptico de la radiación emitida por la lámpara de cátodo hueco, se produce una absorción de la luz por parte de los átomos del analito que será proporcional a su concentración. (PerkinElmer)

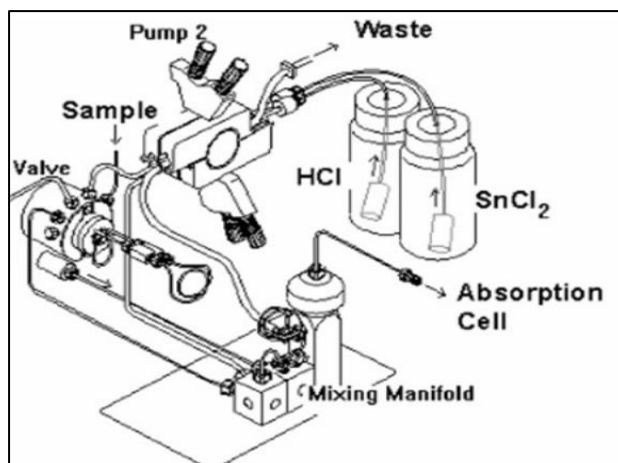


Figura 6-2: Generador de Hidruros de flujo continuo.

Realizado por: (Vaca, 2013)

La generación de hidruros es un procedimiento de introducción de muestras en sistemas instrumentales de análisis, que se usa por sus ventajas; preconcentración del analito, eliminación parcial de interferencias de matriz en el proceso de atomización, disminución de absorción de fondo, generación a temperatura ambiente y empleo de sistemas de generación sencillos. (Gallarta, 1992). Además, aumenta la sensibilidad de la técnica de absorción atómica, especialmente en estos elementos de importancia por ser contaminantes ambientales y toxicológicos. (Cañizares, 2002)

2.2.5.1. Métodos para formación de Hidruros

Existe dos métodos a través de los cuales se puede formar un hidruro:

- 1.- El método del boro hidruro de sodio, NaBH_4 , que implica la reacción del elemento analito, en una solución ácida, con el NaBH_4 para formar hidruros gaseosos del elemento en estudio.
- 2.- El método del cloruro estaño II, SnCl_2 , en el cual se agrega $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a la muestra. La solución obtenida reacciona con el SnCl_2 que está en medio ácido para formar el hidruro gaseoso del elemento de interés.

La generación de seleniuro de hidrógeno sólo se puede realizar cuantitativamente a partir de Se (IV), con una solución de borohidruro de sodio que genera los hidruros volátiles correspondientes y con ácido clorhídrico por su facilidad de manejo y ausencia de reacciones secundarias. (EAA, 2019)

2.2.5.2. *Interferencias en la generación de hidruros*

El estudio de interferencias sobre cualquier método puesto a punto es importante. Según el efecto que producen, las especies interferentes se pueden incluir en grupos determinados. (Asensio, 2018). El grado de interferencia depende de cada especie y de las condiciones de generación.

Las causas de interferencia principales son el consumo preferencial del agente reductor por parte de la especie interferente, absorción del hidruro generado sobre el precipitado metálico formado al adicionar el agente reductor y/o descomposición catalítica del hidruro, formación de sales insolubles entre el analito reducido y la interferencia en forma catiónica. La eliminación de interferencias depende del mecanismo de actuación de las mismas: dilución de la muestra, retención del hidruro, modificación del medio de reacción, formación de complejos u otros métodos. (Gallarta, 1992)

Las especies que interfieren sobre la generación se pueden dividir según la fase en la que actúan: líquida o gaseosa. Las interferencias en la fase líquida son comunes en todas las técnicas de determinación, ya que influyen en el proceso de generación. En cambio, las que actúan en fase gaseosa, son específicos de cada técnica analítica. (EAA, 2019).

Las especies que actúan antes de la generación de hidruros son; en reacciones de acomplejamiento: es el caso del fluoruro con selenio (IV) y arsénico (V), en reacciones de oxidación el permanganato con Se (IV) y As (III). (Asensio, 2018).

Ciertas especies manifiestan mecanismos de interferencias durante la generación de hidruro, formando precipitados en la determinación de selenio, las especies que interfieren son los cationes: Mo(VI), Co(II), Ni(II), Cu(II) y Cd(II), que anulan la señal para concentraciones bajas de los mismos. Según el supuesto mecanismo por el que actúan son:

- Especies reducibles a estado elemental: hierro, cobalto, níquel, cobre, cadmio y mercurio, provocan adsorción y descomposición del hidruro.
- Especies interfierentes sobre Se (IV), por formación de seleniuros muy insolubles: hierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, cadmio y mercurio.
- El Molibdeno (VI) sobre Se (IV), disminuye la señal por formación de molibdeno elemental que absorbe y descompone el hidruro

Las especies que actúan después de la generación, se producen por la generación simultanea de otros elementos volátiles junto con el hidruro del analito, cuyos espectros se solapan provocando un aumento de señal. Las que generan hidruros como: selenio(IV), arsénico (III) y las especies

que generan otros volátiles como el nitrato en presencia de cationes de elementos de transición fácilmente reducibles, como el hierro (III) que provoca un incremento de señal, el hierro elemental formado, cataliza la transformación de nitrato en óxidos de nitrógeno volátiles. (Asensio, 2018).

2.2.6. Optimización de Generador de hidruros

Para la generación de hidruros se usa el sistema de análisis de inyección de flujo para espectroscopia atómica (FIAS), el sistema cuenta con un separador liquido-gas para técnicas de generación de hidruros (FIAS, 2017). La tabla 8-2 muestran programas típicos para FIAS.

Velocidades de la bomba: Cada paso incluye el intervalo de tiempo para cada proceso, la posición de la válvula FIAS (llenar o inyectar) y el tiempo en el que se debe activar la función de lectura. (FIAS, 2017).

Tabla 8-2: Programación del sistema FIAS

| Paso # | Hora (s) | Velocidad de la bomba (rpm) Bomba 1 (P1) | Posición de la válvula | | Leer |
|----------------|-------------|---|------------------------|-----------|------|
| | | | llenar | Inyección | |
| Relleno previo | 15 | 120 | * | | |
| 1 | 10 | 120 | * | | |
| 2 | 15 | 120 | | * | * |

Fuente: (FIAS, 2017).

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020

Tubo de bomba peristáltica: Usar tubos de bomba de la longitud y diámetro adecuados. El tubo de la bomba para los desechos debe ser lo suficientemente grande para evitar inundaciones en el separador de gas/líquido (FIAS, 2017). Para las aplicaciones estándar, se utiliza las indicaciones de tubo de bomba de la tabla 9-2. Usar tubos de politetrafluoroetileno (PTFE). La configuración FIAS con sistema de bomba simple como se detalla en la figura 7-2.

Tabla 9-2: Tubo de bomba recomendado para GH sistema FIAS

| Tubería | | Diametro interno | Color |
|-----------------|----------|------------------|---------------|
| Solución | FIAS 100 | (mm) | Código |
| Muestra | P1 | 1.52 | Azul-amarillo |
| Portador | P1 | 1.52 | Azul-amarillo |
| Agente reductor | P1 | 1.14 | Rojo-rojo |
| Residuos | P1 | 3.18 | Blanco-negro |

Fuente: (FIAS, 2017).

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020

Nota: P1= bomba simple

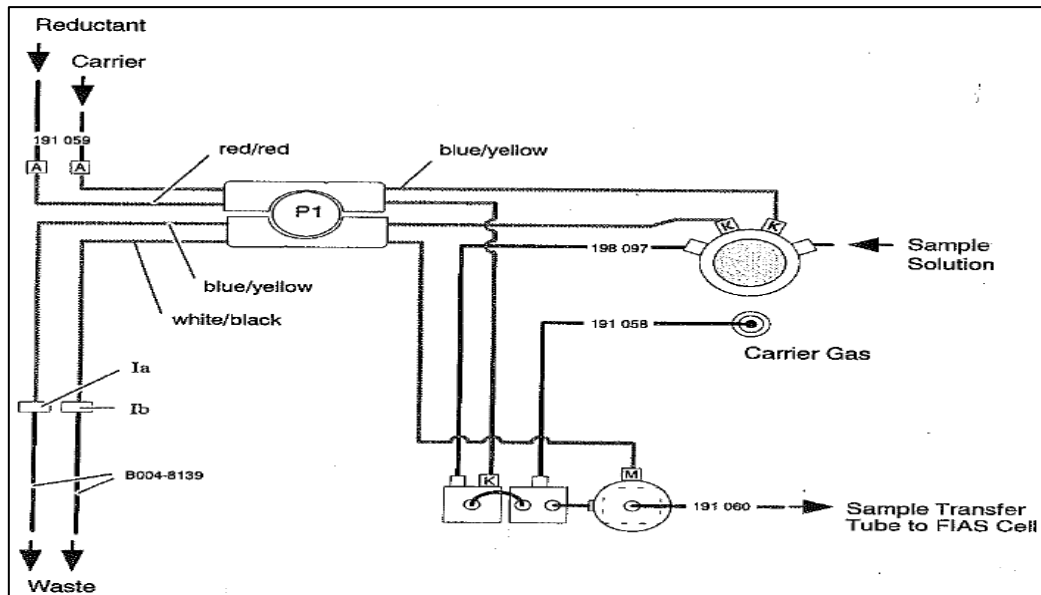


Figura 7-2: Configuración recomendada de tubos FIAS con un sistema de bomba simple.

Fuente: (FIAS, 1993)

Para la configuración y realización del análisis de selenio en el sistema FIAS, se debe realizar la optimización del sistema de fluido FIAS para más detalle de funcionamiento, uso y análisis ver el ITU-AQLAB-46. (Aqlab, 2019).

Ajustar los flujos del fluido portador y reductor de modo que la relación del flujo portador al flujo reductor sea aproximadamente 2:1 con un flujo portador. (FIAS, 2017)

Carrier: Solución portadora ácido clorhídrico al 10% (v/v) en 100 ml de disolución. El flujo debe estar entre 9-11 ml/min.

Reductante: La concentración del agente reductor 0.2% (p/v) NaBH_4 en 0.05% (p/v) NaOH en 100 ml de disolución, con flujo entre 4-7 ml/min.

Gas portador: Ajuste la presión de salida del gas inerte a 3.6 bar (58 psig, 360 kPa). Establecer el flujo de gas argón portador entre 50-100 ml/min para la mayoría de elementos.

La corriente de gas portador tiene una gran influencia en la sensibilidad. Si el flujo es demasiado alto, el átomo o la nube de hidruro se dispersan demasiado rápido. Si el flujo es demasiado bajo, la señal resultante y la sensibilidad son más bajas (FIAS, 2017)

Muestras: La concentración de ácido clorhídrico de muestra Se^{4+} al 10% (v/v). La sensibilidad para determinar selenio, depende de la condición que se encuentre la célula de cuarzo. (Elmer, 2018)

Para optimizar el equipo de EAA, se debe considerar las capacidades básicas del equipo y los procedimientos operativos del instructivo de uso del espectrómetro de absorción atómica ITU-AQLAB-04. (Aqlab, 2019)

El equipo de EAA para técnicas de absorción atómica con generador de hidruros, posee corrección de radiación de fondo estándar para eliminar interferencias: vigas de referencia y de muestreo, cortadas, de doble haz, compartidas en el tiempo y en el espacio, tanto para fuentes lineales como continuas que se modulan electrónicamente. (Elmer, 1997). No se requiere el uso de un corrector de fondo con el FIAS, ya que el analito está separado completamente de la matriz.

Según el libro Métodos analíticos para espectroscopía de absorción atómica (Elmer, 1996). Las condiciones estándar para el método de absorción atómica para selenio (tabla 10-2) son:

Tabla 10-2: Condiciones estándar de absorción atómica para Se

| Longitud de Onda (nm) | Corte largo (nm) | Ruido relativo | Concentración característica (mg/L) | Característica Control de concentración (mg/L) | Rango lineal (mg/L) |
|-----------------------|------------------|----------------|-------------------------------------|--|---------------------|
| 196,0 | 2,0 | 1,0 | 0,59 | 30,0 | 200,0 |

Fuente: (Elmer, 1996)

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

Para control de sensibilidad según (Elmer, 2018) se debe realizar el análisis de 500 µL de una solución de selenio de 10 µg/L debe proporcionar una señal de aproximadamente 0.200 A. Los datos se obtuvieron usando LDE. (Elmer, 1996)

2.2.7. Validación e incertidumbre de métodos analíticos

2.2.7.1. Métodos y guías de referencia

2.2.7.2. Métodos estándar

El libro “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*”, es una referencia completa de métodos normalizados, es utilizada a nivel mundial como guía de laboratorios que abarca todos los aspectos técnicos de análisis de aguas limpias y residuales en América, en ella también se describe los métodos de muestreo y análisis de aguas. (Baird, 2017)

2.2.7.3. Guía Eurachem para la Validación de Métodos

Las guías Eurachem son aplicadas a nivel mundial, en laboratorios para la validación y estimación de la incertidumbre, el SAE exige el uso de estas guías para el cumplimiento de acreditación de los laboratorios bajo la norma ISO/IEC 17025:2017 “Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo”. Estas guías permiten establecer un sistema internacional para asegurar la trazabilidad en mediciones analíticas y la promoción de prácticas de calidad. (Eurachem, 2016). Los documentos que se tomaron de EURACHEM fueron:

Guía Eurachem para la Validación de Métodos y Temas Relacionados-Métodos Analíticos adecuados a su propósito. Guía útil para laboratorios que requieran realizar una correcta validación de métodos analíticos. (Eurachem, 2016)

Guía Eurachem para la cuantificación de la incertidumbre en medidas analíticas. Detalla los procesos de cuantificación y evaluación de estimación de incertidumbre en análisis químicos cuantitativos. Es aplicable a todos los campos de utilización y en todos los niveles de precisión, desde un análisis de rutina, investigaciones básicas y métodos empíricos. (Eurachem, 2012)

2.2.7.4. Norma NTE-INEN ISO/IEC 17025:2017

Norma Técnica Ecuatoriana que detalla los “Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración”, incluyendo el muestreo. Además, se complementa esta norma con métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos en desarrollo por el propio laboratorio. (17025, 2006). Esta norma se ejecuta bajo un sistema de gestión de calidad, evalúa la administración y la competencia técnica del laboratorio, laboratorios acreditados tienen como función crear resultados válidos. El correcto cumplimiento de la norma en toda organización pública o privada, implica también el cumplimiento con los requerimientos técnicos de la ISO 9001, pero no del modo inverso. (Samaniego., 2017)

2.2.7.5. Validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico es la afirmación mediante pruebas y aportes de evidencias de que se ha cumplido los requisitos, características técnicas, limitaciones del método y que las características de desempeño del método analítico son aptas para el uso previsto y propósito. (ISO/IEC, 2005). En sí es probar la aptitud de los métodos, así como la capacidad del laboratorio y se apoya en los parámetros estadísticos. (EURACHEM, 2014). Un laboratorio debe validar métodos no normalizados, diseñados y/o desarrollados por el laboratorio, métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación y ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados. (Aqlab, 2019)

2.2.7.6. Proceso de validación

El proceso de validación de métodos analíticos, se divide en las siguientes etapas:

- a) Necesidad analítica: Se establece por necesidad de satisfacción de una demanda analítica del laboratorio. (ASECAL, 2019)
- b) Elección de método: Revisión de métodos disponibles y elección de método apropiado que satisfaga una determinada demanda, el método elegido puede estar publicado como norma

internacional, nacional o regionales. (Aqlab, 2020)

- c) Puesta a punto: Proceso de ajuste y afinación de variables del método. En esta fase “se prueba” los parámetros de validación y se consigue que el “método funcione” produciendo respuestas razonables, aceptables y consistentes. (ASECAL, 2019)
- d) Elección de parámetros de validación y fijación de objetivos de validación: Se basa en guías aplicables y en la experiencia obtenida en la puesta a punto. Los objetivos de validación se establecen con la selección de los parámetros de validación. (Aqlab, 2020)
- e) Diseño experimental y estadístico: Es el diseño experimental de validación. Y sirve para la obtención de los parámetros elegidos, siguiendo el procedimiento.
- f) Realización de ensayos diseñados: De acuerdo con el procedimiento (borrador) y son evidencias registrales completas.
- g) Tratamiento estadístico de datos obtenidos: Es el tratamiento estadístico de los datos obtenidos del laboratorio para los parámetros de validación. (Aqlab, 2020)
- h) Declaración de método validado y registro: Si se cumple los objetivos, se declara el método validado. (ASECAL, 2019)

2.2.7.7. *Parámetros relacionados con la calidad de un método analítico*

- 1) **Confirmación de la identidad:** Establece que la señal producida en la medición se atribuye a la presencia del analito de interés y no a la presencia de otros elementos. (CYTED, 2009). La identidad del analito permite saber si el analito puede existir en la muestra en más de una forma: diferentes estados de oxidación, en forma orgánica o inorgánica, etc. (Remache, 2013)
- 2) **Selectividad/especificidad:** Determina si la presencia de otras sustancias similares al analito, interfieren y contribuyen a una señal errónea en la medición. Al máximo de selectividad se le denomina especificidad, es decir; un método será específico cuando la señal medida solo proviene del analito de interés. (Jurado, 2017). Aptitud y fiabilidad de un método para determinar de forma exacta y específica el analito de interés en presencia de interferencias. (Remache, 2013). Los estudios de selectividad buscan los efectos de los interferentes probables, mediante la adición del interferente en el blanco y muestras fortificadas. Los resultados observados se utilizan para demostrar que los efectos en la práctica no son significativos (Eurachem, 2016).
- 3) **Límite de detección (LD):** Es la concentración más baja del analito detectada durante el

proceso del método con cierto nivel aceptable de confianza de que dicha concentración detectada es mayor que el blanco. (CYTED, 2009). También se define, como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco de muestra más 3 desviaciones estándar de la media del blanco. En unidades de concentración (mg/l) se tiene la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{\bar{Y}_b + 3S_b}{m} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

\bar{Y}_b = Promedio de las lecturas del blanco, Abs

S_b = Desviación estándar de las lecturas del blanco

m = Pendiente de la recta de calibración

- 4) Límite de cuantificación (LC):** Es la menor concentración de analito determinada experimentalmente con aceptable nivel de precisión de repetibilidad y veracidad. (EURACHEM, 2014). También conocido como el límite de determinación, es la concentración del analito al valor del blanco de muestra más 10 desviaciones estándar de la medida del blanco. En unidades de concentración (mg/l) se tiene la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{\bar{Y}_b + 10S_b}{m} \quad \text{Ecuación 2}$$

- 5) Intervalo de trabajo:** Es el Intervalo de trabajo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable, es el rango de concentraciones del analito dentro del cual se considera el método validado. Este rango, los valores deben estar a un nivel aceptable de exactitud adecuado al objetivo del método. (Remache, 2013). El extremo inferior del intervalo de trabajo esta definido por el limite de cuantificación. El extremo superior del intervalo de trabajo, está definido por el sistema de respuesta del instrumento. (CENAM, 2005)

- 6) Linealidad/Función respuesta:** Es la aptitud para obtener resultados proporcionales a la concentración del analito. Es la relación entre la concentración del analito y la señal o respuesta del método denominada curva de calibración. (Remache, 2013). Cuando no es posible realizar la linealidad de un método, se debe encontrar un algoritmo adecuado, para la determinación de la función respuesta de un método se calcula con los siguientes parámetros:

