

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE INGENIERÍA
LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL

"VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN AGUAS RESIDUALES POR MEDIO DE ESPECTROFOTOMETRÍA CON TÉCNICA DE VAPOR EN FRÍO"

TESIS DE GRADO

RODOLFO ANDRÉS JUÁREZ MEJÍA

CARNET 11273-13

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, OCTUBRE DE 2018
CAMPUS CENTRAL

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE INGENIERÍA
LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL

"VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN AGUAS RESIDUALES POR MEDIO DE ESPECTROFOTOMETRÍA CON TÉCNICA DE VAPOR EN FRÍO"

TESIS DE GRADO

TRABAJO PRESENTADO AL CONSEJO DE LA FACULTAD DE
INGENIERÍA

POR
RODOLFO ANDRÉS JUÁREZ MEJÍA

PREVIO A CONFERÍRSELE

EL TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO INDUSTRIAL EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADO

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, OCTUBRE DE 2018
CAMPUS CENTRAL

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR

RECTOR: P. MARCO TULIO MARTINEZ SALAZAR, S. J.

VICERRECTORA ACADÉMICA: DRA. MARTA LUCRECIA MÉNDEZ GONZÁLEZ DE PENEDO

VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y PROYECCIÓN: ING. JOSÉ JUVENTINO GÁLVEZ RUANO

VICERRECTOR DE INTEGRACIÓN UNIVERSITARIA: P. JULIO ENRIQUE MOREIRA CHAVARRÍA, S. J.

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO: LIC. ARIEL RIVERA IRÍAS

SECRETARIA GENERAL: LIC. FABIOLA DE LA LUZ PADILLA BELTRANENA DE LORENZANA

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA

DECANA: MGTR. KAREN GABRIELA MORALES HERRERA DE ZUNIGA

VICEDECANO: MGTR. OSMAN CARRILLO SOTO

SECRETARIA: MGTR. MARYA ALEJANDRA ORTIZ PATZAN

DIRECTOR DE CARRERA: DR. MARIO RENE SANTIZO CALDERON

NOMBRE DEL ASESOR DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

ING. LUISA MARÍA ARIAS GONZÁLEZ

TERNA QUE PRACTICÓ LA EVALUACIÓN

MGTR. ANNA MARGARITA RIOS GONZALEZ

MGTR. MIRIAM ESTELA CHAVEZ RAMIREZ

ING. JOSÉ ANGEL LOPEZ RUANO

Guatemala, 24 de agosto 2018

Mgtr. Marya Alejandra Ortiz
Secretaria de Facultad
Facultad de Ingeniería

Estimada Mgtr. Ortiz:

Por este medio es un gusto saludarla y desearle éxitos en sus labores diarias.

El motivo de la presente es para informarle que he revisado el informe final del trabajo de graduación titulado: **"VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN AGUAS RESIDUALES POR MEDIO DE ESPECTROFOTOMETRÍA CON TÉCNICA DE VAPOR EN FRÍO."** Del estudiante Rodolfo Andrés Juárez Mejía, quien se identifica con número de carnet 11273-13.

Después de haber revisado el informe final y de acuerdo con los requerimientos establecidos por la Facultad de Ingeniería de la Universidad Rafael Landívar doy como aprobado dicho trabajo de graduación.

Sin otro particular, me suscribo de usted.

Atentamente,



Ing. Luisa María Arias González
Asesor de Tesis



Orden de Impresión

De acuerdo a la aprobación de la Evaluación del Trabajo de Graduación en la variante Tesis de Grado del estudiante RODOLFO ANDRÉS JUÁREZ MEJÍA, Carnet 11273-13 en la carrera LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL, del Campus Central, que consta en el Acta No. 02259-2018 de fecha 9 de octubre de 2018, se autoriza la impresión digital del trabajo titulado:

"VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN AGUAS RESIDUALES POR MEDIO DE ESPECTROFOTOMETRÍA CON TÉCNICA DE VAPOR EN FRÍO"

Previo a conferírsele el título de INGENIERO QUÍMICO INDUSTRIAL en el grado académico de LICENCIADO.

Dado en la ciudad de Guatemala de la Asunción, a los 26 días del mes de octubre del año 2018.