Pendiente:

$$b = \frac{\sum (X_i - \bar{x})(Y_i - \bar{Y})}{\sum (X_i - \bar{x})^2} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

X_i = Concentración, mg/l

Y_i = Absorbancia, Abs

\tilde{Y} = Absorbancia promedio, Abs

\bar{x} = Concentración promedio, mg/l

Intercepto:

$$a = \frac{\sum_{i=1}^N Y_i - b \sum_{i=1}^N X_i}{N} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

N= Número de los puntos de la recta

Coefficiente de determinación (r^2):

$$r^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{x})(X_i - \tilde{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{x})^2 \sum (Y_i - \tilde{Y})^2}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Error tipo de la estimación de y:

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \tilde{Y})^2}{N-2}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Error tipo de estimación X (S_{xy}):

$$S_{xy} = \frac{S_{yx}}{b} \quad \text{Ecuación 7}$$

Desviación estándar de la pendiente (S_b):

$$S_b = \frac{S_{yx}}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Desviación estándar del intercepto (S_a):

$$S_a = S_{yx} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n X_i^2}{\sum (X_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 9}$$

Intervalo de confianza para pendiente (intercepto inferior y superior):

$$b_{\text{inferior}} = b - t * S_b \quad \text{Ecuación 10}$$

$$b_{\text{superior}} = b + t * S_b \quad \text{Ecuación 11}$$

Intervalo de confianza para intercepto (aMin y Max)

$$a_{\text{inferior}} = a - t * S_a \quad \text{Ecuación 12}$$

$$a_{\text{superior}} = a + t * S_a \quad \text{Ecuación 13}$$

t = t de student, calculada con 95,45%

- 7) **Sensibilidad analítica:** Es la variación en la respuesta del equipo, que corresponde a una variación de la magnitud medida (por ejemplo la concentración de analito), es del gradiente de la curva de respuesta (pendiente). (Torres, 2018). En sí, es la diferencia más pequeña en la respuesta del método que puede detectarse, se calcula a partir de la pendiente de la curva de calibración. (Remache, 2013)
- 8) **Exactitud:** Expresa el grado de concordancia y proximidad entre el conjunto de resultados de una medición y el valor verdadero del mesurando o un valor de referencia aceptado. (Torres, 2018). La exactitud es un parámetro cualitativo para describir el error asociado a un resultado. (ISO, 1993). La validación de métodos trata de investigar la exactitud de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios sobre resultados individuales, la exactitud se estudia como dos componentes: veracidad y precisión. (Eurachem, 2016).
- 9) **Veracidad:** La veracidad expresa la proximidad entre el promedio de una serie (larga) de resultados de ensayos obtenidos y un valor de referencia aceptado. (Metrosens, 2019). Generalmente la medida de la veracidad se expresa en términos de sesgo o error, definido como la diferencia entre el resultado de medida y el valor real. (CYTED, 2009)

Sesgo. Es la diferencia entre el resultado individual medido de una magnitud y el valor esperado de los resultados de medición o un valor de referencia aceptado. Es decir; es el error sistemático total en contraste con el error aleatorio. (ISO, 1993). El sesgo caracteriza al error sistemático en un procedimiento analítico dado y es la desviación (positiva o negativa) de la media de los resultados analíticos con respecto al valor verdadero (conocido o aceptado). (CENAM, 2005). El valor de un error conocido puede aplicarse como la corrección al resultado. (Eurachem, 2012)

Recuperabilidad. Es la fracción de analito que se agrega a la muestra antes del análisis y tiene por objetivo determinar la eficiencia del método para obtener el analito agregado en la concentración más cercana a la real. (EURACHEM, 2014)

$$\% \text{ Recuperabilidad} = \frac{\text{Valor obtenido} \times 100}{\text{Valor teórico}} \quad \text{Ecuación 14}$$

10) Precisión: Al realizar una medida se deben obtener replicados, a partir de los cuales se puede observar el grado de concordancia que estos resultados tienen entre sí. Es el grado de proximidad entre los valores obtenidos entre mediciones de un mismo mensurando bajo condiciones específicas. (Torres, 2018). La precisión se divide en repetibilidad y reproducibilidad, que representan los dos extremos de la precisión que se pueden obtener. (CYTED, 2009)

El conjunto de mediciones representa una medición, ejemplos de precisión y exactitud ver en figura 8-2, donde: A) alta precisión, baja exactitud, B) baja precisión y baja exactitud, C) alta exactitud, pero baja precisión y D) alta exactitud y precisión. (Remache, 2013).

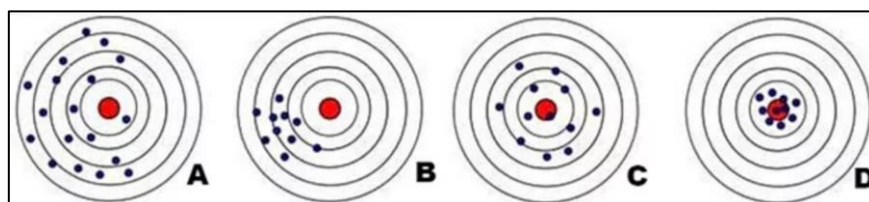


Figura 8-2: Esquema de precisión y exactitud

Realizado por: (Remache, 2013)

Repetitividad. Condición de medición de un método desarrollado bajo las mismas condiciones de procedimiento, mismos operadores, método, sistema de medida, lugar y utilización de los mismos equipos de medida durante un periodo corto de tiempo, es decir; es la clase de variabilidad que se espera entre resultados cuando una muestra se analiza por duplicado. (CYTED, 2009)

Reproducibilidad. Es la medida de la desviación estándar obtenida cuando se realizan ensayos variando una o más condiciones tales como el equipo, analistas y condiciones de operación. Demuestra la variación que existe cuando se desarrolla el mismo método en diferentes condiciones mediante estudio interlaboratorio. (EURACHEM, 2014). Se puede realizar el cálculo, a través del análisis simple de varianza para cada uno de los niveles de ensayo. (Remache, 2013)

El T calculado < T teórico

$$T \text{ calculado} = \frac{(X_1 - X_2) - 0}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)V_1 + (n_2 - 1)V_2}{(n_1 + n_2) - 2} \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]}} \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde:

X1 y X2= Son medidas de la muestra 1 y 2.

n1 y n2= Es el tamaño de las muestras 1 y 2.

V1 y V2= Son las varianzas insesgadas de las muestras 1 y 2.

T se distribuye con la T de Student con n1 y n2 -2 grados de libertad

A través del análisis simple de varianza para cada uno de los niveles de ensayo, se puede calcular la precisión. Ver tabla 11-2 para el análisis de varianza.

Tabla 11-0: Ecuaciones para el Análisis de la Varianza

| Origen de la varianza | Grados de libertad (v) | Suma de diferencias Cuadráticas | Diferencias cuadráticas medidas (Varianzas) |
|-----------------------------|------------------------------------|---|---|
| Entre grupos (Between) | Vb= K-1 Vb= 2-1 Vb=1 | $SCDb = \sum_{i=1}^2 (P (\bar{X}_{PA1} - \bar{X}_N)^2 + (P(\bar{X}_{PA2} - \bar{X}_N)^2$ | $DCMb = \frac{SCDb}{Vb}$ |
| Dentro del grupo (Whitthin) | Vw= K (P-1) Vw= 2 (5-1) Vw=8 | $SCDw = \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 (P (X_{i A1 A2} - \bar{X}_{PA1})^2 + (P(\bar{X}_{1 A2} - \bar{X}_{P A2})^2)$ | $DCMw = \frac{SCDw}{Vw}$ |

Fuente: (Remache, 2013)

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2019

Desviación estándar de repetibilidad (S_r):

$$S_r = \sqrt{DCMw} \quad \text{Ecuación 16}$$

Desviación estándar de reproducibilidad (S_R):

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + SL^2} \quad \text{Ecuación 17}$$

Precision intermedia “SL”:

$$SL^2 = \frac{DCMb - DCMw}{k} \quad \text{Ecuación 18}$$

Siendo el denominador “k” igual al número de observaciones que se realizan cada día en cada nivel.

Coefficiente de variación de repetibilidad “CVR”:

$$CVR \% = \frac{S_r}{X_N} \times 100 \quad \text{Ecuación 19}$$

Coefficiente de variación de reproducibilidad “CVR”:

$$CVR \% = \frac{S_R}{X_N} \times 100 \quad \text{Ecuación 20}$$

Donde:

X_N = Es la media de las medias de cada nivel

- 11) **Robustez:** Es la inercia que presenta un método analítico a modificar su señal ante pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y condiciones operativas. Indica la confiabilidad del método durante su desarrollo. (Metrosens, 2019). Para el estudio de robustez, los parámetros y condiciones se modifican ligeramente, siguiendo un determinado diseño experimental, y se comprueba su influencia en la señal analítica. (Eurachem, 2016)

2.2.7.8. *Incertidumbre*

La incertidumbre de una medición es un parámetro no negativo asociado con el resultado de medida, que caracteriza la dispersión de los valores que pudieran ser razonablemente atribuidos al mensurando. El parámetro puede ser una desviación estándar que se denomina incertidumbre estándar de medida. (Eurachem, 2012).

Es el rango en el cual se espera que se encuentre el valor verdadero del resultado de un ensayo, asociado a una probabilidad dada. (Metrosens, 2019). La incertidumbre aporta confianza en la validez de los resultados medidos.

Tipos de incertidumbre: Cada fuente de incertidumbre debe ser tratada de forma separada para obtener la contribución de esa fuente. Al estimar la incertidumbre global cada una de las contribuciones separadas es un componente de la incertidumbre. (Eurachem, 2012)

Incertidumbre estándar $u(x_i)$: Es la incertidumbre del resultado de medida x_i (asociada a cada variable) y se expresa como desviación estándar, considerando todas las contribuciones asociadas se debe:

- a) Detallar las fuentes de incertidumbre que afectan a cada x_i .
- b) Determinar las fuentes o componentes de incertidumbre.

Las fuentes se pueden agrupar en función del método utilizado para estimar su valor numérico:

TIPO A: Contribución mediante el estudio estadístico de los valores que proceden de una serie de mediciones y pueden caracterizarse por desviación estándar máxima de la repetibilidad y reproducibilidad. (Eurachem, 2012)

TIPO B: Aportación de la incertidumbre y resolución de equipos calibrados, materiales de referencia y material de vidrio certificado.

Incertidumbre estándar combinada $u_c(y)$: Es la incertidumbre total para un resultado de medida. Es una desviación estándar estimada igual a la raíz cuadrada positiva de la varianza total obtenida de las contribuciones tipo A y de tipo B. (Eurachem, 2012)

$$U_{\text{acumulada}} = \sqrt{\text{Contribuciones del tipo A} + \text{Contribuciones del tipo B}} \quad \text{Ecuación 21}$$

Incertidumbre expandida U: Magnitud que proporciona un intervalo sobre el resultado de una medición, el que se espera cubra una fracción grande de la distribución de los valores que podrían atribuirse al mesurando con un mayor nivel de confianza. (Eurachem, 2016).

$$U = u_c * k \quad \text{Ecuación 22}$$

Para aumentar la confiabilidad de la incertidumbre combinada se multiplica por un factor de cobertura ($K= 2$). La incertidumbre resultante se reporta en un informe de ensayo o calibración. (Eurachem, 2016).

Factor de cobertura k: Factor numérico que se considera como el nivel de confianza del intervalo de trabajo. Para un nivel aproximado de confianza del 95%, k es igual a 2. (Eurachem, 2012)

2.2.7.9. Contribuciones de la incertidumbre

Certificado de Calibración: Se usa el valor del error como la incertidumbre expandida U del certificado de calibración del equipo o de la solución patrón, y para cada uno de los puntos del campo de medida donde se ha realizado la calibración. (Remache, 2013). La incertidumbre por la calibración de un equipo se calcula:

$$U(V_{\text{cal}}) = \frac{U(\text{cal})}{K} \quad \text{Ecuación 23}$$

Donde:

$U(cal)$ = Información del certificado de calibración.

K = Factor de Cobertura

Temperatura: Incertidumbre debida a la diferencia entre la temperatura de calibración y la temperatura de práctica. Su contribución a la incertidumbre se considerará como un límite máximo, y por lo tanto se divide para $\sqrt{3}$. (Eurachem, 2016)

$$u(\text{temperatura}) = \frac{(\text{Diferencia } T(T-T_{20})) * V_f * \alpha}{\sqrt{3}} \quad \text{Ecuación 24}$$

Donde:

V_f = Volumen del material volumétrico.

Diferencia de Temperatura $\alpha(20^\circ\text{C}) = 10$ Rango de Temperatura 20 – 30°C

$\alpha = 0,00025$ Coeficiente de expansión vidrio boro sílice.

Resolución: La resolución se asigna una distribución rectangular, en equipos digitales se considera como resolución el dígito menos significativo que pueda ser claramente leído por el operador. (Remache, 2013). En equipos analógicos la contribución a la incertidumbre, se calcula de acuerdo a la ecuación:

$$u(\text{resolución}) = \frac{\text{Resolución de equipo digital}}{\sqrt{12}} \quad \text{Ecuación 25}$$

2.2.7.10. Formas de expresar la incertidumbre

Incertidumbre absoluta: Es el valor absoluto de la diferencia entre el valor real y el valor medido. La incertidumbre absoluta tiene las mismas unidades que la variable a la que está asociada y depende de la magnitud de la resolución del instrumento utilizado. (Remache, 2013)

Incertidumbre relativa: Incertidumbre adimensional que está en función de la magnitud de la variable medida, representa que proporción del valor reportado es dudosa. En tanto mayor sea el valor central menor será la incertidumbre relativa (para incertidumbres absolutas iguales). (Eurachem, 2016)

Incertidumbre porcentual: Representa que proporción del valor reportado es dudoso, en unidades de por ciento. También son adimensionales y dependen de la magnitud de la variable medida. Mientras menor sea el valor central mayor será el error porcentual cometido. (Remache, 2013)

2.2.7.11. Distribución de probabilidad

Para la cuantificación de una fuente de incertidumbre, se debe asignar un valor y distribución probabilística que represente su comportamiento o que se encuentra este valor. Las distribuciones son:

Distribución normal: Los resultados de la repetibilidad de las mediciones afectada por una o más magnitudes de influencia que varían aleatoriamente y están en una aproximación a la distribución normal.(Wolfgang, 2019). Una curva normal es asintótica en la base, es decir, “sus colas” tocan el cero hasta el infinito ver gráfico 1-2. (Eurachem, 2016).

$$u(x_i) = \frac{u}{k} \quad \text{Ecuación 26}$$

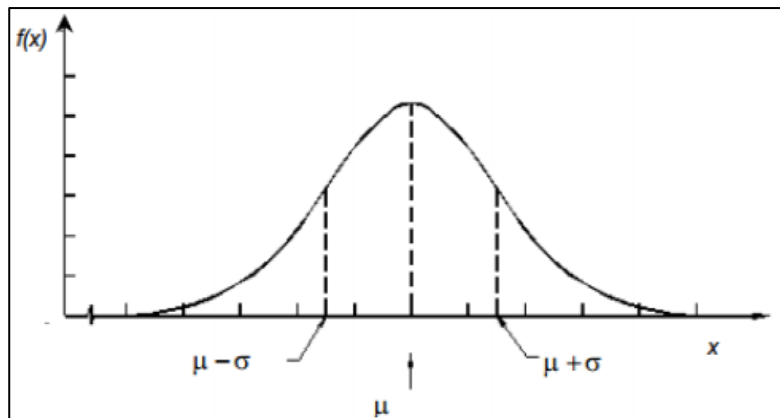


Gráfico 1-2: Distribución normal.

Realizado por: (Remache, 2013)

Distribución rectangular: En esta distribución cada valor en un intervalo dado tiene la misma probabilidad, es decir, la función de densidad de probabilidad es constante en este intervalo ver gráfico 2-2. (Remache, 2013)

$$u(x_i) = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad \text{Ecuación 27}$$

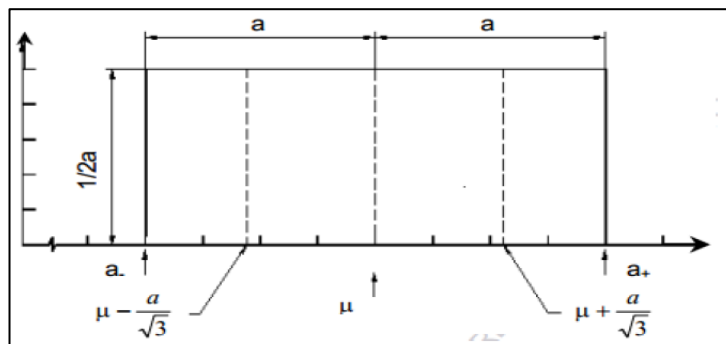


Gráfico 2-2: Distribución rectangular

Realizado por: (Remache, 2013)

Distribución triangular: Para la estimación de la incertidumbre en una distribución triangular se debe conocer los límites superior e inferior y la evidencia de que la probabilidad es más alta para valores en el centro del intervalo y se reduce hacia los límites ver gráfico 3-2.

$$u(x_i) = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad \text{Ecuación 28}$$

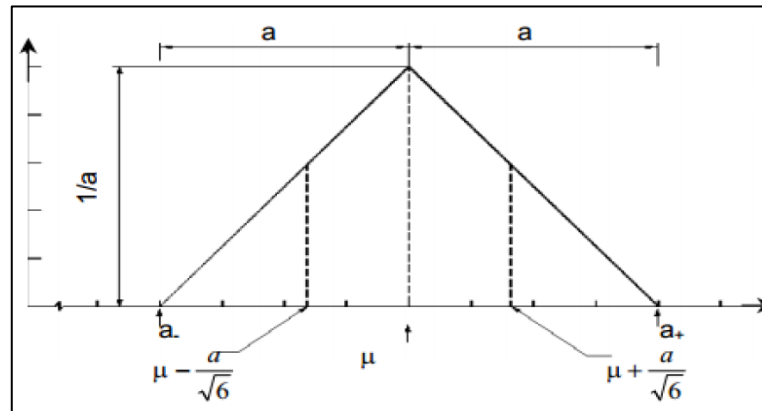


Gráfico 3-2: Distribución rectangular.

Realizado por: (Remache, 2013)

2.2.7.12. Criterios generales para la validación de un método

El primer paso para realizar una validación, es la elección de los parámetros de validación y planteamiento de los objetivos de validación, seguido del diseño experimental y estadístico.

Selección de parámetros de validación

Para probar que un método de ensayo validado es adecuado y apto para su aplicación se debe determinar mediante estudios de laboratorio sus características de funcionamiento o parámetros que definen la validación para cada tipo de ensayo. Los parámetros de validación de métodos de ensayo (ver tabla 12-2) son:

Tabla 12-0: Parámetros a considerarse en una validación de métodos analíticos.

| Parámetros | Objetivo Establecido |
|---|--|
| Selectividad / Especificidad | Definido por bibliografía normativa Nacional o internacional. |
| Linealidad/Función respuesta | Elaborar curva de calibración, y regresión lineal del grado de ajuste con un $R^2 \geq 0,995$. |
| Límite de detección | Determinado por la concentración más baja del Límite de cuantificación o 3s del blanco, establecido por métodos bibliográficos. |
| Límite de cuantificación | Determinado por la concentración más baja determinada experimentalmente o 10s del blanco. |
| Precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad) | El porcentaje de la desviación estándar en todos los niveles de concentración deberá ser $< 10\%$. CV * % en todos los niveles en estudio. F calculado \leq F Tabulado t student calculado \leq t student Tabulado (veracidad) |
| Exactitud | Recuperación de selenio de al menos del 80 al 115% en todos los niveles. |
| Incertidumbre | La incertidumbre en todo el rango deberá ser $U < 30\%$ en todos los niveles con intervalo de confianza de al menos el 95 % (K=2). |
| Intervalo de trabajo | Definido por el tratamiento estadístico, y por los niveles de las muestras y estándares utilizados. |

Fuente: Laboratorio AqLab. 2013. Criterios del SAE (Aqlab, 2013)

Realizado por: Stephanie Pintado, 2019

Diseño experimental y estadístico

Para realizar el diseño experimental y estadístico es necesario determinar los parámetros de validación que se hayan escogido, estos no se obtendrán de forma secuencial, sino que se obtendrán como resultado final de un diseño experimental adecuado. En la tabla 13-2. se observa a modo general el diseño experimental y sus criterios elementales para la determinación de los parámetros de validación. (Aqlab, 2013)

Tabla 13-0: Parámetros que se consideran en el diseño experimental de métodos analíticos

| Parámetros | Objetivos |
|---|---|
| Límite de detección | 10 blancos en condiciones de Repetibilidad y reproducibilidad |
| Límite de cuantificación | Nivel más bajo determinado experimentalmente |
| Linealidad | En métodos instrumentales se procederá a realizar 5 curvas de calibración en condiciones de reproducibilidad Las curvas se aceptan si $r \geq 0.995$ |
| Repetibilidad y Reproducibilidad | Muestras mínimo cuatro niveles de concentración, determinadas bibliográficamente o según experiencia técnica: bajo, Medio y Alto (10 repeticiones por muestra (estándar ó MRC ó matriz) en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad) Nota: Es recomendable que las muestras seleccionadas deben usarse durante toda la validación, las mismas que deben ser rotuladas con sus datos como fechas de recolección. |
| Exactitud | Determinación de la exactitud de materiales de referencia. Por participación en interlaboratorios o Proficiency Testing |
| Tratamiento estadístico | CV ANOVA CRITERIO F T STUDENT % RECUPERABILIDAD |
| Incertidumbre | Estimación de la incertidumbre |

Fuente: Laboratorio AqLab. 2013. Criterios del SAE (Aqlab, 2013)

Realizado por: Stephanie Pintado, 2019

CAPITULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de Investigación

El tipo de investigación es teórica –técnico. La parte teórica se realizó por medio de investigación bibliográfica de métodos oficiales validados, publicaciones, guías y procedimientos de validación. La parte técnica se realizó en el área instrumental II del Laboratorio de Análisis y Evaluación Ambiental “Aqlab” con los equipos, materiales y reactivos necesarios. Aqlab está ubicado en la Provincia de Orellana, Ciudad Puerto Francisco de Orellana, coordenadas: 18M 0279263 9948509 UTM.

El procedimiento de la validación del método selenio, se basó en la guía de laboratorio para la Validación de Métodos PG-AQLAB-07. (Aqlab, 2019). En la parte experimental se realizó 5 curvas de calibración para el Selenio, se determinó la concentración de Selenio considerando matrices reales, estándares y fortificación de muestras. Se realizó el registro de los resultados de grupos de ensayo, los datos obtenidos fueron sometidos a estadística y se determinaron los parámetros de validación del método.

3.1.1. Población de estudio y unidad de análisis

La recolección de las muestras de agua se realizó de fuentes principales de agua natural, de la red de distribución de agua potable del sector y de la planta de aguas residuales de la ciudad de Orellana. (APHA-AWWA-WPCF, 1992). La unidad de análisis es el selenio en matriz aguas.

3.2. Metodología

3.2.1. Técnicas e instrumentos analíticos

Método: Se escogió el método continuo de Generador de hidruros por Espectrometría de Absorción Atómica. Se tomó como referencia los métodos descritos en el Estándar Métodos 3030B, 3114 B 4 c y d, 3114 C. Se realizó el instructivo técnico de ensayo ITE-AQLAB-46 para determinar selenio en matriz agua, donde se detalla el procedimiento de preparación de estándares de calibración, preparación de reactivos, soluciones y el tratamiento que se realizó a cada una de las diferentes muestras de agua. (ver anexo E).

3.2.2. *Recolección, preservación y almacenamiento de muestras*

Recolección: Debe tomarse un mínimo de 500 ml de muestra para metales, en un envase de polietileno. (Variani, 2001)

Conservación de muestra: Las muestras deben colectarse en frascos de plástico limpios con ácido nítrico. (Vergara, 2019). Las muestras con turbiedad alta deben ser filtradas por papel de filtro o membrana de 0,45 μm antes de analizarse, con el fin de eliminar la materia suspendida.

Almacenamiento: Todas las muestras deben refrigerarse a 4°C, previa filtración (si necesaria) y acidificación con HNO_3 a $\text{pH} < 2$. (Vergara, 2019). El tiempo máximo previo al análisis es de 6 meses. (Variani, 2001).

3.2.3. *Limpieza de materiales*

El material volumétrico utilizado es de clase A con certificación y/o calibración y para el método selenio el material debe ser de uso exclusivo para el procedimiento. Para la limpieza se realizó lo siguiente:

- Para el lavado del material remojar durante 1 h en una disolución de ácido nítrico al 10 % y enjuagar con agua.
- Los recipientes de las muestras deben lavarse con disolución de detergente no iónico, libre de metales, enjuagarse con agua, remojar en ácido toda la noche y volver a enjuagarse con agua libre de metales y dejar secar.
- En los casos de que se presenten adherencias en el material debe dejarse remojando de 12 h a 24 h con HNO_3 (1:5), HCl (1:5) o con agua regia (3 partes de HCl concentrado + 1 parte de HNO_3 concentrado) a 70°C, después debe ser enjuagado con agua libre de metales. (Variani, 2001)
- En los casos de que el material presente grasas, enjuagar con acetona y/o hexano.
- Para puntas de pipetas de plástico, sumergir en HNO_3 o HCl 2N, durante varios días y enjuagar con agua desionizada.
- Para célula de Cuarzo, TFE o material de vidrio, utilícese HNO_3 1+1, HCl 1+1 o agua regia, para la inmersión.
- Para el plástico, usar HNO_3 1+1 o HCl 1+1. Las condiciones adecuadas para la inmersión son 24 h y 70°C.

3.2.4. Condiciones ambientales

Las condiciones óptimas de operación general recomendadas para un laboratorio son: Temperatura menor a 35°C y con una humedad relativa menor a 80%. El área de trabajo donde se encuentra instalado el equipo de EAA, debe mantenerse a condiciones óptimas de operación para el uso del espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer 300 que son: a temperatura de 21°C y a una humedad relativa de 40 %, esto más bien con el fin de preservar la vida útil del equipo.

3.3. Diseño experimental

3.3.1. Detección de la necesidad analítica

El laboratorio Aqlab en búsqueda de satisfacer la demanda de servicios de análisis de laboratorio en matriz agua, se ha visto en la necesidad de validar el método selenio en aguas naturales, de consumo y residuales por espectrometría de absorción atómica con generador de hidruros para ampliar su capacidad de servicio y cumplir con las Normativas del TULAS, INEN, RAOHE. (Tablas descritas en el apartado 2.2.3)

3.3.2. Puesto a punto

Actividad previa a la validación, en esta fase se consigue el funcionamiento del método, optimizar el rendimiento de los instrumentos y obtener información referente a los diversos parámetros de validación. Para realizar la validación se tomó en cuenta la preparación de soluciones estándar, reactivos, muestras y digestión de las muestras de aguas aplicando el procedimiento ITE-AQLAB-46 (ver anexo E). Y instructivos de uso del equipo de absorción atómica ITU-AQLAB-04 y del generador de hidruros ITU-AQLAB-46

3.3.3. Fijación de objetivos y parámetros de validación

Antes de empezar una validación, se debe demostrar que el método de ensayo ITE-AQLAB-46 es adecuado para la aplicación que se pretende dar, y se estableció los objetivos y parámetros de rendimiento (ver tabla 1-3), los mismos que se debe cumplir cuando se declare el método validado. Se estableció los siguientes rangos:

Rango de calibración: 0.005 mg/l – 0.01 mg/l

Rango de validación: 0.01 mg/l– 0.5 mg/l

Tabla 1-3: Parámetros de validación y fijación de objetivos para analíticos metálicos.

| Parámetros | Objetivo Establecido |
|---|--|
| Selectividad / Especificidad | Longitud de onda 196,0 nm, longitud de onda característica Conocimiento de las interferencias del método de AAS (espectrales e instrumentales). Ver ITE-AQLAB-04 y ITE-AQLAB-46, y las interferencias del método de determinación de metales por AAS SM APHA 3110. |
| Linealidad/Función respuesta | Elaborar curvas de calibración, donde la regresión lineal es el grado de ajuste con un $R^2 \geq 0.995$. |
| Límite de detección | Se: $\leq 0,005$ mg/L en agua |
| Límite de cuantificación | Se: $\leq 0,010$ mg/L en agua |
| Precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad) | El porcentaje de la desviación estándar en todos los niveles de concentración deberá ser $< 10\%$. |
| Exactitud | Recuperación de Se entre $80\% \leq$ al $\leq 115\%$ en todos los niveles. |
| Incertidumbre | Se: La incertidumbre en todo el rango deberá ser $U < 30\%$ en todos los niveles con intervalo de confianza de al menos el 95% ($K=2$). |
| Intervalo de trabajo | Se $0,01 - 0,5$ mg/l. |

Fuente: Laboratorio AqLab. 2013. Criterios del SAE.

Realizado por: Stephanie Pintado, 2020

3.3.4. Determinación del diseño experimental y estadístico de validación

Se estableció un diseño experimental para determinar la cantidad de datos que se va a tomar por cada nivel de concentración y el tratamiento estadístico que se debe dar a estos datos, ver tabla 2-3.

Tabla 2-3: Diseño experimental y estadístico para la validación del selenio.

| Parámetro | Objetivo |
|---|--|
| DISEÑO EXPERIMENTAL Lecturas para: Curvas de calibración Blanco Estándar Muestras | Se tomaron datos primarios de: <ul style="list-style-type: none"> • Diez lecturas de Blanco solución de HNO_3 al 0,5 N y/o HCL 10% (v/v) • Diez lecturas de muestras con efecto matriz aguas (consumo, naturales, residuales y lixiviados) • Diez lecturas de patrones entre matrices que se encuentren dentro de los niveles de concentración establecido dentro del intervalo de trabajo. • Cinco curvas de calibración (concentraciones mayores leer con dilución). Los datos se tomaron en dos días distintos en condiciones de reproducibilidad, con el diseño anterior. Los patrones y blancos se prepararon cada día para recoger la variabilidad que proviene de dicha preparación. Determinación de la exactitud (recuperación) de materiales de referencia, por Interlaboratorios o ensayo de aptitud. |

| | |
|-------------------------|--|
| Blanco Patrones | Blanco solución de HNO ₃ al 0,5 N y/o HCL 10% (v/v) Diez Lecturas de Patrones de trabajo a 6 niveles de concentración Se: 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05 mg/l. Preparadas cada día en condiciones de repetibilidad |
| Muestras | 10 lecturas de muestras con efecto matriz agua de consumo, aguas naturales, aguas residuales y lixiviados. Se: 2 x 5 = 10 blancos. 2 x 50 = 100 Std. 2 x 40 = 80 Muestras Validar la Matriz de lixiviado (TCLP), para el selenio en lo posible. |
| Procesamiento | Las muestras de agua se leen el mismo día por la inestabilidad de los metales A las muestras de agua se acidifican considerando la siguiente relación 1;1 muestra: ácido HCL (v/v), para determinar el contenido de metal total y proceder a medir en el equipo EFQ061. |
| Función de respuesta | De cada día, las lecturas obtenidas, se obtendrá por regresión lineal. Se realizarán mínimo cinco curvas de calibración validas, para estimar la linealidad y función respuesta del equipo. Determinación cada día del grado de ajuste y de los intervalos de confianza de los coeficientes de regresión y de la función de respuesta. Determinación de la exactitud en cada nivel mediante porcentaje de recuperación (deben ser similares en los patrones y en los materiales de referencia) |
| Tratamiento estadístico | Se realizó el análisis de varianza simple de los resultados obtenidos para obtención de la precisión por niveles. Obtención de: Límites de detección Límites de cuantificación Intervalo de trabajo validado Obtención de la incertidumbre asociada a cada nivel. |

Fuente: Laboratorio AqLab. 2013. Criterios del SAE.

Realizado por: Stephanie Pintado, 2020

3.3.5. *Elaboración de curva de calibración*

Se realizó cinco curvas de calibración a partir de una solución madre de concentración de 1000 mg/l; se tomó 0,5 ml a un balón de aforo de 100 ml obteniéndose una concentración de 5 mg/l, los estándares se prepararon con una solución de HCL 10% (v/v) de 3 M. Del estándar intermedio de 5 mg/l se preparó los estándares descritos en la tabla 3-3. Se realizó las curvas de calibración del selenio para aguas naturales, de consumo y residuales.

Tabla 3-3: Estándares para la realización de las curvas de calibración

| Elemento | STD 1 (mg/l) | STD 2 (mg/l) | STD 3 (mg/l) | STD 4 (mg/l) | STD 5 (mg/l) |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Selenio | 0,005 | 0,010 | 0,020 | 0,030 | 0,050 |

Fuente: Laboratorio AqLab. 2013. Criterios del SAE.

Realizado por: Stephanie Pintado, 2020

Para hacer la curva de calibración, se debe leer primero los estándares de baja concentración hasta la concentración estándar más alta. Para que se forme una curva de calibración es necesario los datos de concentración vs. absorbancia. Con los datos de las curvas de calibración se determinó la función respuesta/linealidad.

3.3.6. Operaciones de análisis

Una vez ajustado el equipo de espectrometría de absorción atómica (ITU-AQLAB-04), se realizó las cinco curvas de calibración y se determinó la concentración de muestras y estándares.

Para determinar el selenio libre (disuelto) en agua a la muestra se debe acidificar con HCL; mientras que, para determinar selenio total a la muestra se debe acidificar (pre-reducción con HCL 1:1) y digerir por 20 minutos a 90 °C. Después de la acidificación, la solución puede diluirse sin el riesgo de "oxidación inversa" de Se^{4+} a Se^{6+} .

Se determinó las concentraciones de las muestras (matriz, estándar, o muestra fortificada), primero se realizó la curva de calibración y en ésta debe leerse las muestras, así es como se tomó los diez datos para cada nivel de concentración descritos en la tabla 1-4.

3.3.7. Tratamiento estadístico de los datos obtenidos

Se realizó el tratamiento estadístico siguiendo los lineamientos del Procedimiento General PG-AQLAB-07/Validación de métodos, establecido por el Laboratorio "Aqlab" en su Sistema de Gestión de Calidad.

Para materializar la validación se diseñó hojas de cálculo en Excel en donde se determinó; la función respuesta del método, análisis de repetibilidad (% SDR), análisis de reproducibilidad (t student, % Recuperación), Análisis de Varianza (T Fisher) y incertidumbre y finalmente se declaró validado el método. Estos cálculos se realizaron con los datos primarios de la tabla 1-4 y en éstas describen las lecturas de matrices, estándares, blancos para el analito.

3.4. Optimización de Generador de Hidruros

Se optimizó las condiciones experimentales que influyen en la generación del hidruro de selenio y el funcionamiento del generador de hidruro. Se tomó en cuenta lo establecido en el apartado 2.2.6 para optimizar el funcionamiento del GH, el ITU-AQLAB-46 para el uso del GH y ITU-AQLAB-04 para el uso del equipo de EAA. Se concluyó la optimización del GH y las condiciones experimentales encontradas se muestra en la tabla 4-3.

Tabla 4-3: Condiciones experimentales óptimas obtenidas

| Parámetros para selenio (IV) | | Condiciones experimentales FIAS | Optimización de parámetros |
|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| Reactivos | Parámetro | | |
| Se (IV) | Longitud de onda | 196.0 nm | 196.0 nm |
| Agente portador HCL | Concentración (v/v) | 10 % | 270 ml de HCL |
| | Volumen mL | 100 | 1000 |
| | Flujo ml/min | 9-11 | 9 |
| Agente Reductor NaBH ₄ | Concentración (p/v) | 0,2 % NaBH ₄ y 0,05 % NaOH | 2 g NaBH ₄ y 0,5 g NaOH |
| | Volumen mL | 100 | 1000 |
| | Flujo ml/min | 4-7 | 4 |
| Argón | Caudal de gas portador ml/min | 50 -100 | 120 |
| | Presión de salida | 3.6 bar, 58 psig | 3.6 bar, 58 psig |
| HCL 3M (Patrones y muestras) | Concentración | 10 % (v/v) | 10 % (v/v) |
| | Flujo ml/min | 1-3 | 1 |
| EAA | Gas combustible: Acetileno | Flujo ml/min | 5-10 |
| | Gas oxidante: Aire puro | Flujo ml/min | 2-5 |

Fuente: (APHA, 2012) (Elmer, 2018)

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020

3.5. Cálculos

Para el cálculo y el análisis de los parámetros que se establecieron para la validación se utilizó como referencia la Guía Eurachem, procedimientos internos PG-AQLAB-06 Validación de Métodos y PG-AQLAB-07 Cálculo de la Incertidumbre.

Para el análisis se recurrió a la bibliografía de los Métodos Estándar APHA, mientras que para el uso de los equipos se revisa el manual de uso del fabricante, así como el Instructivo Técnico de uso interno del laboratorio ITU-AQLAB-46 del GH y el ITU-AQLAB-04 del EAA.

Para optimizar el método de análisis se procedió a aspirar la solución de chequeo del selenio y se ajustó el sistema del quemador mientras se controla la absorbancia en la pantalla. Para el selenio se obtuvo los siguientes valores de absorbancia (en tabla 5-3) al momento de optimizar el equipo con la solución de chequeo:

Tabla 5-3: Condiciones para el control de la sensibilidad del equipo.

| Item | Metal | Control de Sensibilidad (mg/l) | Concentración Característica (mg/l) comparación | ABS (Equipo) | Concentración Característica (mg/l) Medida | % Recuperación |
|----------------------|----------------------------|--------------------------------|---|----------------------|--|----------------|
| 1 | SELENIO, Se, 196,0nm | 30,0 | 0,59 | 0,976 | 0,59 | 100,0 |
| | | | 0,59 | 0,991 | 0,531 | 90,00 |
| | | | 0,59 | 0,946 | 0,649 | 110,0 |
| ABS OPTIMA CC | | ABS MINIMA CC | | ABS MAXIMA CC | | |

Fuente: Datos de validación para selenio

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2019

3.5.1. Tratamiento estadístico

Selectividad para determinar el analito: Este método se diseñó para determinar la concentración de selenio en matriz agua por el método generador de hidruros por espectrometría de absorción atómica, proporcionando una gran exactitud. No se consideró la existencia de interferencias espectrales debido al uso de una lámpara con un solo elemento (lámpara de selenio). La lectura obtenida del equipo de absorción atómica indica directamente en mg/l sin ser necesaria ninguna transformación para el caso de la matriz agua.