MGTR. MARYA ALEJANDRA ORTIZ PATZAN, SECRETARIA
INGENIERÍA
Universidad Rafael Landívar



Agradecimientos

A Dios por estar siempre a mi lado guiándome por el camino correcto, por darme fuerza y perseverancia para pasar cada obstáculo en este trayecto, por poner en mi vida a personas tan maravillosas y permitirme alcanzar una meta más.

Al Colegio San José de los Infantes, por ser la base de mi educación, por confiar en mí y brindarme la oportunidad de continuar mis estudios superiores en la Universidad Rafael Landívar.

A la Universidad Rafael Landívar y a los catedráticos que me acompañaron en este trayecto, por brindarme los conocimientos y herramientas necesarias para desempeñarme como un profesional de éxito.

A mi asesora Ing. Luisa Arias por todo su aporte, asesoría y acompañamiento.

A Patricia Juárez, mi madre y amiga por su amor, entrega y confianza en mí, por siempre apoyarme y no dejarme caer, y sobre todo por ser mi motor de superación.

A Andrés Morataya, por demostrarme que nada es fácil en la vida, pero aquel que se esfuerza por lo que quiere y anhela lo alcanzará. Gracias por siempre extenderme la mano en esos momentos que tanto necesité.

A mis hermanas, por siempre su apoyo, cariño y compañía.

A mis amigos por todos los buenos momentos vividos y por darme siempre todo su apoyo, palabras y cariño en los buenos y malos momentos.

A la familia Ruiz Martínez, por su paciencia, cariño, confianza y apoyo.

Dedicatoria

A Dios, por ser la luz que ilumina mi camino y me permite alcanzar mis sueños.

A la Virgen María, San José y San Judas Tadeo, escucharme e interceder por mí y por mi familia.

A Oscar Rodolfo Juárez López (QEPD), por ser mi mayor motivación, por ser ejemplo para mí, por amarme tanto y por ser mi guía en el corto tiempo que tuvimos juntos. Estoy orgulloso de cumplir la promesa que te hice.

A mi familia, mis padres Patricia y Andrés, por ayudarme a cumplir mis sueños, por apoyar mis decisiones, por nunca dejarme caer y ser un ejemplo de vida para mí. A Fernanda y Ximena, por su cariño y muestras de apoyo en este trayecto.

A Fernando Mérida (QEPD), porque este logro alcanzado también es tuyo.

A mis amigos, por acompañarme en este corto camino, por todo el apoyo y por los buenos momentos vividos.

A Gabriela María, por ser un ángel en mi vida. Por ser mi novia, mejor amiga, consejera, por acompañarme en este trayecto de mi vida. Gracias por siempre estar ahí para mí, por cada momento vivido y por ese amor incondicional que me demuestras cada día. Confío en Dios que será el primero de muchos logros juntos.

Resumen ejecutivo

El presente estudio se realizó con el objetivo de verificar un método analítico para la cuantificación de mercurio en aguas residuales, utilizando un espectrofotómetro UV y la técnica de vapor en frío. Debido a que el método que se utilizó de referencia sufrió una variación menor al cambiar el espectrofotómetro UV. Por otro lado, se determinó la incertidumbre del método para después comprobar su confiabilidad mediante el análisis de una muestra problema.

Para ello se utilizó una solución estándar de referencia con una concentración de $1000 \pm 10 \mu\text{g/L}$, la cual fue diluida hasta $0.1 \mu\text{g/L}$. Para verificar el método se establecieron los siguientes parámetros de desempeño: linealidad, rango, límite de cuantificación, límite de detección, precisión, exactitud e incertidumbre.

Se estableció que el método para la cuantificación de mercurio en aguas residuales es un método lineal en un rango de $0.119 \mu\text{g/L}$ a $3.000 \mu\text{g/L}$, con un coeficiente de determinación de 0.9977 , con un límite de detección de $0.039 \mu\text{g/L}$ y un límite de cuantificación de $0.119 \mu\text{g/L}$. Además, se determinó que es un método preciso y exacto, con un coeficiente de variación de 1.70% .

Se determinó que el método para la cuantificación de mercurio tiene una incertidumbre combinada de $\pm 0.033 \mu\text{g/L}$, y expandida de $\pm 0.066 \mu\text{g/L}$.