Preparación de la muestra fortificada: Para evaluar la recuperación de selenio se procedió a realizar por el método de adición de estándares a muestras de matrices puras, en determinados niveles de concentración para la validación, se realizó la fortificación de la muestra de la siguiente manera. Por ejemplo:

1. Se determinó la concentración de la matriz pura, en este caso Agua de río = 0,03 mg/l de Selenio
2. Se preparó un estándar de concentración X, en este ejemplo es: 3,0 mg/l a partir de un estándar de 5 mg/l de Selenio.

3. Se añadió 15 ml del estándar de 3,0 mg/l a la matriz real considerando un volumen de 50 ml de aforo final.
4. Se determinó la concentración final de la muestra fortificada.

$$[\text{muestra fortificada}] = [\text{matriz}] + [\text{estándar}] \quad \text{Ecuación 29}$$

$$[\text{muestra fortificada}] = 0,03 \text{ mg/L} + 3,0 \text{ mg/L}$$

$$[\text{muestra fortificada}] = 3,03 \text{ mg/L}$$

Donde:

[muestra fortificada]= Concentración final de la muestra fortificada, mg/L

[matriz]= Concentración de matriz, mg/L

[estándar]= Concentración del estándar, mg/L

3.5.2. *Análisis de repetibilidad (r) de los datos primarios*

En el análisis de repetibilidad el % SDR debe ser <10% por cada nivel de concentración, cuando esta condición se cumple se aceptan los datos de validación. Se estableció el límite de detección y límite de cuantificación.

LC = Es el valor asignado donde el equipo empieza a dar señal de lectura del analito 0,01 mg/l.

LD = Es el valor bajo el límite de cuantificación 0,005 mg/l.

3.5.3. *Análisis de reproducibilidad (R) de los datos primarios*

En el análisis de R, se tomaron los datos obtenidos del analista 1 y analista 2 en conjunto y se realizó el análisis estadístico T-student por cada nivel de concentración, cuando el T calculado < T teórico se aceptan los datos de validación.

Cálculo de los límites de control del estándar de trabajo en la determinación de Se: Se determinaron los límites de control para el estándar de trabajo de Selenio, es decir que durante el análisis éste servirá para el control de calidad interno del método, para esto se considera los datos del Analista 1 y 2 y se establece el Porcentaje de Variación en un intervalo de confianza K=2 (2 s).

3.5.4. *Análisis de varianza ANOVA*

Determinación del análisis de varianza: En el análisis de varianza de método Se en aguas, se

establecen las siguientes variables fijas para todos los niveles de concentración y analistas.

Donde:

| | |
|------------------------------|--|
| P: Repeticiones por cada día | P= 5 repeticiones por día. |
| K: Número de analistas | K= 2 analistas |
| Vb: Grados de libertad | Vb= K-1= 2-1=1 b: entre grupos de datos (2 analistas) |
| Vw: Grados de libertad | Vw= K(P-1)= 2(5-1)= 8 w: dentro del grupo (entre datos) |

Considerando las variables descritas, el análisis de varianza se realizó con las siguientes formulas descritas en la tabla 11-2.

Una vez obtenidos los datos del análisis de varianza (a – j), se analiza que la S_r sea $< SR$ y que el F calculado $< F$ teórico en el análisis estadístico T Fisher.

- a) La media de las medias.
- b) La sumatoria de diferencias entre grupos “SDCb”.
- c) El valor medio de las sumas de las diferencias al cuadrado entre grupos DCMb.
- d) La sumatoria de diferencia dentro de grupos SCDw.
- e) El valor medio de las sumas de las diferencias al cuadrado dentro de grupos “DCMw”
- f) La desviación estándar por repetibilidad “Sr”
- g) La precisión intermedia “SL”
- h) La desviación estándar por reproducibilidad “SR”
- i) El coeficiente de variación de repetibilidad “CVr”
- j) El coeficiente de variación de reproducibilidad “CVR”

3.6. Incertidumbre

Esta ecuación permitió determinar la incertidumbre combinada, aplicando incertidumbres relativas, debido a que las variables que contribuyen a la incertidumbre tienen diferentes unidades:

$$U \text{ método} = \sqrt{U_{cal}^2 + U_{res}^2 + U_R^2} \quad \text{Ecuación 30}$$

Donde:

U método = Incertidumbre del método-matriz agua

U_{cal} = Incertidumbre combinada de la calibración instrumental.

U_{res} = Incertidumbre de resolución.

U_R = Incertidumbre de Reproducibilidad. Desviación estándar de reproducibilidad SR del Anova.

3.6.1. Incertidumbre de calibración

$$U_{cal} = \sqrt{U_{pp}^2 + U_{FR}^2 + U_{res}^2} \quad \text{Ecuación 31}$$

Donde:

U_{pp} = Incertidumbre de preparación de las soluciones patrón.

U_{FR} = Incertidumbre de la función respuesta = Syx (global)

U_{res} = Incertidumbre de resolución del instrumento.

3.6.2. Incertidumbre de los estándares a partir del estándar de 1000 mg/L

$$U_{PP} = C \sqrt{\left(\frac{U_{Q \text{ std } 1000}}{C}\right)^2 + \left(\frac{U(Vf) \text{ pipeta}}{V \text{ pipeta}}\right)^2 + \left(\frac{U \text{ matraz}}{V \text{ matraz}}\right)^2} \quad \text{Ecuación 32}$$

Donde:

U_{pp} = Incertidumbre de preparación de las soluciones patrón.

C = Concentración del estándar 5 mg/l

U_{Q std 1000} = Incertidumbre del estándar madre de selenio de 1000 mg/l

1) Cálculo de la Incertidumbre relativa de estándar madre de selenio de 1000 mg/L

$$U_{Q \text{ std } 1000} = \frac{U(\text{std})}{K} \quad \text{Ecuación 33}$$

Donde:

U(std) = Obtenido del certificado del estándar, mg/l

K = Factor de cobertura (K= 2, con un nivel de confianza del 95,45%)

Cálculo de la Incertidumbre relativa del std madre

$$U \text{ reactiva std} = \frac{U_{Q \text{ std } 1000}}{C} \quad \text{Ecuación 34}$$

Donde:

C= Concentración 1000 mg/L

2) Cálculo de la Incertidumbre para el material volumétrico U(Vf)

Para el cálculo de la U en las pipetas volumétricas y balones de aforo se tiene la siguiente fórmula:

$$U(Vf) = \sqrt{U(Vcal)^2 + U(Vtemperatura)^2 + U(Vrep)^2} \quad \text{Ecuación 35}$$

Donde:

Vf = Volumen del material volumétrico

Incertidumbre de calibración U(Vcal)

Para el cálculo de la incertidumbre de la pipeta, los cálculos se efectúan para una pipeta volumétrica de 1 ml.

$$U(Vcal) = \frac{U_{cal}}{K} \quad \text{Ecuación 36}$$

Donde:

U(cal) = Se obtiene del certificado de calibración de la pipeta volumétrica

K = Factor de cobertura (K= 2, con un nivel de confianza del 95,45%)

Incertidumbre debida a la diferencia entre la T de calibración U(Vtempetaura)

$$U(Vtempetaura) = \frac{(Dif T)*Vf*\alpha}{\sqrt{3}} \quad \text{Ecuación 37}$$

Donde:

Vf = Volumen del material volumétrico

Diferencia de temperatura a (20°C) = 10 Rango de temperatura 20-30°C

α = 0,00025 Coeficiente de expansión de vidrio boro sílice

Incertidumbre de U (Vrep) y U relativa

Incertidumbre de la pipeta o material volumétrico: Reemplazando los resultados de las variables U(cal), U(V temperatura), U(Vrep) en la formula U(Vf).

$$U(Vf) = \sqrt{U(Vcal)^2 + U(Vtemperatura)^2 + U(Vrep)^2} \quad \text{Ecuación 38}$$

$$U \text{ relativa} = \frac{U(Vf)}{Vf} \quad \text{Ecuación 39}$$

3.6.3. Incertidumbre de la función respuesta $UFR = S_{xy}$ (global)

Se consideró el cálculo de la función respuesta de las cinco curvas de calibración.

$$U_{FR} = \frac{S_{xy}(\text{global})}{\sqrt{3}} \quad \text{Ecuación 40}$$

Donde:

$S_{xy}(\text{global})$ = Función respuesta global (Error tipo de estimación de X (S_{xy}))

3.6.4. Incertidumbre de resolución (U_{res})

Se calculó la incertidumbre de la resolución de los equipos.

$$U_{RES} = \frac{\text{resolución de equipo digital}}{\sqrt{12}} \quad \text{Ecuación 41}$$

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de resultados

4.1.1. Lectura o datos primarios del analito validado

En la tabla 1-4 se describe las lecturas de matrices, estándares, blancos para selenio; los datos serán tomados para los cálculos estadísticos de validación.

Tabla 1-4: Datos primarios para validación de selenio en aguas para el intervalo de trabajo 0,01 a 0.5 mg/l.

| Nivel | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---------------|---------|-------------|---------------|-----------|-------------|---------------|--------------|-------|--------|
| Concentración | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,020 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0,5 |
| Muestras | blanco | Std 0,01 | TCLP+ 0,01 | LIXR S | Std 0,03 | Río + 0,03 | ADI+0 ,03 | ADI | ACONT. |
| Dilución | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 20 |
| Analista 1 | 0,00010 | 0,010 | 0,010 | 0,020 | 0,029 | 0,033 | 0,027 | 0,055 | 0,500 |
| | 0,00010 | 0,011 | 0,010 | 0,018 | 0,031 | 0,027 | 0,032 | 0,048 | 0,420 |
| | 0,00009 | 0,010 | 0,012 | 0,019 | 0,028 | 0,032 | 0,030 | 0,054 | 0,460 |
| | 0,00009 | 0,011 | 0,011 | 0,020 | 0,030 | 0,031 | 0,027 | 0,053 | 0,480 |
| | 0,00010 | 0,010 | 0,010 | 0,019 | 0,028 | 0,028 | 0,029 | 0,055 | 0,500 |
| Analista 2 | 0,00009 | 0,009 | 0,0090 | 0,021 | 0,030 | 0,027 | 0,029 | 0,052 | 0,480 |
| | 0,00009 | 0,009 | 0,0100 | 0,022 | 0,031 | 0,029 | 0,032 | 0,050 | 0,460 |
| | 0,00009 | 0,010 | 0,0100 | 0,019 | 0,029 | 0,026 | 0,029 | 0,048 | 0,500 |
| | 0,00009 | 0,010 | 0,0100 | 0,020 | 0,032 | 0,030 | 0,031 | 0,054 | 0,480 |
| | 0,00010 | 0,010 | 0,0100 | 0,021 | 0,033 | 0,034 | 0,029 | 0,055 | 0,460 |

Fuente: (Aqlab, 2020)

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020

Donde:

Std 0,01/0,03: Solución estándar 0,01 mg/l y 0,03 mg/l.

TCLP + 0,01: Muestra fortificada Lixiviado de corte + solución estándar 0,01 mg/l.

Lixiviado RS: Lixiviado de relleno satinario.

Río + 0,03: Muestra fortificada: Agua de río + solución estándar 0,03 mg/l.

ADI: Agua de descarga industrial.

ACONT: Agua contaminada

4.1.2. Determinación de la linealidad de la función respuesta del método selenio en aguas

En la tabla 3-4 se describe la preparación de los estándares de selenio, se tomaron datos para cinco curvas de calibración para determinar la función respuesta del método ver en tabla 2-4 En el gráfico 1-4 se muestra la linealidad de las curvas de calibración.

Tabla 2-4: Datos de la curva de calibración para el método selenio en aguas.

| CONCENTRACIÓN mg/l | CURVA 1 Abs | CURVA 2 Abs | CURVA 3 Abs | CURVA 4 Abs | CURVA 5 Abs |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 0,005 | 0,041 | 0,040 | 0,043 | 0,041 | 0,042 |
| 0,010 | 0,083 | 0,082 | 0,081 | 0,084 | 0,083 |
| 0,020 | 0,164 | 0,163 | 0,162 | 0,164 | 0,162 |
| 0,030 | 0,255 | 0,254 | 0,253 | 0,255 | 0,252 |
| 0,050 | 0,425 | 0,425 | 0,424 | 0,423 | 0,425 |

Fuente: Datos de curvas de calibración para Se en aguas. 2020.

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

Linealidad de las Curvas de Calibración

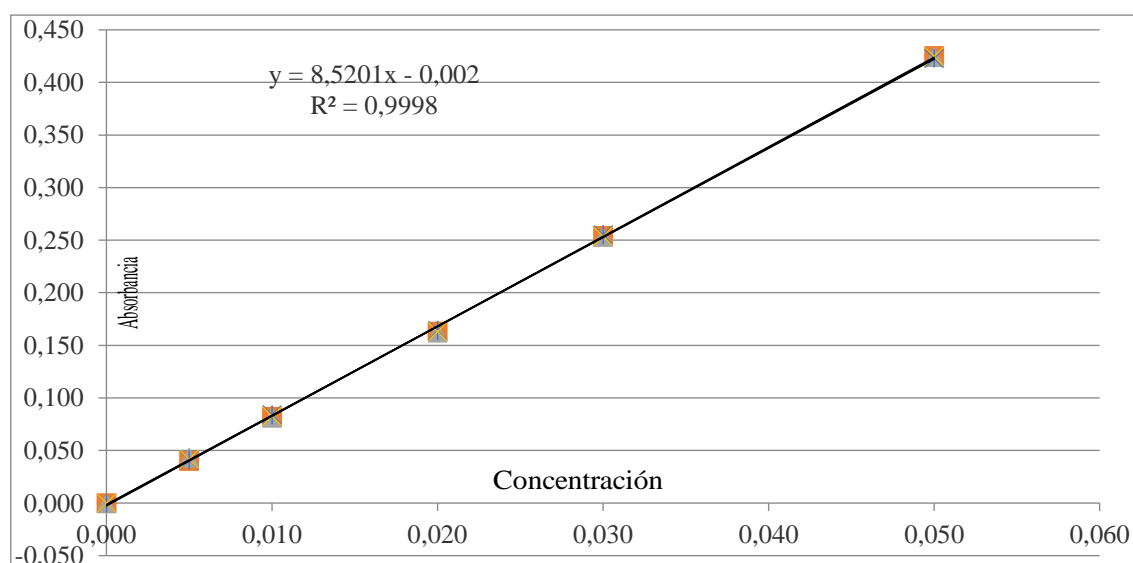


Gráfico 1-4: Absorbancia vs Concentración. Linealidad de las curvas de calibración.

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020

Se aplicó el método de mínimos cuadrados para determinar la función respuesta/estimación lineal. Los cálculos se realizaron en base a la validación de selenio en aguas y se describe en la tabla 3-4.

Tabla 3-0: Parámetros estadísticos de la función respuesta del método selenio en aguas.

| Variable | Curva 1 | Curva 2 | Curva 3 | Curva 4 | Curva 5 |
|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| b(m) pendiente | 8,5201 | 8,5269 | 8,4828 | 8,4789 | 8,4920 |
| a (intercepto) | -0,0020 | -0,0028 | -0,0021 | -0,0013 | -0,0021 |
| Sb | 0,0621 | 0,0699 | 0,0850 | 0,0592 | 0,0824 |
| Sa | 0,0016 | 0,0018 | 0,0022 | 0,0015 | 0,0021 |
| r ² | 0,9998 | 0,9997 | 0,9996 | 0,9998 | 0,9996 |
| Syx | 0,0026 | 0,0029 | 0,0035 | 0,0025 | 0,003 |
| Grados libertad (n-1) | 4,0000 | 4,0000 | 4,0000 | 4,0000 | 4,0000 |
| t | 2,776 | 2,776 | 2,776 | 2,776 | 2,776 |
| a min | -0,006 | -0,0008 | -0,008 | -0,006 | -0,008 |
| a max | 0,002 | 0,002 | 0,004 | 0,003 | 0,004 |
| b min | 8,348 | 8,333 | 8,247 | 8,315 | 8,263 |
| b max | 8,692 | 8,721 | 8,719 | 8,643 | 8,721 |
| Sxy | 0,0003 | 0,0003 | 0,0004 | 0,0003 | 0,0004 |
| r | 0,9999 | 0,9999 | 0,9998 | 0,9999 | 0,9998 |

Fuente: Datos de validación de selenio

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

Se determinó los interceptos máximos y mínimos, junto con la pendiente máxima y mínima para el control de las curvas de calibración durante y después del proceso de validación. Para todo ello se tomaron los valores máximos y mínimos (a_{\min} , a_{\max} , b_{\min} , b_{\max}) de la tabla 4-4.

Tabla 4-4: Interceptos y pendientes máximas y mínimas para el control de curva de calibración.

| LIMITES | CURVA 1 | CURVA 2 | CURVA 3 | CURVA 4 | CURVA 5 | PARA CONTROL | |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------------|-----------|
| a min | -0,0064 | -0,0077 | -0,0081 | -0,0055 | -0,0080 | -0,0081 | a min |
| a máx. | 0,0024 | 0,0022 | 0,0039 | 0,0029 | 0,0038 | 0,0039 | a max |
| b min | 8,3478 | 8,3328 | 8,2469 | 8,3146 | 8,2632 | 8,2469 | b (m) min |
| b máx. | 8,6924 | 8,7209 | 8,7187 | 8,6433 | 8,7209 | 8,7209 | b (m) max |

Fuente: Datos de validación de selenio

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

4.1.3. Análisis de repetibilidad (r) de los datos primarios

Tabla 5-0: Repetibilidad para cada nivel de concentración Analista 1.

| Nivel | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----------------------------|---------------|---------------------------|-----------------------------|--------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------|-------------|---------------|
| Concentración | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,020 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0.5 |
| Muestras | blanco | Std 0,01 | TCLP+ 0,01 | LIXRS | Std 0,03 | Rio + 0,03 | ADI+0,03 | ADI | ACONT. |
| media | 0,00010 | 0,01040 | 0,01060 | 0,01920 | 0,02920 | 0,03020 | 0,02900 | 0,05308 | 0,47200 |
| s desviación estándar | 0,000005 | 0,000548 | 0,000894 | 0,000837 | 0,001304 | 0,002588 | 0,002121 | 0,002955 | 0,033466 |
| % SDR (s/) *100 | 5,71 | 5,27 | 8,44 | 4,36 | 4,47 | 8,57 | 7,31 | 5,57 | 7,09 |

Fuente: Datos de repetibilidad de selenio

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

Tabla 6-4: Repetibilidad para cada nivel de concentración Analista 2.

| Nivel | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----------------------------|---------------|---------------------------|-----------------------------|--------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------|-------------|---------------|
| Concentración | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,020 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0.5 |
| Muestras | blanco | Std 0,01 | TCLP+ 0,01 | LIXRS | Std 0,03 | Rio + 0,03 | ADI+0,03 | ADI | ACONT. |
| media | 0,00009 | 0,00960 | 0,00980 | 0,02060 | 0,03100 | 0,02860 | 0,03000 | 0,05180 | 0,47600 |
| s desviación estándar | 0,00000 | 0,00055 | 0,00045 | 0,00114 | 0,00158 | 0,00207 | 0,00141 | 0,00286 | 0,01673 |
| % SDR (s/) *100 | 4,86 | 5,71 | 4,56 | 5,53 | 5,10 | 7,25 | 4,71 | 5,53 | 3,52 |

Fuente: Datos de repetibilidad de selenio

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

Análisis: Se aceptan los datos obtenidos de repetibilidad de validación, ya que el porcentaje SDR del analista 1 y 2 es < 10% en todos los niveles de concentración

4.1.4. Análisis de reproducibilidad (R) de los datos primarios

Tabla 7-4: Análisis estadístico T student para Analista 1 y Analista 2.

| Nivel | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|------------------------------|---------------|---------------------------|-----------------------------|--------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------|-------------|--------------------------|
| Concentración | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,020 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0.5 |
| Muestras | blanco | Std 0,01 | TCLP+ 0,01 | LIXRS | Std 0,03 | Rio + 0,03 | ADI+0,03 | ADI | ACONT . |
| 1 Media analista 1 | 0,000096 | 0,010400 | 0,010600 | 0,019200 | 0,029200 | 0,030200 | 0,029000 | 0,053080 | 0,472000 |
| 2 Media analista 2 | 0,000092 | 0,009600 | 0,009800 | 0,020600 | 0,031000 | 0,028600 | 0,030000 | 0,051800 | 0,476000 |
| V1 Varianza analista 1 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000001 | 0,000001 | 0,000002 | 0,000007 | 0,000005 | 0,000009 | 0,001120 |
| V2 Varianza analista 2 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000001 | 0,000003 | 0,000004 | 0,000002 | 0,000008 | 0,000280 |
| t teórico | 2,26216 | 2,26216 | 2,26216 | 2,26216 | 2,26216 | 2,26216 | 2,26216 | 2,26216 | 2,26216 |
| t calculado | 1,19257 | 2,17732 | 1,68655 | 2,08700 | 1,85164 | 1,01703 | 0,82690 | 0,65579 | 0,22537 |
| Resultado | Aceptado | Aceptado | Aceptado | Aceptado | Aceptado | Aceptado | Aceptado | Aceptado | Aceptado |

Fuente: Datos de reproducibilidad de selenio

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

Se aceptó los datos de validación, porque el $T_{\text{calculado}} < T_{\text{teórico}}$, es decir no hay diferencia significativa entre las medidas tomadas por el analista 1 y 2.

El cálculo de los límites de control del estándar de trabajo en la determinación de selenio

Se determinó los límites de control para el estándar de trabajo de selenio, que sirvió para establecer el control de calidad del método considerando los datos obtenidos del analista 1 y 2.

Tabla 8-4: Porcentaje de variación para estándar de trabajo de Se en el intervalo 0.01 a 0.5 mg /l

| Nivel | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|--------|-------------|---------------|-----------|-------------|---------------|----------|--------|--------|
| Concentración | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,020 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0,5 |
| Muestras | blanco | Std 0,01 | TCLP+ 0,01 | LIXR S | Std 0,03 | Rio + 0,03 | ADI+0,03 | ADI | ACONT. |
| n | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| \bar{X} media | 0,0001 | 0,0100 | 0,0102 | 0,0199 | 0,0301 | 0,0294 | 0,0295 | 0,0524 | 0,4740 |
| s | 0,0000 | 0,0007 | 0,0008 | 0,0012 | 0,0017 | 0,0024 | 0,0018 | 0,0028 | 0,0250 |
| %RSD | 5,49% | 6,67% | 7,73% | 6,02% | 5,53% | 8,05% | 6,03% | 5,39% | 5,28% |
| s ² (varianza) | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0006 |
| %Recuperación resultado / X teórico | 100,0% | 100,0% | 102,00% | 99,50% | 100,33% | 100,0% | 98,33% | 98,00% | 94,80% |
| 2s % (teórico *(RSD*2)) * 100/ | 10,99 | 13,33 | 15,16 | 12,09 | 11,02 | 16,10 | 12,27 | 10,27 | 11,14 |

Fuente: Datos de reproducibilidad de selenio

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

Se consideró el porcentaje de variación en un intervalo de confianza k=2 que abarca todos los niveles de concentración y se determinó que el estándar de trabajo para el control de calidad interno del método es un estándar de 0,03 mg/l y se calculó los límites de control descritos en la tabla 9-4

Tabla 9-4: Límites de control para el estándar de trabajo de Se en aguas

| LÍMITES DE CONTROL (2s) | |
|---|-------|
| 16,10 % | |
| Estándar de control de Selenio 0,03 mg/ l | |
| Criterio (std control*16%) | 0,003 |
| Límite máximo (std control + criterio) | 0,027 |
| Límite mínimo (std control - criterio) | 0,033 |

Fuente: Límites de control de selenio

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

Los límites de control para el estándar de trabajo de 0,03 mg/l se pueden encontrar desde 0,033 mg/l hasta 0,027 mg/l.

4.1.5. Análisis de varianza ANOVA

Tabla 10-4: Resultados del análisis de varianza en todos los niveles de concentración, Se en aguas

| CONCENTRACIÓN VERDADERA | Sr | SL ² | SR | CV r% | CV R% |
|--------------------------|--------|-----------------|--------|-------|-------|
| BLANCO | 0,0000 | 0,0000000 | 0,0000 | 5,319 | 5,319 |
| STD 0,010 | 0,0005 | 0,0000006 | 0,0005 | 5,477 | 5,484 |
| TCLP + 0,01 | 0,0007 | 0,0000006 | 0,0007 | 6,932 | 6,938 |
| LIX RS | 0,0010 | 0,0000019 | 0,0010 | 5,025 | 5,035 |
| STD CONTROL 0.03 mg/L | 0,0014 | 0,0000000 | 0,0014 | 4,814 | 4,814 |
| RIO+0,03 | 0,0023 | 0,0000004 | 0,0023 | 7,977 | 7,978 |
| ADI + 0,03 | 0,0018 | -0,0000004 | 0,0018 | 6,111 | 6,111 |
| Agua descarga Industrial | 0,0029 | -0,0000022 | 0,0029 | 5,549 | 5,549 |
| ACONTAM | 0,0265 | -0,0003300 | 0,0265 | 5,582 | 5,582 |

Fuente: Análisis de varianza de selenio

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

Análisis: Se consideró todos los datos primarios en condiciones de repetibilidad (dentro del grupo) y reproducibilidad (entre grupos) para el método de selenio. Se aceptó los datos de validación en el análisis de varianza por que la Sr es menor que la SR. Se aclara que la Sr es menor que la SR porque son datos tomadas en condiciones de repetibilidad (mismo analista y día), y la SR es más alto porque son diferentes condiciones de trabajo o analista.

Análisis estadístico T Fisher

Tabla 11-4: Cálculo de T Fisher en todos los niveles de concentración de Selenio en aguas

| | $F \text{ calculado} = \frac{DCMb}{DCMw}$ | F teórico |
|--------------------------|---|-----------|
| BLANCO | 1,6000 | 5,7861 |
| STD 0,010 | 5,3333 | 5,7861 |
| TCLP + 0,01 | 3,2000 | 5,7861 |
| LIX RS | 4,9000 | 5,7861 |
| STD CONTROL 0.03 mg/L | 3,8571 | 5,7861 |
| RIO+0,03 | 1,1636 | 5,7861 |
| ADI + 0,03 | 0,7692 | 5,7861 |
| Agua descarga Industrial | 0,4838 | 5,7861 |
| ACONTAM | 0,0571 | 5,7861 |

Fuente: Cálculo de T Fisher de selenio

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

Se aceptaron los datos de validación, por que $F_{\text{calculado}} < F_{\text{teórico}}$ y no hay diferencia significativa entre grupo de datos (analistas) y entre datos (número de repeticiones)

4.1.6. Incertidumbre

Se reemplazó las Variables U_{pp} , U_{FR} , U_{res} en la fórmula de U_{cal} para el nivel de concentración de 0,01 mg/l.

$$U_{cal} = \sqrt{U_{pp}^2 + U_{FR}^2 + U_{res}^2}$$

$$U_{cal} = \sqrt{0.00003^2 + 0.00018^2 + 0.00029^2}$$

$$U_{cal} = 0,00034$$

Cálculo del porcentaje de Incertidumbre para el nivel 0,01 mg/l.

$$\%U = \frac{U_{cal}}{C} * 100\%$$

$$\%U = \frac{0.00034}{0.010} * 100\%$$

$$\%U = 3,40 \%$$

Tabla 12-0: Incertidumbre de calibración de cada nivel de concentración de Selenio en aguas

| Nivel de concentración | STD | TCLP | LIX. | STD | RIO | ADI | ADI | ACONT | Unidades |
|------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|
| | 0,010 | 0,010 | 0,020 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0,50 | |
| Ucal | 0,00034 | 0,00034 | 0,00034 | 0,00035 | 0,00035 | 0,00036 | 0,00034 | 0,00171 | |
| %Ucal | 3,40 | 3,40 | 1,71 | 1,15 | 1,15 | 1,20 | 0,68 | 0,34 | % |

Fuente: Cálculo de T Fisher de selenio

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

4.1.6.1. Incertidumbre de los estándares a partir del estándar de 1000 mg/L

Se calculó la incertidumbre de la preparación de un estándar de 5 mg/l, se usó un matraz de 100 ml y una pipeta automática de 1 ml.

$$U_{PP} = C \sqrt{\left(\frac{U_{Q \text{ std } 1000}}{C}\right)^2 + \left(\frac{U(Vf) \text{ pipeta}}{V \text{ pipeta}}\right)^2 + \left(\frac{U \text{ matraz}}{V \text{ matraz}}\right)^2}$$

$$U_{PP} \left(\text{std } 5,0 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = \text{std } 5,0 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \sqrt{\left(\frac{U_{Q \text{ std } 1000}}{C}\right)^2 + \left(\frac{U(Vf) \text{ pipeta}}{V \text{ pipeta}}\right)^2 + \left(\frac{U \text{ matraz}}{V \text{ matraz}}\right)^2}$$

$$U_{PP} \left(\text{std } 5,0 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = 5,0 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \sqrt{\left(\frac{1,200}{1000}\right)^2 + \left(\frac{0,0003}{1}\right)^2 + \left(\frac{0,1490}{100}\right)^2}$$

$$U_{PP} \left(\text{std } 5,0 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = 0,012730 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$$

Tabla 13-1: Incertidumbre de las soluciones patrón Upp

| Nivel Std mg/l | Upp para cada Std |
|-------------------|----------------------|
| 5,000 | 0,012730 |
| 0,005 | 0,000138 |
| 0,010 | 0,00028 |
| 0,020 | 0,00005 |
| 0,030 | 0,00008 |
| 0,050 | 0,00013 |
| 0,50 | 0,00168 |

Fuente: Incertidumbre de las soluciones patrón Upp

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

1) Incertidumbre del Estándar madre de Selenio de 1000mg/l.

$$U_{Q \text{ std } 1000} = \frac{U(\text{std})}{K}$$

$$U_{Q \text{ std } 1000} = \frac{2,400}{2}$$

$$U_{Q \text{ std } 1000} = 1,200$$

Cálculo de la Incertidumbre relativa del std madre.

$$U \text{ relativa std} = \frac{U_{Q \text{ std } 1000}}{C}$$

$$U \text{ relativa std} = \frac{1,200}{1000}$$

$$U \text{ relativa std} = 0,001$$

2) Incertidumbre para el material volumétrico U(Vf).

Incertidumbre de calibración U(Vcal): Incertidumbre de la pipeta, los cálculos se efectuarán para una pipeta automática de 1 ml.

$$U(Vcal) = \frac{U(cal)}{K}$$

$$U(Vcal) = \frac{0.0010}{2}$$

$$U(Vcal) = 0,0005$$

Incertidumbre debida a la diferencia entre la T de calibración U(Vtemperatura).

$$U(Vtemperatura) = \frac{(DifT) * Vf * \alpha}{\sqrt{3}}$$

$$U(Vtemperatura) = \frac{(10) * 1 * 0,00025}{\sqrt{3}}$$

$$U(Vtemperatura) = 0,0014$$

Incertidumbre de U (Vrep).

Se calculó la incertidumbre de la pipeta o material volumétrico.

$$U(Vf) = \sqrt{U(Vcal)^2 + U(Vtemperatura)^2 + U(Vrep)^2}$$

$$U(Vf) = \sqrt{(0,0005)^2 + (0,0014)^2 + (0,0007)^2}$$

$$U(Vf) = 0,0017$$

Se calculó la incertidumbre relativa del material volumétrico utilizado:

$$U \text{ relativa} = \frac{U(Vf)}{Vf}$$

$$U \text{ relativa} = \frac{0,0017}{1}$$

$$U \text{ relativa} = 0,0017$$

Tabla 14-0: Incertidumbre de material volumétrico U(Vf).

| MATERIAL | U(Vf) | U relativa | MATERIAL | U(Vf) | U relativa |
|-------------|--------|---------------|----------------------|--------|---------------|
| PIPETA 1 ml | 0,0003 | 0,002756 | BALON AFORADO 5 ml | 0,0102 | 0,0020 |
| PIPETA 1 ml | 0,0017 | 0,001680 | BALON AFORADO 10 ml | 0,0162 | 0,0016 |
| PIPETA 2 ml | 0,0058 | 0,002898 | BALON AFORADO 25 ml | 0,0363 | 0,0015 |
| PIPETA 3 ml | 0,0067 | 0,002230 | BALON AFORADO 50 ml | 0,0779 | 0,0016 |
| PIPETA 4 ml | 0,0092 | 0,002299 | BALON AFORADO 100 ml | 0,1490 | 0,0015 |

Fuente: Incertidumbre de material volumétrico U(Vf)

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

4.1.6.2. Incertidumbre de la función respuesta $UFR = S_{xy}$ (global).

Se determinó la función respuesta de las cinco curvas de calibración.

$$U_{FR} = \frac{S_{xy} \text{ (global)}}{\sqrt{3}}$$

$$U_{FR} = \frac{0,00033}{\sqrt{3}}$$

$$U_{FR} = 0,0001756$$

Tabla 15-0: Función respuesta de las curvas de calibración.

| Variable | Función respuesta |
|---------------------------|-------------------|
| b (m) | 8,5001 |
| a | -0,0021 |
| Sb | 0,0279 |
| Sa | 0,0007 |
| r ² | 0,9987 |
| Syx | 0,0026 |
| Grados libertad | 28 |
| <i>Sxy global = syx/b</i> | 0,00033 |

Fuente: Función respuesta de las curvas de calibración

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

4.1.6.3. Incertidumbre de resolución (*U_{RES}*).

$$U_{RES} = \frac{\text{resolución de equipo digital}}{\sqrt{12}}$$

$$U_{RES} = \frac{0,001}{\sqrt{12}}$$

$$U_{RES} = 0,00029$$

4.1.6.4. Cálculo de la incertidumbre del método selenio en aguas y lixiviados.

Tabla 16-0: Desviación estándar de reproducibilidad (Anova).

| Niveles de concentración | SR |
|--------------------------|--------|
| BLANCO | 0,0594 |
| STD 0,05 mg/L | 0,0667 |
| TCLP+0,05 | 0,0773 |
| LIXIVIADO RS | 0,0602 |
| STD 0,20 mg/L | 0,0553 |
| RIO+0,20 | 0,0805 |
| ADI+0,30 | 0,0603 |
| Agua descarga Industrial | 0,0539 |
| ACONTAM | 0,0528 |

Fuente: Desviación estándar de reproducibilidad

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

Se realizó el cálculo para el nivel de concentración de 0,01 mg/l.

$$U \text{ método} = \sqrt{0,0003^{2^2} + 0,00029^2 + 0,0007^2}$$

$$U \text{ método} = 0,000838 * 2$$

$$U \text{ método} = 0,00167$$

Se determinó el porcentaje de Incertidumbre para el nivel 0,01 mg/l.

$$\%U = \frac{U \text{ método}}{C}$$

$$\%U = \frac{0,00167}{0,010}$$

$$\%U = 16,73 \%$$

Tabla 17-0: Incertidumbre del método Selenio en aguas y lixiviados.

| Nivel de concentración | STD | TCLP | LIX. | STD | RIO | ADI | ADI | A CONT | Unidades |
|------------------------|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|----------|
| | 0,010 | 0,010 | 0,020 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0,50 | |
| Umétodo | 0,001 | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,005 | 0,004 | 0,006 | 0,0530 | |
| %Ucal | 14,13 | 16,73 | 10,97 | 10,12 | 15,92 | 12,41 | 11,78 | 10,61 | % |

Fuente: Incertidumbre del método Selenio en aguas

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020.

Para declarar la incertidumbre en todo el rango 0,01 mg/l- 0,5 mg/l del método selenio en aguas, se tomó el mayor % determinado

Incertidumbre de método = 16.73 %

Donde:

LD = Valor asignado luego del cero en las concentraciones descritas en la curva de calibración.
0,005

LC = Valor asignado luego del LD en las concentraciones descritas en la curva de calibración.
0,010

4.2. Discusiones

4.2.1. *Discusión de parámetros críticos de validación del método selenio*

Se establece como criterio de calidad del método, los parámetros de precisión, veracidad e incertidumbre los cuales se determinaron estadísticamente (ANOVA, T Studet, criterio Fisher y estimación de incertidumbre), con un rango de confiabilidad de 95%.

Para cumplir el criterio de precisión, se realiza el análisis de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R) de los datos primarios, que disierne variables de menor influencia, las variables que tienen mayor aporte de incertidumbre es la preparación de los estándares de trabajo que influye en la calibración de los equipos.

Los parámetros críticos que se establece para la validación del método son: coeficiente de variación de repetibilidad y reproducibilidad $\leq 10\%$, exactitud $80\% < R < 115\%$ e incertidumbre $U \leq 30\%$ (K=2) en todos los niveles de concentración.

Determinación de selenio en aguas

La validación se realizó con los niveles de concentración siguientes: 0,005; 0,010; 0,020; 0,030; 0,050; 050 mg/l, considerando matriz puras, forticadas y estándares. El límite de cuantificación se fijó de la recta de calibración, que dio 0,01 mg/l (concentración más baja determinada experimentalmente), por esta razón el rango de validación se estableció desde 0,01 mg/l - 0,5 mg/l.

El porcentaje de recuperación con muestra fortificada va desde 94,80% al 102,00%, debido a que no se contó con material de referencia certificado y para evaluar la recuperación de selenio se realizó la fortificación de la muestra de agua de río (muestra fortificada de 3,03 mg/l) cuyo porcentaje de recuperación es de 100% (ver anexo A). El % recuperado de selenio obtenido con la muestra fortificada preparada, cumple con el rango establecido en los objetivos de validación del %R de 80% al 115%. Para el control de calidad de las curvas de calibración del método selenio se determinó que la pendiente máxima es 8,7209; pendiente mínima 8,2469; el intercepto máximo 0,0039 y el intercepto mínimo -0,0081.

El porcentaje de la desviación estándar de repetibilidad y reproducibilidad se encuentran con valores $\leq 10\%$ en todos los niveles de concentración, es decir que cumple con el objetivo de validación establecido en la validación.

La incertidumbre tiene una variabilidad del 10 – 17 %, por tanto, se determina que la U del método de Selenio en Aguas es 17 %, ya que este valor abarca todo el rango de trabajo.

CONCLUSIONES

Se validó el método para la determinación de selenio en aguas, y se logró cumplir con los parámetros y objetivos de validación (ver tabla 1-4) y los intervalos de trabajo fijados (ver tabla 1-4) en la validación. Se declaró el método validado y aprobado por la Dirección Técnica e ingresado al Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio AqLab de la Ciudad de Orellana.

Se desarrolló el instructivo técnico de ensayo ITE-AQLAB-46 para la determinación de selenio en aguas por el método generador de hidruros con espectrometría de absorción atómica, donde detalla el procedimiento para muestras de aguas y estándares, mismo que fue aprobado y agregado a las listas maestras del sistema de calidad del laboratorio Aqlab.