Por último, se analizó una muestra problema con una concentración de $1.000 \mu\text{g/L}$, obteniendo una media de $0.994 \mu\text{g/L}$ y una desviación estándar de $\pm 0.0169 \mu\text{g/L}$. El cual es un resultado aceptable de acuerdo con la variación permitida.

Descriptor: verificación, parámetros de desempeño, método, mercurio, estándar de referencia, vapor en frío.

Índice general

Contenido	Pág.
I. Introducción	1
1.1. Lo escrito sobre el tema.....	2
1.2. Marco Teórico	4
1.2.1. Validación.....	4
1.2.2. Verificación.....	4
1.2.3. Diferencia entre validación y verificación.	4
1.2.4. Métodos normalizados	5
1.2.5. Métodos no normalizados	6
1.2.6. Métodos desarrollados en laboratorio	6
1.2.7. Parámetros de desempeño	6
1.2.8. Aguas residuales.....	13
1.2.9. Normas guatemaltecas	14
1.2.10. Metales pesados.....	15
1.2.11. Generalidad del mercurio.....	16
1.2.12. Fuentes de exposición y toxicología del mercurio	17
1.2.13. Ciclo natural del mercurio	19
1.2.14. Ciclo antropogénico del mercurio.....	19
1.2.15. Digestión de muestras	20
1.2.16. Espectrofotometría Ultravioleta Visible	20
1.2.17. Absorbancia.....	20
1.2.18. Resumen de la metodología de análisis.	21
1.2.19. Detalles generales del método	21
1.2.20. Interferentes del método	22
II. Planteamiento del Problema	23
2.1. Objetivos	24
2.1.1. Objetivo general	24
2.1.2. Objetivos específicos	24

2.2. Hipótesis	24
2.2.1. Hipótesis nula.....	24
2.2.2. Hipótesis alterna	24
2.3. Variables	25
2.3.1. Variables independientes.....	25
2.3.2. Variables dependientes.....	25
2.4. Definición de las variables	25
2.4.1. Variables independientes.....	25
2.4.2. Variables dependientes.....	25
2.5. Alcances y límites	28
2.5.1. Alcances.....	28
2.5.2. Límites.....	28
2.6. Aporte	29
III. Método	30
3.1. Sujetos y unidades de análisis	30
3.1.1. Sujetos	30
3.1.2. Unidades de análisis	30
3.2. Instrumentos	31
3.3. Procedimiento	35
3.3.1. Metodología de análisis	35
3.4. Diseño y metodología estadística	40
3.4.1. Diseño experimental	40
3.4.2. Descripción de las unidades experimentales	41
3.4.3. Variable respuesta	41
3.4.4. Metodología de análisis	41
IV. Presentación y Análisis de Resultados	47
4.1. Linealidad del método	47
4.2. Límite de detección y límite de cuantificación	48
4.3. Rango del método	48
4.4. Precisión del método	49
4.5. Exactitud del método	49
4.6. Incertidumbre del método	50

4.7. Muestra problema	52
V. Discusión de Resultados	53
VI. Conclusiones	58
VII. Recomendaciones	59
VIII. Referencias	60
IX. Anexos	63
9.1. Glosario	63
9.2. Anexo A. Datos recolectados y clasificados.	64
9.3. Anexo B1 Muestra de cálculo.	67
9.4. Anexo C. Tabla utilizada para prueba t-Student.	73
9.5. Anexo D. Diagrama de flujo para el proceso de verificación	74
9.6. Anexo E. Tabla guía para la selección de parámetros de desempeño.	75
9.7. Anexo F. Ilustración del equipo para utilizado para reacción de vapor en frío.	76
9.8. Anexo G. Ilustración real del equipo para reacción de vapor en frío.	77
9.9. Anexo H. Ilustraciones de la fase 1 del método: Digestión de muestra.	78
9.10. Anexo I. Método 10065 de HACH verificado.	81