También se determinó el tratamiento adecuado para cada tipo de muestra en matriz agua, logrando una recuperación mayor al 80 %, el proceso de tratamiento y digestión de las muestras se describe en el instructivo de técnico de ensayo ITE-AQLAB-46 (ver anexo E). Además de la preparación de estándares de trabajo y determinación de curva de calibración.

Se logró con éxito la optimización de operación del generador de hidruros Perkin Elmer FIAS, las condiciones experimentales fueron optimizadas (ver tabla 4-3), según lo establecido en el apartado 2.2.6 y en la guía manual del equipo. Se elaboró el instructivo de uso ITU-AQLAB-46 para el uso del generador de hidruros.

Se realizó el tratamiento estadístico de los resultados analíticos mediante análisis de varianza ANOVA, análisis estadístico T Fisher, T student, y se determinó el alcance del método selenio de 0,01 mg/l a 0,5 mg/l.

Se estableció que los parámetros críticos en la validación son: función respuesta/linealidad del método, porcentaje de desviación estándar $< 10\%$, porcentaje de recuperación de $80\% - 115\%$ e incertidumbre $> \text{al } 30\%$, parámetros que determinaron que la validación fue robusta y que el método de análisis de selenio es repetible y reproducible.

Se calculó la incertidumbre para el método y se determinó que las contribuciones a ésta son: U de resolución del equipo, U material volumétrico y preparación de estándares, U de la función respuesta y la U reproducibilidad por tanto se declaró que la incertidumbre final del método es: 17% en matriz agua.

RECOMENDACIONES

Se recomienda que antes de utilizar el sistema GH, se optimice los parámetros de funcionamiento, alinear la celda de cuarzo para obtener la máxima absorbancia (asegurarse que el haz de luz pase por el centro de la celda sin tocar paredes) y aspirar un espacio en blanco hasta que se eliminen los efectos de memoria. Además, realizar una secuencia de los procedimientos que se lleva a cabo para optimizar el funcionamiento del generador de hidruro, e identificar las variables que afectan a la generación del seleniuro de selenio, su transporte y medida.

Establecer la concentración y flujo del agente reductor (NaBH_4) y agente portador (HCL), controlar el flujo del gas argón y la velocidad de agitación para una respuesta óptima del instrumento para selenio. Se aconseja la inyección rápida de agente reductor para aumentar la sensibilidad, en la inyección las tasas deben ser constantes y tan rápidas como el sistema lo tolere.

Para el método selenio se recomienda realizar lavados con ácido nítrico diluido entre muestra y muestra, de las mangueras del equipo de generación de hidruros para evitar la contaminación durante el análisis en especial cuando se determinan concentraciones altas, de este modo garantizar los resultados obtenidos.

Se recomienda realizar un mantenimiento más continuo al equipo de generación de hidruros, ajustar los flujos de aspiración de muestra y reactivos, colocar los tubos con presión suficiente para tener un flujo uniforme evitando el aplastamiento y deterioro de mangueras. Vigilar que no se formen espumas en el separador de fases del generador de hidruro.

La adición de ácido nítrico a los estándares preparados, muestras blancos, muestras fortificadas y diluciones necesarias es importante para asegurar la solución uniforme del analito, la cual se consigue alrededor de $\text{pH}=2$. Al preparar los patrones se debe trabajar con material volumétrico de alta calidad.

Usar el equipo de protección personal necesario en el laboratorio, tanto para la preparación de los reactivos, pre tratamiento de muestras y operación de generador de hidruros, ya que se requiere reactivos de alto riesgo y los residuos generados son de carácter ácido, corrosivo, oxidante y las reacciones involucradas son exotérmicas generando desprendimiento de vapores nocivos.

Tener cuidado y tomar las precauciones necesarias para evitar salpicaduras de las muestras mientras se realiza el análisis y lectura de la muestras por que implica pérdida del volumen de muestra y analito.

GLOSARIO

Absorbancia: Es la cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra, se expresa mediante un logaritmo que surge a partir del vínculo entre la intensidad que sale y la intensidad que ingresa a la sustancia. (APHA, 2012)

Gráficos de control: Registro gráfico de la calidad mediante la visualización de los resultados del control de calidad en el tiempo para demostrar el control estadístico de un proceso analítico y para detectar cambios aparentes en el proceso de análisis. Son herramientas de control de calidad esenciales para las pruebas que utilizan la precisión de medidas de control de calidad y precisión. (Aqlab, 2020)

Matriz Fortificada: Es una porción adicional de una muestra a la que se agrega una cantidad conocida de analito (s) de interés antes de la preparación de la muestra. Se usa para evaluar la recuperación de analito en una matriz de muestra. (APHA-AWWA-WPCF, 1992)

Sesgo: El sesgo (error sistemático) es la desviación con signo (+ o -) entre el valor medido promedio y el valor verdadero, ya que el número de mediciones promedio tiende hacia el infinito y la incertidumbre relacionada tiende hacia cero. (Eurachem, 2016)

BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ, Cesar. *Evaluación analítica para la determinación de arsenico y selenio en aguas por espectrometria de absorcion atomica. Laboratorio de Calidad de Aguas, Aguas de Cartagena SA ESP; Planta de Tratamiento de Agua El Bosque.* [en línea] 2014. Cartagena [Citado el: 21 de junio de 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602014000100003

ALVAREZ, Cesar. *Evaluación analítica para la determinación de selenio en aguas por espectroscopia de absorcion atomica.* [en línea] 2014. [Citado el: 17 de junio de 2019.] Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/4263/426339681003.pdf>.

ANZURES, Maria. *Principios de analisis instrumental.* s.l. : Cengage Learning Latin América, 2008.

APHA. *Determinación de metales por Eselectrometria de Absorción Atómica . [aut. libro] AWWA, WPCF APHA. Métodos Normalizados para el analisis de aguas potables y residuales .* Madrid. Diaz de Santos, S.A., 2012.

APHA-AWWA-WPCF. *Metodos Normalizados para el analisis de aguas potables y residuales- APHA-AWWA-WPCF.* Madrid: Diaz de Santos, S.A., 1992. p.21

AQLAB. *Manual de Calidad, Procedimientos Generales, Criterios del Sistema de Acreditación Ecuatoriano.* Francisco de Orellana. 2013.

AQLAB. *Instructivo técnico de uso del espectróetro de absorción atómica ITU-AQLAB-04.* Francisco de Orellana. 2019. p.2.

AQLAB. *Procedimiento General de Validacion de Métodos PG-AQLAB-07.* Francisco de Orellana, Orellana, Ecuador. 2019. p.3

AQLAB. *Procedimiento General de Validación de métodos PG-AQLAB-07.* Francisco de Orellana, Orellana, Ecuador. 2020. p.2.

ARDILA, Rosa. *Sistema de generador de hidruros y espectrometria de abosrcion atomica.* [en línea] 2017. [Citado el: 12 de enero de 2020.] Disponible en:

<https://slideplayer.es/slide/11117652/.1>.

ASECAL. *Validación de Métodos Analíticos Físico-Químicos*. Madrid. 2019.

ASENSIO, J. *Generación de hidruros- espectrometría de absorción atómica en fase gas, determinación de selenio, arsénico y antimonio*. España. 2018. p.1.

ASMUNDIS, Cecilia. *Diseño de metodologías para la determinación de selenio y mercurio en muestras de interés ambiental mediante espectrofotometría en fase .* Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. 2018.

CAÑIZARES, Maria del Pilar. *Lixiviados. En Análisis por inyección en flujo: Herramientas clave para la automatización analítica*. [en línea]. México. 2002. [Citado el: 9 de junio de 2019.] Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0583-76932002000200015

CENAM. *Métodos analíticos adecuados a su propósito-Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. México. 2005. [Citado el: 9 de junio de 2019]. Disponible en: http://cmap.upb.edu.co/rid=1SR8GPHG4-27FVCZV-15M/_Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf

CUBRELLATI, Ricardo. *Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas*. CYTED Programa Iberoamericano de ciencias y tecnología para el desarrollo . [en línea]. 2009. [Citado el: 8 de junio de 2019.] Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/283570336_Aspectos_practicos_de_la_validacion_e_incertidumbre_en_mediciones_quimicas

EURACHEM. *Cuantificación de la Incertidumbre en medidas analíticas* . [en línea] Guía CG 4 ERACHEM/CITAD. España. 2012. Disponible en: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1_ES.pdf

EURACHEM. *La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y temas relacionados*. [en línea] 2014. [Citado el: 10 de junio de 2019.]. Disponible en: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf.

EURACHEM. *La adecuación al uso de los métodos analíticos, Guía de laboratorio para Validación de métodos y temas relacionados*. [en línea] 2ª ed. España. 2016. [Citado el: 10 de

junio de 2019]. Disponible en:
https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf

FIAS. *FIAS Flow Injection Analysis System for Atomic Spectroscopy Setting Up and Performing Analyses-Atomic Spectroscopy.* [en línea] Alemania. 1993. Disponible en:
https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO_FIAS-100-400.pdf

GALLARTA, F. *Generación de hidruros-espectrometría de absorción molecular UV-VIS en fase gas. Determinación de arsénico, antimonio y selenio.* [en línea] 1992. [Citado el: 5 de junio de 2019]. Disponible en: [file:///C:/Users/PORTATIL-PC/Downloads/Dialnet-GeneracionDeHidrurosEspectrometriaDeAbsorcionMolec-110264%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/PORTATIL-PC/Downloads/Dialnet-GeneracionDeHidrurosEspectrometriaDeAbsorcionMolec-110264%20(1).pdf)

GARDNER, M; et al. *Analytical quality control (AQC) for monitoring trace metals in the coastal and marine environmental.* *Water Sci. Technol.* 1986. pp.18-35.

GOMIS, V. *Tema 7. Espectroscopia de emisión y absorción atómica.* 2019.

GUIDELINES FOR DRINKING WATER QUALITY. *Guidelines for Drinking Water Quality, Parametros basados en W.H.O.* 2017.

GUTIÉRREZ, Luis. *Desarrollo de un método analítico para la determinación de selenio en huevos fortificados de gallinas (Isa Brown) por espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros.* [en línea]. 2015. [Citado el: 5 de junio de 2019.] Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/280947037_Desarrollo_de_un_metodo_analitico_para_la_determinacion_de_selenio_en_huevos_fortificados_de_gallinas_Isa_Brown_por_espectroscopia_de_absorcion_atmica_con_generacion_de_hidruros.

HIGUERA, Rosa. *Espectrometría de Absorción atómica EAA.* [en línea] 2017. [Citado el: 13 de Enero de 2020]. Disponible en: <https://slideplayer.es/slide/11117652/>.

INEN. *Agua potable, requisitos, Norma NTE INEN 1108.* [en línea] Quito. 2014. [Citado el: 5 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.pudeleco.com/files/a16057d.pdf>

ISO. *ISO 3534. "Statistics - Vocabulary and symbols - Part 1: Probability and general statistical terms".* [en línea] 1993. p.53. [Citado el: 5 de junio de 2019]. Disponible en:
<https://www.iso.org/standard/8919.html>

JAFFÉ, Werner. *Selenio, un elemento esencial y tóxico*. [aut. libro] *Selenio, un elemento esencial y tóxico. Datos de Latinoamérica*. Venezuela. 2012.

JURADO, Jose. *Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos*. Departamento de Química Analítica. [en línea] 2008. [Citado el: 13 de Enero de 2020]. Disponible en: <https://personal.us.es/jmjurado/docs/AQAEXCEL.pdf>

LÓPEZ, Adriana. Extracción y determinación de selenio y sus especies en nueces en Brasil. Universidad da Coruña. [en línea] 2015. [Citado el: 23 de junio de 2019]. Disponible en: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/17815/Ma%C3%B1anaLopez_Adrina_TFM_2016.pdf?sequence=2&isAllowed=y
https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/17815/Ma%C3%B1anaLopez_Adrina_TFM_2016.pdf?sequence=2&isAllowed=y.

MARVAL, Jean. *Valoración del contenido de selenio total y biodisponible en especies pesqueras de consumo en España*. [en línea] Córdoba. 2015. [Citado el: 21 de junio de 2019.] Disponible en: <file:///E:/Users/Stephanie/Downloads/2015000001266.pdf>.

METROSENS. *Validación e incertidumbre de métodos de ensayo*. [en línea] 2019. [Citado el: 21 de junio de 2019]. Disponible en: https://www.metroSENS.com.ec/ecuador/Programa_de_Formacion_2019.pdf

MINISTERIO DE AMBIENTE. *Acuerdo Ministerial No. 028, febrero 2015- Última Reforma del LIBRO VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente*. [en línea] 2015. [Citado el: 29 de junio de 2019.] Disponible en: https://www.celec.gob.ec/.../index.../82_fe416d99b1500d69d0f43e9a1bf8fe49.html.

MILES, Martín. *Urianálisis Moderno*. España. Martin Lab., S.A.E., 2017.

Montel, A. *Metodología recomendada para la edición del contenido de selenio en especímenes biológicos*. España. 2016.

Nieto, María. Desarrollo de Métodos Analíticos para la Determinación de Selenio y sus especies en muestras de alimentos, aguas y fluidos biológicos por ICP-MS. [en línea] Universidad Complutense de Madrid-Facultad de Ciencias Químicas. Dpto. de Química Analítica. Madrid 2015. [Citado el: 23 de junio de 2019.] Disponible en: <https://eprints.ucm.es/3554/1/T23235.pdf>.

NOM-0052-SEMARNAT. *Norma oficial Mexicana SEMARNAT*. [en línea] 1993. [Citado el: 23 de junio de 2019.] Disponible en:

<http://siga.jalisco.gob.mx/assets/documentos/normatividad/nom052semarnat1993.htm>.

OMS. Selenium in drinking-water. *Selenium in drinking-water Documento de referencia para la elaboración de las Guías de la.* [en línea]. 2013. [Citado el: 11 de junio de 2019]. Disponible en: http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_quimicos/Selenio.pdf.

ORDENANZA MUNICIPAL DEL CANTÓN FRANCISCO DE ORELLANA. *Sobre la prevención y control de la contaminación en lo relativo al recurso agua* . Francisco de Orellana. 2017.

PERKIN, Elmer. *Analyst 100 and AAnalyst 300 Atomic Absorption Spectrometers.* 1997.

PERKIN, Elmer,. *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy* . [aut. libro] The Perkin-Elmer Corporation. 1996.

PERKIN, Elmer. *Recommended Analytical Conditions and General Information for Flow Injection Mercury/Hydride Analyses Using the PerkinElmer FIAS 100/400.* España. Inc, 2018.

PERKIN, Elmer. *Conceptos, Instrumentación y técnicas en espectrofotometría de absorción atómica- Métodos analíticos para espectrofotometría de absorción atómica.* [aut. libro] España. EEA 300. 2019.

RAOHE. *RAOHE 1215 Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador.* Quito. 2020.

RAZMILIC, Blago. *Espectrometría de Absorción Atómica.* 1994.

REMACHE, Ana. Validación de métodos para el análisis de metales en diferentes matrices por espectrometría de absorción atómica. [en línea]. Universidad Central del Ecuador , Quito. 2013. p.1 [Citado el: 11 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1859>

ROCHA, E. *Principios básicos de espectroscopía* . [aut. libro] Mexico. UACH, 2020.

ROMERO, Jairo. *Calidad del agua* . Colombia. s.l.: Escuela Colombiana de Ingenieris , 2012.

RUIZ, Anadón. Medición del contenido de selenio en especímenes biológicos: aplicación en el

laboratorio clinico revision. *Sociedad Española de medicina de laboratorio- Comité científico-comisión de elementos trazas*. [en línea] 2017. [Citado el: 20 de noviembre de 2019.] Disponible en: file:///G:/medicion-del-contenido-de-selenio-en-especimenes-biologicos_-_aplicacion-en-el-laboratorio-clinico-revision-2017.pdf. uno .

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Selenium in drinking-Guía para la calidad del agua potable*. [en línea] Ginebra. 2003. [Citado el: 20 de noviembre de 2019.] Disponible en: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3sp.pdf

SANMIGUEL, Jessica., & GUERRERO, Santiago. Determinación de método para determinar Pb, Cd, Ni por espectrometría de absorción atómica de llama en agua y suelo. [en línea]. ESPOCH, Ecuador. 2017. pp.42-48 [Citado el: 20 de noviembre de 2019.] Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7019/1/236T0275.pdf>

SCHMID, Wolfgang. *Guía para estimar la Incertidumbre de la Medición-Centro Nacional De Metrología*. México. 2019. p.11.

SKOOG, D. *Espectroscopia de Absorción Atómica y Espectroscopia de Fluorescencia Atómica. En Principios del Análisis Instrumental*. [en línea] México : Mc. Graw - Hill, 2008. [Citado el: 22 de junio de 2019.] Disponible en: <http://www.udla.edu.co/documentos/docs/Programas%20Academicos/Quimica/Contenidos%20Programaticos/V%20semestre/Analisis%20Instrumental.pdf>

TORRES, Alexandra. *Sistema de mantenimiento, calidad y laboratorio- Validación de métodos* . Quito. 2018. p.1

TULSMA. *Anexo 1 del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente: Norma de Calidad Ambiental y de descarga de Efluentes al recurso agua*. 2015.

VACA, Rodrigo. Validación del método analítico para la determinación de arsénico, mercurio y selenio por espectroscopía de absorción atómica con un sistema de generación de hidruros, en lixiviados con fines de acreditación en el laboratorio de Química Ambiental del OSP. [en línea]. Universidad Central del Ecuador. 2013. [Citado el: 29 de 5 de 2019.] Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1867/1/T-UCE-0008-11.pdf>.

VERGARA, Freddy. "Evaluación analítica para la determinación de as y selenio en aguas por espectroscopía de absorción atómica". *Revista Boliviana de Química* [en línea], 2019. Bolivia

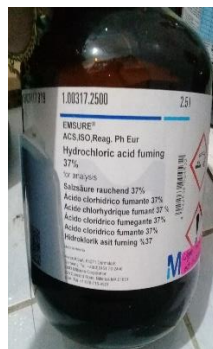
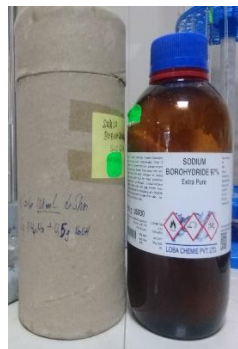
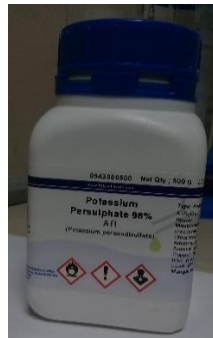
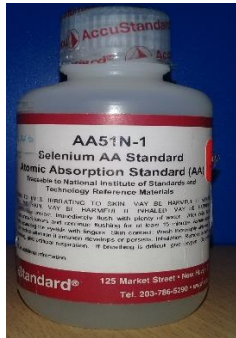
31(1), [Citado el: 29 de 5 de 2019]. ISSN 0250-5460. Disponible en:
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602014000100003

ANEXOS

ANEXO A: DECLARACIÓN DE VALIDACIÓN DE SELENIO EN AGUAS.

| | | | | | | |
|---|--|-------------|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Método: | Espectrometría de absorción atómica | | | | | |
| Matrices: | Aguas naturales Aguas de consumo Aguas residuales y lixiviados | | | | | |
| LINEALIDAD / FUNCIÓN RESPUESTA | | | | | | |
| Pendiente máxima (b): 8,7209 | | | | Pendiente mínimo (b): 8,2469 | | |
| Intercepto máximo (a): 0,0039 | | | | Intercepto mínimo (a): -0,0081 | | |
| Coefficiente de Determinación (r²): | | | | ≥0,995 | | |
| LÍMITES | | | | | | |
| | Valor | | | | Unidad | |
| Cuantificación | 0,01 | | | | mg/l | |
| Detección | 0,005 | | | | mg/l | |
| PRECISIÓN, EXACTITUD E INCERTIDUMBRE | | | | | | |
| Niveles de concentración mg/l | Repetibilidad | | Reproducibilidad | | Exactitud % Recuperación | U expandida % U (K=2) |
| | Sr | %CVr | SR | %CVR | | |
| 0,010 | 0,0005 | 5,477 | 0,0005 | 5,484 | 100,00 | 14 |
| 0,010 | 0,0007 | 6,932 | 0,0007 | 6,938 | 102,00 | 17 |
| 0,020 | 0,0010 | 5,025 | 0,0010 | 5,035 | 99,50 | 11 |
| 0,030 | 0,0014 | 4,814 | 0,0014 | 4,814 | 100,33 | 10 |
| 0,030 | 0,0023 | 7,977 | 0,0023 | 7,978 | 100,00 | 16 |
| 0,030 | 0,0018 | 6,111 | 0,0018 | 6,111 | 98,33 | 12 |
| 0,050 | 0,0029 | 5,549 | 0,0029 | 5,549 | 104,88 | 12 |
| 0,500 | 0,0265 | 5,582 | 0,0265 | 5,582 | 94,80 | 11 |
| 3,03 | | | | | 100,00 | |
| OBJETIVOS DE VALIDACIÓN | % SDR < 10% | | | | % R= 80– 115% | U < 30% |
| Rango de Trabajo | 0,01mg/l – 0,5 mg/l | | | | U método | 17 % |

ANEXO B: PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES Y MUESTRAS.



Reactivos

Preparación de soluciones



Preparación de estándares de calibración

Preparación de muestras fortificadas para aguas

ANEXO C: DIGESTIÓN, FILTRACIÓN Y AFORO DE MATRIZ, MUESTRAS FORTIFICADAS Y ESTÁNDARES



Muestras de agua para análisis de laboratorio



Digestión de muestras



Filtración



Aforo

ANEXO D: LECTURA DE MUESTRAS.



Encendido de EAA y Generador de hidruros



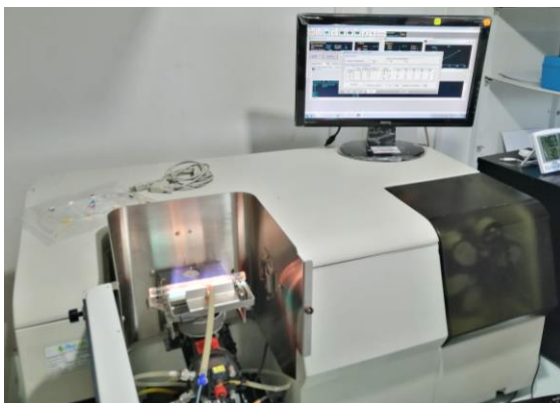
Optimización de operación de equipos



Ingreso de datos de muestras y estándares de calibración a software



Realización de la curva de calibración



Lectura de muestras



Medición

ANEXO E: DETERMINACIÓN DEL SELENIO EN AGUAS ITE-AQLAB-46 (MÉTODO GENERADOR DE HIDRUROS)

INSTRUCTIVO TÉCNICO DE ENSAYO PARA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN AGUAS Y LIXIVIADOS

(Método de generador de hidruros por espectrometría de absorción atómica)
ITE-AQLAB-46

1. OBJETO

Este procedimiento describe la sistemática para la determinación de Selenio en muestras acuosas mediante el método de Generación de Hidruros/Espectrometría de Absorción Atómica. Este procedimiento describe el método para la determinación de selenio total en muestras líquidas tras digestión ácida; así como la determinación de elementos en muestras líquidas mediante espectrometría de absorción atómica (AAS). El método es aplicable al material líquido, recibido en el laboratorio.

2. ALCANCE

Este método Generador de Hidruro por Espectrometría de Absorción Atómica permite determinar Selenio en muestras de aguas de consumo, natural, residual y lixiviado. El rango de trabajo comprende niveles de concentración detallados a continuación:

Selenio: 0,01-0,5 mg/l rango de trabajo

Interferencias.

La absorción atómica del generador de hidruro es susceptible a problemas comunes de interferencia relacionados con el nitrito en la muestra o el cloro libre en el reactivo HCL

Las interferencias son mínimas ya que los hidruros de Selenio se separan de la solución que contiene la mayoría de las sustancias que pueden interferir. Cuando se hacen variar las matrices de ácidos aparecen ligeras variaciones de la respuesta es una interferencia común, pero de difícil diagnóstico. A continuación, se explica los tipos de interferencias:

- Interferencia relacionada con el cloro libre en el reactivo HCL: El cloro libre en ácido clorhídrico es una interferencia común pero difícil de diagnosticar. (la cantidad de cloro varía según el fabricante y con cada lote del mismo fabricante). El cloro oxida el hidruro y puede contaminar el generador de hidruros para evitar recuperaciones bajo cualquier condición.

Para eliminar el cloro libre o cuando se encuentre interferencia: Con cada nueva botella de HCl, preferiblemente antes de usar elimine el cloro de una botella de 2.3 L de HCl conc burbujeando con helio (grado comercial, 100 ml / min) durante 3 h. (eliminación de Cl₂ libre eliminando HCl concentrado con helio como se describe en 3114C.1b)

- Interferencia de agentes reductores y para oxidar compuestos de selenio orgánicos: El exceso de oxidante (peróxido, persulfato o permanganato) proveniente de la digestión de selenio total puede oxidar el hidruro. Siga los procedimientos en la sección 3500-Se.B.2,3, o 4 para asegurar la eliminación de todos los agentes oxidantes antes de la generación de hidruros.
- Interferencia relacionada con el nitrito de la muestra: El nitrito es un componente traza corriente en aguas naturales y residuales y en niveles tan bajos como 10 µm/l, el nitrito puede reducir la recuperación de seleniuro de hidrogeno. Además durante la reducción de Se (VI) a Se (IV) por digestión con HCl (Sección 3500-Se .B.5) parte del nitrato pasa a nitrito, el cual interfiere subsiguientemente.

Cuando se sospecha esta interferencia, añádese sulfanilamida después de la acidificación de la muestra (o digestión por HCL), esta reacción de diazotación entre nitrito y la sulfanilamida elimina por completo el efecto de la interferencia. (es decir, la pendiente de adición estándar es normal)

3. REFERENCIAS

Para la elaboración de este procedimiento de ensayo se han utilizado como referencia los siguientes: PG-AQLAB-01, Procedimiento para la Elaboración de Documentos, Standard Methods for the Examination of water and Wastewater APHA 23th. Edition. 2017. 3030 B, 3114 C. 3114 B - 4d, Norma INEN 1108-2014. Requisitos Para Agua Potable, Norma INEN 2178:2011. Requisitos Para Aguas Minerales Naturales, ROAHE 1215 Parámetros adicionales y límites permisibles para aguas y descargas líquidas en la exploración, producción, industrialización, transporte, almacenamiento y comercialización de hidrocarburos y sus derivados y Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria TULAS

4. GENERAL

4.1 Definiciones

4.1.1. Agua residual

Vertido de agua residual o de líquidos contaminantes al ambiente durante un periodo determinado o permanente.

4.1.2. Agua Tratada

Aguas sometidas a procesos físicos, químicos o bacteriológicos para disminuir la concentración de analitos o establecerlos dentro de márgenes de permisibilidad y tolerancia.

4.1.3. Agua natural

Aquellas cuyas propiedades originales no han sido modificadas por la actividad humana; y se clasifican en: superficiales, subterráneas y meteóricas o atmosféricas.

4.1.4. Lixiviados

Solución que resulta del transporte de agua por los poros y fisuras del suelo u otro medio sólido poroso y las interacciones físico-químicas de esta agua con los componentes minerales y orgánicos del suelo.

4.1.5. Selenio (Se)

Es un elemento químico de número atómico 34, pertenece al grupo 16 de la tabla periódica situado entre los elementos azufre y telurio, es un mineral que posee propiedades físico químicas intermedias entre metal y no metal. En su forma natural es un sólido, de aspecto gris metálico y rara vez se presenta en su estado elemental en la naturaleza.

4.1.6. Metales totales

La concentración de estos metales es determinada en la muestra sin filtrar luego del proceso de digestión o la suma de las concentraciones de fracciones disueltos y en suspensión, tenga en cuenta que los metales totales se definen operacionalmente por el procedimiento de digestión seleccionado.

4.2 Resumen del Método

Este método es aplicable para la determinación de selenio por transformación de los mismos en sus hidruros con reactivo borohidruro sódico y aspiración en un atomizador de absorción atómico de llama de argón-hidrógeno con tubo de cuarzo.

4.3 Toma de muestra, Preservación, Manejo y Almacenamiento.

Una muestra homogénea de un volumen de 500 a 1000 ml, debería ser recogida en una botella de vidrio ámbar. El uso de contenedores plásticos es permitido si se conoce que no están presentes contaminantes orgánicos en los recipientes. Refrigerar todas las muestras a 4°C desde el momento de la toma hasta su previa extracción.

Las muestras contenidas en los recipientes deberán ser bien mezcladas, preferiblemente homogeneizar para obtener alícuotas representativas. Para mayor referencia respecto a la toma de muestra y conservación, consulte el instructivo operativo ITO-AQLAB-01.

La identificación, transporte, manipulación y almacenamiento se lo realizará conforme a lo establecido en el MC-AQLAB-04 y MC-AQLAB-21

5 DESCRIPCION

5.1 Equipos, Materiales y Reactivos

5.1.1. Equipos y materiales

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica, Perkin Elmer 300 EFQ/061
- Lámpara de selenio de Cátodo Hueco Perkin Elmer
- Generador de hidruros Perkin Elmer 100 EFQ/054
- Celda cilíndrica T de cuarzo para el GH
- Digestor TECHICON EFQ/057
- Sistema de extracción de gases.
- Envases plásticos con tapa para almacenar los estándares.
- Embudos de vástago MA/034
- Papel filtro whatman 45 o su equivalente.
- Pipeta volumétrica de 1 ml MV/015
- Pipeta volumétrica de 3 ml MV/017
- Pipeta automática de 1 ml MV/024-03
- Balón aforado de 100 ml MV/005
- Tubos de digestores Kendal MA/019
- Vasos de precipitación 100 ml MA/023
- Gradilla metálica MA/041
- Probeta de 100 ml MV/035
- Piseta de 500 ml

Parámetros instrumentales:

Espectrofotómetro de Absorción Atómica, Perkin Elmer 300

| | |
|--|------------------------------|
| Longitud de onda rango detector | 185-860 nm |
| Longitud de onda de Selenio | 196,0 nm |
| Lámpara de cátodo hueco | Se |
| Combustible: | Acetileno con flujo 9 ml/min |
| Oxidante: | Aire con flujo de 2 ml/min |
| Tipo de llama: | Reductora |
| Flujo combustible (L/min) (Se) | 1,0 |
| Altura mechero (Se) | 16,0 |
| Tiempo de espera de medida (segundos) Se | 100 |
| Corrección de fondo: | Requerido. |

Generador de hidruros Perkin Elmer 100

| | |
|-------------------------------------|-----|
| Velocidad de la bomba (rpm): Se | 30 |
| Velocidad de flujo Gas (mL/min): Se | 120 |

Condiciones estándar para Selenio para técnica de absorción atómica

| Parámetros | Reactivos |
|--|--|
| Longitud de onda 196.0 nm, | Solución portadora 10% (v / v) HCl |
| Tiempo de integración 15 seg. | Agente reductor 0.2% NaBH ₄ en 0.05% NaOH |
| Suavizado de procesamiento de datos: 19 puntos | Solución de muestra Se ⁴⁺ en 10% (v/v) |

Temperatura de celda 900 ° C

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020

5.1.2. Reactivos

Los Reactivos de grado analítico o grado químico de trazas pueden ser empleados en todos los ensayos.

Agua destilada de conductividad inferior a 3 uS/cm.

Ácido nítrico concentrado HNO₃ 68.5% calidad ISO o equivalente. El que hay en laboratorio su pureza es de 68-70% de pureza

Solución HNO₃, 0.5 N Diluir 92 ml de HNO₃ concentrado con a.d. a 2000ml.

Ácido clorhídrico (1:1 v/v): Es el agente portador; el ácido clorhídrico al 10% (v / v). La solución portadora siempre debe contener el mismo ácido que las soluciones de muestra (igual concentración). Preparado a partir de agua destilada y ácido clorhídrico concentrado. Si el blanco es menor al Límite de detección (MDL, siglas en inglés), el ácido puede usarse.

Manipular HCl concentrado bajo una campana extractora. Si es necesario, elimine Cl₂ libre eliminando HCl concentrado con helio como se describe en 3114C.1b: Con cada nueva botella de HCl, elimine el cloro de una botella de 2.3 L de HCl conc burbujeando con helio (grado comercial, 100 ml / min) durante 3 h.

Peróxido de hidrógeno (30%) H₂O₂: El oxidante será analizado para determinar los niveles de impurezas. Si el blanco es menor al MDL, el peróxido puede usarse.

Reactivo de borohidruro: Es el agente reductor: Disuelva NaBH₄ al 0,2% (p / v) en una solución de NaOH al 0,05% (p / v) en 100 mL de agua.

PRECAUCIÓN: el borohidruro de sodio es tóxico, inflamable y corrosivo

Combustible y oxidante: Acetileno de Alta pureza es generalmente aceptable. El aire puede ser suministrado de una línea del compresor, o un cilindro de aire comprimido al cual se le debe limpiar y secar.

Soluciones estándar de Selenio: Solución de pureza muy alta y de grado de absorción atómica, soluciones de selenio grado de absorción atómica, Estas soluciones son de 1000 mg/l. Use el estándar comercialmente disponible; Verifique que el selenio sea Se (IV).

Solución estándar intermedia, 5 mg/l: Diluir 0.5 ml de solución estándar de referencia a 100 ml en un matraz volumétrico con agua destilada.

Solución de sulfanilamida: Prepare una solución al 2.5% (p / v) diariamente; agregue varias gotas de HCl concentrado por solución de 50 ml para facilitar la disolución.

Soluciones estándares de trabajo: Se prepara a partir de la solución patrón de selenio de 100 mg/l, y se realiza las soluciones estándar de trabajo 1 (5mg/l) detallado a continuación:

Para la preparación del estándar de trabajo 1 para el selenio diluya 0.5 ml de la solución patrón (de 1000 mg/l) en una matraz de 100 ml con solución de HNO₃ 0,5 N la concentración de esta solución es de mg/l.:

| Elemento | Volumen (ml) Sol. Patron 1000 mg/l | Concentración (mg/l) Estándar de trabajo 1 | Volumen de aforo (ml) |
|----------|---------------------------------------|---|-----------------------|
| Selenio | 0,5 | 5 | 100 |

Según SM 3114 C debo preparar así:

Para la curva de calibración: 5, 10, 20, 30 y 50 µg/l. Diluir 0.5, 1, 2, 3, y 5 ml de solución estándar de trabajo a 100 ml en matraces volumétricos. Pero; Los estándares deben estar preparados para cubrir el rango lineal del instrumento utilizado (generalmente de 1 a 20 µg/l o 0.001-0.02 mg/l), Preparo así:

| Elemento | Concentración Característica | STD 1 (mg/l) | STD 2 (mg/l) | STD 3 (mg/l) | STD 4 (mg/l) | STD 5 (mg/l) |
|----------|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Selenio | 30 mg/l | 0,005 | 0,010 | 0,02 | 0,03 | 0,05 |

Generador de hidruros: Verifique los caudales con frecuencia para garantizar un flujo constante; Un flujo desigual en cualquier tubería causará una señal errática. Retire los tubos de los rodillos de la bomba cuando no esté en uso:

| Solución | Caudales típicos para generadores según SM |
|---------------------------------|--|
| Acido- Acido Acetilico | 1 ml / min |
| Reductante (Borohidruro) | 1 ml / min |
| Muestra | 7 ml / min |
| Canal de drenaje | |
| Flujo de Argón | 90 ml / min. |

Adecuar la celda en la hornilla del quemador ajustarla y alinearla.

Optimización del generador de hidruro: Condiciones experimentales óptimas obtenidas

| Parámetros para selenio (IV) | Condiciones experimentales | Optimización de parámetros | |
|---------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| | | APHA | FIAS 100 |
| Longitud de onda nm | Se (IV) | 196.0 | 196.0 |
| Ácido | HCL | 6-4 N | --- |
| Dilución | (Patrones y muestras) | 5+1 | 10% (v/v) |
| Flujo ml/min | NaBH ₄ | 1 | 1-3 |
| Concentración de reductor mg/L | (Agente reductor) | 0,6 g NaBH ₄ y 0,5 % NaOH | 0,2 % NaBH ₄ y 0,05 % NaOH |
| Volumen de reductor mL | | 100 | 100 |
| Flujo ml/min | | 1 | 4-7 |
| Concentración de portador mg/L | HCL (Agente portador) | 5+1 | 10 % (v/v) |
| Volumen de portador mL | | 1 | --- |
| Flujo ml/min | | 1 | 9-11 |
| Caudal de gas portador ml/min | Argón | 90 | 50 -130 |
| Presión | | --- | 3.6 bar, 58 psig |
| Caudal de muestra ml/min | | 7 | --- |

Realizado por: Pintado Morocho, Stephanie, 2020

5.1.3. Preparación

Preparación de estándares: curva de calibración

Se prepararán a partir de una solución patrón de selenio (IV) de 1000 mg/l de calidad para Absorción Atómica.

Se preparará los estándares necesarios para la elaboración de la curva de calibración

La preparación de la curva de calibración se hará siguiendo las siguientes recomendaciones:

Llevar hasta los 100 ml utilizando agua que contenga la misma concentración de ácido empleado para la conservación de la muestra (2 a 5 ml de HNO₃ conc./l, sirve para conservación de la muestra)

Los estándares deben estar preparados para cubrir el rango lineal del instrumento utilizado (generalmente de 1 a 20 µg /l).