Índice de tablas

Contenido	Pág.
<i>Tabla 1. Interferentes de la solución matriz.</i>	22
<i>Tabla 2. Equipos utilizados.</i>	31
<i>Tabla 3. Instrumentos de laboratorio utilizados.</i>	32
<i>Tabla 4. Utensilios utilizados.</i>	33
<i>Tabla 5. Reactivos utilizados en la metodología.</i>	34
<i>Tabla 6. Detalle de experimentos realizados.</i>	40
<i>Tabla 7. Datos experimentales de linealidad.</i>	47
<i>Tabla 8. Datos experimentales promedio de linealidad.</i>	47
<i>Tabla 9. Límites del método.</i>	48
<i>Tabla 10. Límite inferior y superior.</i>	48
<i>Tabla 11. Repetibilidad del método.</i>	49
<i>Tabla 12. Exactitud y sesgo.</i>	49
<i>Tabla 13. Incertidumbres.</i>	50
<i>Tabla 14. Datos obtenidos del análisis de muestra problema.</i>	52
<i>Tabla 15. Análisis ANOVA para la concentración experimental obtenida en función de la concentración teórica esperada.</i>	52
<i>Tabla 16. Datos de primera corrida para la determinación de linealidad.</i>	64
<i>Tabla 17. Datos de segunda corrida para la determinación de linealidad.</i>	65
<i>Tabla 18. Datos originales para la determinación de los límites del método.</i>	66
<i>Tabla 19. Datos originales para la determinación de la precisión y exactitud.</i>	66
<i>Tabla 20. Media de datos de la linealidad del método.</i>	71
<i>Tabla 21. Datos calculados para la determinación de los límites.</i>	72
<i>Tabla 22. Datos calculados para la determinación de precisión y sesgo.</i>	72
<i>Tabla 23. Datos calculados para la determinación de incertidumbre.</i>	72

Índice de ilustraciones

Contenido	Pág.
<i>Figura 1. Ejemplo de una curva de respuesta en donde se destacan algunas características de desempeño: Intervalo lineal, intervalo de trabajo, sensibilidad analítica, LOD y LOQ.</i>	9
<i>Figura 2. Ejemplificación gráfica del término exactitud.</i>	10
<i>Figura 3. Tabla del Acuerdo Gubernativo 236-2006 con los parámetros establecidos para el control de las aguas residuales.</i>	15
<i>Figura 4. Resumen de las fuentes de exposición al mercurio.....</i>	17
<i>Figura 5. Demostración gráfica de bioacumulación y Biomagnificación.</i>	19
<i>Figura 6. Ilustración de cristalería utilizada para reacción de vapor en frío.</i>	76
<i>Figura 7. Cristalería utilizada para la reacción de vapor en frío.....</i>	77
<i>Figura 8. Muestra real previa a su digestión.</i>	78
<i>Figura 9. Muestra real en proceso de digestión.</i>	79
<i>Figura 10. Muestra real, finalización del proceso de digestión.</i>	80

Índice de diagramas

Contenido	Pág.
<i>Diagrama 1. Proceso de digestión de la muestra.</i>	35
<i>Diagrama 2. Proceso de reacción vapor en frío.....</i>	36
<i>Diagrama 3. Reacción final y lectura en espectro UV.....</i>	37
<i>Diagrama 4. Método de análisis de solución estándar.....</i>	38
<i>Diagrama 5. Método de preparación de estándar 0.1 mg/L a partir de 1000 mg/L.....</i>	39
<i>Diagrama 6. Curva de calibración del método.</i>	48
<i>Diagrama 7. Ishikawa para evaluar las posibles fuentes de incertidumbre.....</i>	51
<i>Diagrama 8. Curva de calibración de datos primera corrida de linealidad.....</i>	64
<i>Diagrama 9. Curva de calibración de datos segunda corrida de linealidad.</i>	65
<i>Diagrama 10. Valores para prueba t-Student.</i>	73
<i>Diagrama 11. Diagrama de flujo para establecer el proceso de verificación.</i>	74
<i>Diagrama 12. Guía para la selección de parámetros de desempeño.</i>	75

I. Introducción

El agua es uno de los recursos más importantes y empleados a nivel industrial, ya sea como utilitario o como materia prima. Las aguas que ya han sido utilizadas se convierten en aguas residuales, y contienen contaminantes orgánicos e inorgánicos que ocasionan un impacto negativo en el ambiente al ser descartadas en cuerpos receptores sin un tratamiento previo. Por tal razón, en Guatemala se creó el Acuerdo Gubernativo 236-2006 el cual tiene como objetivo regular la descarga de las aguas residuales que incluye parámetros que deben medirse, así como sus límites permitidos.

Los parámetros establecidos son evaluados por las industrias mediante análisis de laboratorios ambientales, para verificar que su descarga cumple con los requisitos del acuerdo. Los métodos analíticos utilizados a nivel laboratorio deben ser confiables y adecuados para la aplicación que se establecieron, por lo cual, tiene que ser validados o verificados según el tipo de método (normalizado, no normalizado o creados e implementados).

La ISO/IEC 17025:2005, establece que un laboratorio debe confirmar que puede operar adecuadamente los métodos normalizados y no normalizados antes de introducir los ensayos o calibraciones.

En el presente estudio se verifica el método 10065-2010 de HACH, el cual es un método específico para la cuantificación de mercurio en aguas residuales. Este se divide en tres fases: la primera fase consiste en una digestión, en la segunda fase se ejecuta la técnica de vapor en frío, y en la tercera fase se realiza la lectura por medio de un espectrofotómetro UV.

Para la verificación se establecieron los siguientes parámetros de desempeño: linealidad, rango, límite de cuantificación, límite de detección, precisión y exactitud. Además, se identificaron las posibles fuentes de incertidumbre y se determinó el valor de la incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida del método. Por último, se comprobó la confiabilidad del método mediante el análisis de una muestra problema. Se realizó la verificación del método debido a la necesidad de implementar el mismo en el laboratorio privado en donde se realizó esta investigación.

El estudio información para los laboratorios ambientalistas aporta, el sector educativo e industrial y para las personas interesadas y especializadas en el análisis de aguas residuales. Presentando un método verificado para la cuantificación de mercurio con un rango de medición de 0.119 a 3.000 µg/L.

1.1. Lo escrito sobre el tema

Arcila (2012), mediante la lectura en un espectrofotómetro de absorción atómica valida la técnica de vapor en frío para la determinación de mercurio. Además, en su informe expone las posibles interferencias que pueden existir previo al análisis. Por otro lado, menciona los tipos de recipientes y la manera de preservar la muestra. Concluye que el método es efectivo y cumple con todos los parámetros de desempeño establecidos bajo las condiciones adecuadas de trabajo.

Rodríguez (2011), en su trabajo de graduación establece que una validación confirma con evidencia objetiva el grado de seguridad en la obtención de resultados. En su investigación realizó la validación de tres métodos analíticos (hierro, sílice y fosfonatos) utilizando los siguientes parámetros de desempeño: Curva de calibración, linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad, análisis de la varianza entre analistas y robustez. Concluyó que los métodos para la determinación de hierro, sílice y fosfonatos son efectivos y aptos para su aplicación en el análisis de aguas de calderas y torres de enfriamiento en condiciones controladas.

Cuellar y Mena (2010), en su trabajo de graduación evalúan cinco muestras de diferente marca, y concluyen que el contenido de mercurio en estas muestras está muy por debajo de lo establecido en la norma salvadoreña, esto quiere decir que existen trazas que no son riesgosas para la salud. Además, concluyen que la varianza de los resultados obtenidos no representa significancia, por lo tanto, el método utilizado funciona de manera efectiva bajo condiciones controladas.

García (2010), en su trabajo de graduación menciona la necesidad de la medición de mercurio en muestras líquidas y sólidas debido a su alta toxicidad a nivel de trazas. Enfatiza que la medición de las trazas de mercurio debe de realizarse por métodos de alta sensibilidad, y requieren de una digestión previa para evaluar de mejor forma los analitos. Concluye que la utilización de celdas para la detección de mercurio vía absorción y fluorescencia atómica son precisas y exactas.

Mercader, Herrera y Carrasco (2008), en su informe de validación, exponen el método para determinación de mercurio por vapor en frío vía espectrofotometría de absorción atómica en aguas superficiales y agua purificada. La finalidad de su informe fue comprobar mediante una validación que el método es confiable y puede ser utilizado en su laboratorio. Para realizar la respectiva validación evaluaron los siguientes parámetros de desempeño: límite de detección y cuantificación, linealidad, repetibilidad, precisión intermedia, veracidad, sesgo e incertidumbre. En su informe detallan la calidad de los reactivos y la metodología utilizados. Además, exponen las fórmulas utilizadas para encontrar cada uno de los parámetros antes mencionados. Concluyen que el método es confiable en un intervalo de 0.020 - 1.000 µg/L y establecen que el método cumple con los requerimientos básicos para ser aplicado dentro del laboratorio. A pesar de esto encontraron que pueden realizar una mejora ya que los resultados muestran que el método tiene una sensibilidad baja.