Preparar fresco todos los días. En todos los casos, los estándares deben llevarse a cabo a través del mismo protocolo de digestión que las muestras para monitorear la efectividad de la digestión

Calculos:

Estándar Madre: 1000 mg/l o ppm

Mi rango de trabajo final sería: Rango de trabajo :0,01 - 0,5 mg/l

- Para estándar de trabajo 1: de 1000 mg/l a 5 mg/l. Se tomó una alícuota de 0,5 ml de solución patrón de selenio y se aforo a 100 ml, dándonos una concentración de estándar intermedio de trabajo de 5 mg/l.

$$C_i * V_i = C_1 * V_1$$

$C_i = 1000 \text{ mg/l}$
 $V_i = 0,5 \text{ ml}$
 $C_1 = ?$
 $V_1 = 100 \text{ ml}$

$$C_1 = \frac{C_i * V_i}{V_2} = \frac{1000 \frac{\text{mg}}{\text{l}} * 0,5 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 5 \text{ mg/l}$$

- Para curva de calibración

Soluciones estándar de trabajo: 5, 10, 20, 30 y 50 $\mu\text{g/l}$

Diluir 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 1 ml de la solución de trabajo 1 y aforar todas a 100 ml, para realizar 5 curvas de calibración. Se realizará 5 curvas de calibración a partir de una solución estándar de trabajo 1, los estándares se prepararon con HCL 3M 10% (v/v)

Trabajo a partir de C1:

$$V_1 = \frac{0,005 \frac{\text{mg}}{\text{l}} * 100 \text{ ml}}{5 \frac{\text{mg}}{\text{l}}} = 0,1 \text{ ml}$$

| Selenio (Se) | | |
|------------------------|--|---|
| Estándar madre: | 1000 ppm | 0,5 mL del estándar madre en un balón de 100 ml y aforar con 0,5 N HNO ₃ . |
| Estándar de trabajo 1: | 5,00 ppm | |
| Std # | Preparación (a partir de std. de trabajo 1) | Concentración (mg/l) |
| Std 1 | 0,10 ml | 0,005 |
| Std 2 | 0,20 ml | 0,010 |
| Std 3 | 0,40 ml | 0,020 |
| Std 4 | 0,60 ml | 0,030 |
| Std 5 | 1 ml | 0,050 |

5.2. Condiciones Ambientales.

Las condiciones óptimas de operación recomendadas son:

Temperatura: $\leq 35^\circ\text{C}$

Humedad: $\leq 85\% \text{ HR}$

Las condiciones óptimas de operación para el uso del espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer 300 son:

Temperatura: 21°C

Humedad relativa: 40 % NC

Las condiciones óptimas de operación para el uso del Generador de hidruros Perkin Elmer 100 (ver ITU-AQLAB-46)

5.3. Realización

5.3.1. Procedimientos preliminares

Siempre es necesario el tratamiento preliminar de muestras acuosas debido a su complejidad y variabilidad de las matrices. Debido a que las muestras de agua pueden contener sólidos y material suspendido que podrían sujetarse a proceso de estabilización antes del análisis. Estos procedimientos pueden variar debido a la naturaleza de las muestras.

Todos los ensayos mediante absorción atómica deberán ser ejecutados usando una adecuada forma de corrección del fondo. Generalmente se utilizará una lámpara de arco de deuterio, cuando la longitud de onda a la cual se trabaje este por debajo de los 240 nm.

En general, luego de escoger la lámpara adecuada para el análisis, permita que la lámpara se caliente por unos 15 a 45 minutos.

Durante este periodo, centrar el mechero, posicionar el monocromador a la longitud de onda correcto, seleccione la abertura adecuada del monocromador (slit), y haga los ajustes necesarios según las recomendaciones del fabricante del equipo.

Regule la luz de la llama y el flujo del combustible y oxidante. Ajuste el mechero y el flujo del nebulizador hasta el porcentaje máximo de absorción y estabilidad.

Construya la curva de calibración del elemento por lo menos utilizando 5 estándares de diferente concentración (Abs vs [concentración]) verificar la curva con un estándar preparado de otro lote o preparado nuevamente por otro analista a su vez con MR.

Aspire la muestra y determine la concentración mediante la curva de calibración. Los estándares deberán medirse cada vez que se analice un conjunto de muestras.

Realizar un lavado previo del generador de hidruros Perkin Elmer 100, pasando agua por unos 15 minutos, verificar que la manguera con distinción roja este en la solución reductante (boro hidruro) y la manguera azul en la solución acida (HCL 10% v/v).

Ajustar los tubos en la bomba peristáltica que se utilizan para medir y mezclar reactivos y soluciones de muestra. Verificar que los volúmenes de absorción sean los adecuados.

5.3.2. Tratamiento preliminar de muestras

Antes de la medición, se deberá dejar que se estabilicen a temperatura ambiente tanto la muestra como los materiales de referencia y el blanco. El equipo de absorción atómica Perkin Elmer 300 deberá ser operado según lo señala el instructivo ITU-AQLAB-04

Las muestras que contienen partículas o material orgánico generalmente requieren un tratamiento previo antes del análisis espectroscópico.

"Metales totales" incluye todos los metales, unidos inorgánica y orgánicamente, tanto disueltos como particulados.

Digerir todas las demás muestras antes de determinar los metales totales. El conservante HNO₃ conc debe estar presente en la botella de muestra durante al menos 16 h antes de retirar la porción para la digestión

Agua potable: Muestras transparentes e incoloras con una turbidez de <1 NTU, sin olor y monofásica se pueden analizar directamente mediante espectrometría de absorción atómica (llama o vaporización electrotérmica) metales totales sin digestión.

Para una verificación adicional o si se encuentran cambios en las matrices existentes, compare las muestras digeridas y no digeridas para garantizar resultados comparables. En la recolección, acidifique dichas muestras a pH <2 con ácido nítrico concentrado (1,5 ml de HNO₃/l generalmente es adecuado para el agua potable) y analice directamente

Cuidados preliminares: Tenga cuidado de no introducir metales en las muestras durante el tratamiento preliminar. Durante el pretratamiento evite el contacto con caucho, pinturas a base de metal, humo de cigarrillo, pañuelos de papel y todos los productos metálicos, incluidos los de acero inoxidable, metal galvanizado y latón.

Las campanas de extracción de gases convencionales pueden contribuir significativamente a la contaminación de la muestra, particularmente durante la digestión ácida en contenedores abiertos. Mantenga los recipientes cubiertos con anteojos de reloj y aleje las bocas del aire entrante para reducir la contaminación del aire.

Las puntas de pipeta de plástico a menudo están contaminadas con cobre, hierro, zinc y cadmio; antes de usar remojar en HCl o HNO₃ durante varios días y enjuagar con agua desionizada. Evite el uso de plásticos de colores, que pueden contener metales. Use recipientes de plástico certificados sin metal y puntas de pipetas cuando sea posible. Evite usar vidrio si analiza aluminio o sílice.

Filtración preliminar

Filtre la muestra al momento de la recolección utilizando un dispositivo de filtrado de plástico preacondicionado con vacío o presión, que contenga un soporte de filtro de plástico o fluorocarbono, a través de un filtro de membrana de 0,45 µm de poro diámetro (ésteres de policarbonato o celulosa).

Antes de usar, filtre una pieza en bruto compuesta de agua sin metal (desionizada) para garantizar que no se contamine.

Precondicione el filtro y el dispositivo de filtro enjuagándolos con 50 ml de agua desionizada. Si el blanco del filtro contiene concentraciones significativas de metales, remoje los filtros de membrana en aproximadamente 0.5 N HCl o 1N HNO₃ y enjuague con agua desionizada antes de usar.

Después de la filtración, acidifique el filtrado a pH 2 con HNO₃ concentrado y almacene hasta que se puedan realizar los análisis. Si se forma un precipitado en la acidificación, digiera el filtrado acidificado antes del análisis como se indica (ver 3030E leer abajo). Retener el filtro y digerirlo para la determinación directa de metales en suspensión.

Si no es posible filtrar la muestra en el campo sin contaminarla, obtenga la muestra en una botella "sin preservar" como se indicó anteriormente y enfríe rápidamente a 4 ° C. No conservar en ácido la muestra. Luego, sin demora, filtre la

muestra bajo condiciones más limpias en el laboratorio.

Pruebe el pH de una porción de muestra acuosa al recibirla en el laboratorio para asegurarse de que la muestra se haya filtrado correctamente y se haya conservado con ácido.

Si se van a determinar metales suspendidos (consulte la Sección 3010A.3), filtre la muestra como se indica arriba para metales disueltos, pero no centrifugue antes de la filtración. Retener el filtro y digerirlo para la determinación directa de metales en suspensión. Registre el volumen de muestra filtrado e incluya un filtro en la determinación del blanco.

Digestión para metales:

El ácido clorhídrico digiere la mayoría de las muestras adecuadamente. También el HNO_3 El nitrato es una matriz aceptable para la absorción atómica. El HNO_3 solo es adecuado para muestras limpias o materiales fácilmente oxidable.

10 % (v/v) HCL 1:1 ---- FIAS para estándares y muestras
4-6 N HCL 5+1-----APHA-3114 B para reducir Se (VI) a Se (IV)

La reducción depende de la T° , tiempo de reducción y concentración de HCL con:

4N x 1h a 100°C
6N x 10 min ebullición

Conservación de muestra con ácido nítrico concentrado (HNO_3) --APHA

PROCESO 1

4d. Preparación de las muestras y estándares de Selenio Total

1. Agregue 50 ml de muestra no digerida o estándar a un vaso de precipitados Berzelius de 200 ml o al matraz microkjeldahl de 100 ml.

2. Adicione 1 ml Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2,5 N, y 5 ml de Persulfato de Potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) al 5 por 100.

Preparación:

H_2SO_4 2.5 N: con cuidado añada 3 ml de H_2SO_4 conc. A aproximadamente 400 ml de agua, déjese enfriar y ajústese el volumen a 500 ml

$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ al 5%.: Disuelva 25 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ en agua y diluyase hasta 500 ml. Conservar en un vaso y refrigerar, preparar semanalmente

3. Llevar a ebullición suave sobre placa caliente precalentada durante aproximadamente 30 a 40 minutos, hasta que se alcance un volumen final de 10 mL.

Alternativamente, caliente en una autoclave a 121°C durante 1 h en recipientes tapados (recipientes con tapón). No dejar que se seque la muestra, después de la digestión dilúyase hasta 30 ml en un balón de aforo para las medidas de selenio.

4. Filtrar la muestra para eliminar sólidos presentes o cualquier partícula que pueda afectar a la medición.

Monitoree la efectividad o el rendimiento de la digestión midiendo la recuperación de Se

Sígase la efectividad del procedimiento de digestión utilizado por adición de 5 ml de una solución de selenio estándar a una muestra de 50 ml y midiendo la recuperación, llevando los estándares y la muestra con adición conocida a través de todo el procedimiento.

Para informar el arsénico total recuperable como arsénico total, las recuperaciones promedio de ácido cacodílico deben exceder el 80%. Alternativamente, utilícese matraces microkjeldahl de 100 ml para la digestión del selenio recuperables en total, con lo que mejora la eficacia de la digestión

Si se obtiene una recuperación deficiente de arsénico agregado como ácido cacodílico, vuelva a analizar usando el doble de la cantidad de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$

Para el análisis de ambos elementos en una sola muestra, aumente el volumen de la muestra a 100 ml y duplique los volúmenes de ácidos utilizados en la digestión. Ajustar el volumen final de digestato a 100 ml. Use 50 ml para las determinaciones de As y 30 ml para las determinaciones de Se, haciendo correcciones de volumen apropiadas para calcular los resultados.

PROCESO 2 (Alternativo) 3500 Se. B

B.2. Eliminación de interferencias por digestión con persulfato: La digestión con persulfato de amonio es adecuada para aguas subterráneas, agua potable y agua superficial filtrada, para determinar el selenio total en agua filtrada y es una matriz aceptable para la absorción atómica. Para la determinación del selenio total se realiza:

1. Reducción del Se (VI) a Se (IV) por digestión con ácido clorhídrico (3500 Se B 5)

2. Agregue 0.2 ml de solución de persulfato a la muestra mezclada y HCL del 3500-Se.B.5c

Prepare una solución de persulfato de potasio o amonio al 2% disolviendo (prepárelo semanalmente): 2.0 g de persulfato de potasio en 100 ml de agua desionizada

HCl de 3500-Se.B.5c Antes de calentar y proceder con el pretratamiento y análisis.

5c. Procedimiento: Calibre el dispensador de ácido con agua. Precalentar a baño de agua.

1. Pipetee 5 ml de muestra filtrada en un tubo de cultivo. Añadir 5 ml de HCl conc. Tapar el tubo sin apretar (no apretar) y colocar en baño de agua hirviendo durante 20 min.
2. Deje que el tubo se enfríe y apriete la tapa.
3. Determine el Se (IV) total por los Métodos 3114B. Agregue 0.200 ml de solución de adiciones con una pipeta de microlitro a muestra y proceda como se indica arriba.

Analizar un blanco de agua desionizada y un espacio en blanco con la adición para garantizar la ausencia de contaminación y para determinar el verdadero valor de la suma.

4. Multiplicar la concentración de selenio determinada en el ácido muestra por 2.00 para obtener la concentración total de Se (IV) +Se (VI).

Después de completar el análisis, multiplique la concentración de selenio determinada en la muestra acidificada por 2.04 para obtener el selenio total en la muestra original

5.4. Calibración y estandarización

Vea sección de PEE-AQLAB-06 para mayor detalle.

Los estándares de calibración preparados nos permitirán obtener una curva de calibración, relacionando Absorbancia versus concentración.

5.5. Condiciones de funcionamiento

Revisar y seguir las indicaciones del instructivo ITU-AQLAB-04 y ITU-AQLAB-46

5.6. Cálculos

Para la determinación de la concentración del metal, lea la concentración directamente de la curva de calibración o del protocolo que entrega el equipo que ya tiene un software incluido.

Si una dilución fue realizada, calcule la concentración en base a la ecuación siguiente:

$$\text{mg/l metal: } A*(B+C)/C$$

Donde:

A = mg/l del metal en la alícuota diluida de la curva de calibración.

B = Volumen añadido del disolvente (matriz similar), ml.

C = Volumen inicial de muestra., ml.

En el caso del equipo AAS Thermo ICE 3000 el software le permite realizar la dilución directamente incluyendo la dilución. El resultado del equipo sale directamente en mg/l

5.7. Medición de las muestras

Una vez que la muestra esté preparada se debe verificar que la curva de calibración este realizaba y cumpla con los criterios de aceptación y rechazo; el tubo de manguera ubicado en la parte final de la T de cuarzo introducirlo en la muestra y esperar 3 segundos que este se homogenice para proceder a dar lectura en el monitor del equipo.

Se debe realizar una medición a un blanco, un estándar control que este dentro de la curva del elemento a ser analizado y proseguir con el lote de muestras

5.8. Preparación de la curva de calibración

A partir de un patrón de 1000 mg/l para el elemento se preparará los estándares necesarios para la elaboración

5.9. Tratamientos de resultados

El espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer 300 presenta los resultados directamente en unidades de mg/l, los resultados serán reportado considerando el factor de dilución si aplica, en el protocolo ITE3301-01. Formato para la determinación de los metales Pesados en Aguas y Lixiviados. Los resultados de los análisis serán expresados con dos cifras decimales. El cálculo de la incertidumbre de la medición se realizará en base al PG-AQLAB-06.

5.10. Medidas de seguridad.

Todo reactivo, muestra, solución o cualquier material deberá estar claramente identificado de acuerdo con las políticas de registros que el laboratorio establezca.

Lavarse las manos antes y después de cada operación. Se procuraran de estar libres de cortes y en su caso, se usará un apósito y guantes para evitar la contaminación o la penetración de cualquier sustancia.

Tomar en cuenta las medidas de seguridad y elementos de protección personal para trabajar con el equipo de absorción atómica y generador de hidruros.

De igual forma proceder con protección personal para el manejo de reactivos como en el caso del ácido nítrico, ácido clorhídrico y vapores que se emiten en la digestión y generación de hidruros.

Se recomienda el trabajo con equipos de protección personal.

Al disolver el borohidruro de sodio trabajar debajo de un extractor de olores.

Los residuos deben recogerse en recipientes plásticos para desechos de metales pesados.

-Al terminar el análisis de Se, el Generador de Hidruros se debe dejar aspirar agua por aproximadamente 10 minutos, luego por 5 minutos aspirar aire, para evitar el taponamiento y corrosión de la bomba.

5.11. Control de Calidad

Todos los datos del control de calidad se realizan según el plan de aseguramiento de la calidad MC2101-01 y deberán ser obtenidos y disponibles para fácil referencia o acceso.

Para cada lote de muestras procesadas, por lo menos un blanco debe ser incluido durante todo el proceso de preparación de la muestra y del proceso analítico.

En cada lote muestras se verificará la respuesta del equipo con la medición de material de referencia o patrón de preferencia de otro lote o preparado nuevamente.

Para Selenio std 0,003 ppm \pm 16 %

Se realizará curva de calibración cada lectura de analito y se verificará que la pendiente este entre el valor máximo y mínimo calculado en la validación del método y con una aceptación del coeficiente de correlación $R \geq 0.99$, en caso de no cumplir las condiciones se repetirá la curva.

Mensualmente se realizarán gráficos de control estadístico en los cuales se verificará los materiales de referencia medidos y si se encuentran en control o tienen alguna tendencia. En caso de no cumplir con este criterio se procederá como un trabajo No conforme según MC-AQLAB-09.

5.12. Criterios de aceptación rechazo

Cada análisis se realizarán duplicados de las muestras con una aceptación de margen de variación detallado a continuación, este criterio será para todo el rango de trabajo y se registra en ITE4601, se gráfica en una carta de control, caso contrario se prepara un nuevo estándar y si no cumple se realiza una nueva curva de calibración.

El criterio de aceptación y rechazo del estándar control y duplicados en todo el rango se detallan a continuación para cada selenio y se registrarán en el formato ITE4601.

| Parámetro | Estándar control (mg/L) | Aceptación rechazo | % Criterio de Duplicados |
|-------------|-------------------------|--------------------|--------------------------|
| Selenio, Se | 0,030 | \pm 0,003 | 16 % |

El porcentaje de recuperación para todo el rango de trabajo tanto en estándar y matriz son:

| Parámetro | % Recuperación |
|-------------|----------------|
| Selenio, Se | 16 % |

Los Criterios de Aceptación y rechazo de las curvas de calibración son:

| Parámetro | Pendiente | | Intercepto | |
|-------------|-----------|--------|------------|----------|
| | Máximo | Mínimo | Máximo | Mínimo |
| Selenio, Se | 8,7209 | 8,2469 | 0,0039 | -0,0081. |

5. Anexos

ITE4601 Formato para la Determinación de Metales pesados en Aguas y Lixiviados

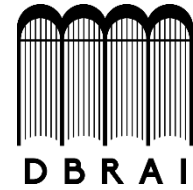
Anexo 1. Condiciones Recomendadas para la concentración Característica

| Item | Metal | Control de Sensibilidad (mg/l) | Concentración Característica (mg/l) comparación | ABS (Equipo) | Concentración Característica (mg/l) Medida | % Recuperación |
|----------------------|---------------------------|--------------------------------|---|----------------------|--|----------------|
| 1 | SELENIO Se, 196,0nm | 30,0 | 0,59 | 0,976 | 0,59 | 100,0 |
| | | | 0,59 | 0,991 | 0,531 | 90,00 |
| | | | 0,59 | 0,946 | 0,649 | 110,0 |
| ABS OPTIMA CC | | ABS MINIMA CC | | ABS MAXIMA CC | | |

Anexo 2. Preparación de estándares para curvas de calibración





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE
CHIMBORAZO
DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS
PARA EL APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN



UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y
BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 26 / 11 / 2020

| |
|---|
| INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S) |
| Nombres – Apellidos: Stephanie Elizabeth Pintado Morocho |
| INFORMACIÓN INSTITUCIONAL |
| Facultad: Ciencias |
| Carrera: Ingeniería en Biotecnología Ambiental |
| Título a optar: Ingeniera en Biotecnología Ambiental |
| f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. CPA. Jhonatan Rodrigo Parreño Uquillas. MBA. |
|  Firmado electrónicamente por: JHONATAN RODRIGO PARREÑO UQUILLAS |
|  |
| 26-11-2020 0436-DBRAI-UPT-2020 |