1.2. Marco Teórico

1.2.1. Validación

La ISO/IEC 17025 define validación como la confirmación, mediante la evaluación y aportación de evidencias objetivas que cumplen requisitos particulares para un uso específico previsto. Por otro lado, en el RTCA 11.03.39: 06, se define validación como el establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico brindará con un alto grado de seguridad de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad establecidos con anticipación. Por lo que validar un método es el proceso que permite confirmar que dicho método cuenta con las capacidades para desarrollar una aplicación determinada.

De acuerdo con la Guía Eurachem (2016), las actividades de validación de métodos y el desarrollo de métodos analíticos están estrechamente ligadas. Esto se debe a que gran parte de los parámetros de desempeño que son evaluadas durante una validación, también están consideradas en gran parte en el desarrollo del método. A pesar de esto, es indispensable resaltar que una validación debe de realizarse sobre la versión final de un método, lo cual debe quedar debidamente documentado.

La RAE (2018), define validar como dar fuerza o firmeza a algo, hacerlo válido.

1.2.2. Verificación

En la ISO 9000 se define verificación como la confirmación mediante la aportación de evidencias objetivas, que se cumplen los requisitos especificados. Es un concepto muy similar a la validación, pero este se aplica para confirmar la capacidad de aplicar el método, que previamente fue validado por otro ente.

La ISO/IEC 17025, en el apartado 5.4.2 detalla lo siguiente: *El laboratorio debe confirmar que puede operar adecuadamente los métodos normalizados antes de introducir los ensayos o calibraciones.*

En general una verificación es considerada como la confirmación de algo que previamente ha sido validado; Esta tiene como objetivo demostrar que el laboratorio verdaderamente domina un método de ensayo normalizado o validado por otro ente, y lo utiliza de manera correcta. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

La RAE (2018), define verificar como comprobar o examinar la verdad de algo.

1.2.3. Diferencia entre validación y verificación.

Tanto la validación como la verificación tienen como objetivo demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación que se estableció. Así mismo deben demostrar que las modificaciones que se hayan realizado no afecten el desempeño, ni confiabilidad del método. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

Un método debe ser validado una vez sea necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso antes establecido. Guía Eurachem (2016). La Norma ISO/IEC 17025, indica que un laboratorio debe validar un método cuando:

- a. el método no está normalizado;
- b. el método es diseñado o desarrollado por el laboratorio;
- c. un método normalizado está siendo usado fuera de su uso establecido;
- d. se amplía o modifica un método normalizado.

Una validación debe ser tan amplia como sea necesaria para cumplir y demostrar que se cumplen los requisitos en relación con la aplicación establecida. Guía Eurachem (2016)

Por otro lado, en la Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010) se establece que una verificación debe realizarse cuando:

- a. el método está normalizado;
- b. el método normalizado está siendo usado fuera de su alcance establecido;
- c. un método normalizado sufre ampliaciones y/o modificaciones menores;

Además, un método se debe verificar cuando recientemente validado sufre una alteración significativa. Esta variación puede ser por un cambio de equipo, cambio de componentes de equipo como columnas, detectores, cambio de analista, cambio de la matriz de la muestra o el nivel de concentración del analito de interés, entre otros similares a estos casos. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

1.2.4. Métodos normalizados

Un método normalizado es publicado por un organismo de normalización que puede ser regional, nacional o internacional (como los son ISO, ASTM, DIN entre otros) o por organizaciones reconocidas en diferentes ámbitos. (AOAC, EPA, USP, entre otras). Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

De acuerdo con la Guía OGA-GEC-016 (2007), la utilización de métodos normalizados es deseable en situaciones en las que será ampliamente utilizado; sin embargo, en ocasiones un laboratorio puede utilizar un método propio, que se encuentre mejor adecuado para el propósito, que uno normalizado, siempre y cuando se demuestre que dicho método es confiable. Es importante destacar que los métodos normalizados deben de utilizarse exactamente como están descritos.

1.2.5. Métodos no normalizados

Los métodos no normalizados son aquellos que no son publicados por organizaciones normalizadoras o entes reconocidos. Estos generalmente, son elaborados por personas individuales con experiencia en el campo de aplicación. La Guía OGA-GEC-016 (2007), menciona que cualquier método no normalizado debe estar apropiadamente validado para poder ser utilizado, ya sean desarrollados por terceros o por la modificación de un método normalizado. Para el caso de modificaciones, es necesario demostrar que las mismas no causa repercusión en la calidad de los resultados.

Para el caso de métodos no normalizados, los terceros que los desarrollan son responsables de incluir en dicho proceso la etapa de validación, para demostrar que el método cumple con los criterios de aceptación adecuados para el propósito de aplicación; el laboratorio usuario debe de verificar el desempeño del método contra sus especificaciones de validación y así demostrar que domina el ensayo y lo utiliza correctamente. Guía OGA-GEC-016 (2007)

En los laboratorios clínicos la mayor parte de los ensayos se realizan con procedimientos comerciales previamente validados por los fabricantes y que deben ser verificados por el usuario final. Guía Eurachem (2016)

1.2.6. Métodos desarrollados en laboratorio

Cuando un laboratorio está en la capacidad de desarrollar métodos de ensayo, este debe demostrar que cuenta con un plan en el que se incluye la evaluación de capacidad en cuanto a personal, equipo y demás recursos necesarios que le permitan desarrollar sus métodos. Estos métodos deben estar debidamente validados, documentados y autorizados previo a su aplicación. OGA-GEC-016 (2007)

1.2.7. Parámetros de desempeño

De acuerdo con el RTCA 11.03.39:06, son características de validación necesitan ser evaluadas y generalmente son utilizados los siguientes parámetros: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo de linealidad, entre otras características. Es necesario remarcar que la mayoría de estos parámetros son cuantificables.

Los parámetros de desempeño a utilizar en la validación o verificación de un método analítico dependerán de la naturaleza del método, así como de sus limitaciones de cualquier índole; entre más amplia sea la evaluación mayor certeza se tendrá sobre el método.

- Selectividad

La selectividad está relacionada con el grado en “el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin

interferencias de otros componentes de comportamiento similar.” Guía Eurachem (2016). En otras palabras, la selectividad establece el grado que puede ser cuantificado determinado analito de interés en presencia de interferentes.

Una prueba de selectividad puede diseñarse de acuerdo con el método. Generalmente, la selectividad de un método analítico se investiga estudiando su habilidad de medir un analito de interés en muestras que previamente fueron contaminadas con interferentes específicos (aquellos que se considere probable encontrar en las muestras de ensayo). Para el caso en donde no esté claro si las interferencias ya están presentes o no, la selectividad del método puede ser investigada estudiando la habilidad de medir el analito comparado con otros métodos independientes. Guía Eurachem (2016)

Es importante resaltar que al momento de realizar el análisis de selectividad debe considerarse que una muestra puede contener al analito de interés en más de una forma, como lo puede ser: ligada o no; inorgánica u orgánica; o en diferentes estados de oxidación. Guía Eurachem (2016)

La validación o verificación debe garantizar el buen funcionamiento del método, y que éste distinga los efectos de las impurezas, las sustancias que reaccionan entre sí, entre otros aspectos que podrían estar presentes en la matriz. UNODC (2010)

- Límite de detección (LOD)

Este límite establece la concentración más baja de un analito que puede ser detectada con un determinado grado de incertidumbre. El límite de detección no es un parámetro robusto y puede ser afectado por cambios menores del sistema analítico como temperatura, grado de pureza de los reactivos, condiciones instrumentales entre otros. Por lo tanto, es importante que este parámetro sea verificado por laboratorios que hayan adoptado métodos previamente validados. UNODC (2010)

- Límite de cuantificación (LOQ)

Este es en nivel mínimo de un analito que puede ser determinado con un desempeño aceptable. Un desempeño aceptable es considerado de diversas formas por diferentes guías incluyendo precisión y veracidad. Guía Eurachem (2016). En otras palabras, este límite establece la concentración de un analito que puede ser detectada y considerada como “real” o bien como cuantificable estadísticamente.

- Valor crítico

De acuerdo con la Guía Eurachem (2016), puede ser necesario establecer un valor de resultado que es considerado un nivel de analito significativamente diferente de cero. Regularmente, alguna acción es requerida a este nivel, tal como declarar un material contaminado. Este nivel es conocido como *valor crítico*.

Muestras adecuadas para estimar LOD y LOQ

Las muestras utilizadas para la estimación de estos límites deben ser preferiblemente:

- ✓ Muestras blanco, es decir, muestras que no contengan cantidades detectables de analito;
- ✓ Muestras de ensayo con concentraciones de analito cercana o por debajo del LOQ esperado.

Las muestras blanco pueden funcionar bien en métodos en los cuales se obtiene señales medibles para un blanco, como lo son la espectrofotometría y la espectroscopia atómica. Sin embargo, para técnicas como cromatografía que se basan en detectar pico por encima del ruido, se necesitan muestras con concentraciones de analito cercanas o encima del LOQ. Guía Eurachem (2016)

▪ Linealidad

El RTCA 11.03.39:06, define linealidad como la “capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras de un intervalo dado”.

Con la finalidad de establecer un rango lineal se puede construir un gráfico de concentración versus variable respuesta, (Curva de respuesta). Ésta se construye con cierta cantidad de valores formados por un blanco y patrones con valores conocidos que cubran el intervalo de trabajo establecido. El número de puntos a analizar debe ser establecido por el analista y generalmente se trabaja como mínimo 4 valores. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

Una vez establecido el rango lineal puede construirse la curva de trabajo o curva de calibración, la cual permite conocer los valores en los que el método es lineal.

▪ Sensibilidad analítica

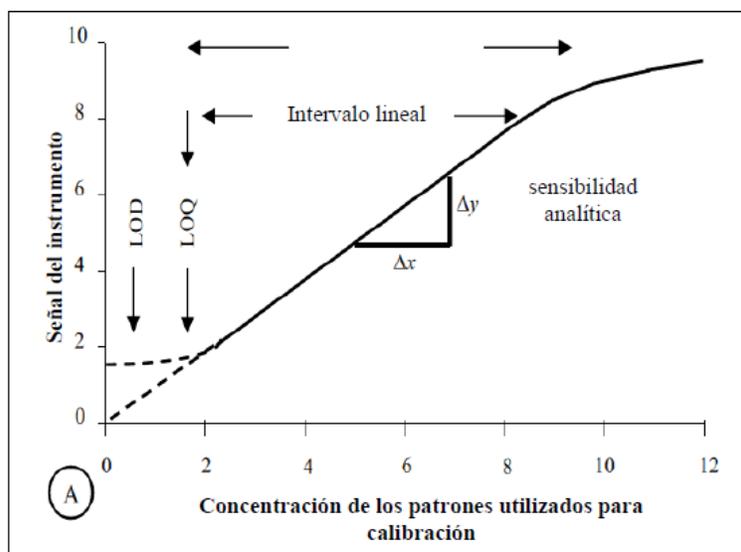
De acuerdo con la Guía Eurachem (2016) “es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida, es decir, el gradiente de la curva de respuesta.”

Se dice que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad analítica permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

La sensibilidad analítica no es considerada una característica de desempeño muy importante. Sin embargo, se puede destacar que en sistemas de medición espectrofotométrica se puede predecir la absorbancia a partir de la ley de Beer-

Lambert. Esto puede utilizarse como una verificación de desempeño del instrumento, y a veces las normas exigen realizar dicha verificación. Guía Eurachem (2016)

Figura 1. Ejemplo de una curva de respuesta en donde se destacan algunas características de desempeño: Intervalo lineal, intervalo de trabajo, sensibilidad analítica, LOD y LOQ.



Fuente: Guía Eurachem (2016)

- Veracidad

De acuerdo con la Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010), la veracidad “determina el grado de coincidencia existente entre el valor medido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado.” Mientras que en la Guía Eurachem, (2016), mencionan que la veracidad es una expresión de la proximidad de la media de un número infinito de resultados a un valor de referencia. La veracidad puede ser determinada por el sesgo o la recuperación, siendo la primera una de las más empleadas en la validación de métodos.

- a. Sesgo

El sesgo es el error sistemático total en contraposición al error aleatorio. Para determinar el sesgo se puede utilizar material de referencia, material fortificado, material de control o material para ensayo de aptitud. Con esto se debe medir un analito de concentración conocida y se determina la diferencia en valor absoluto entre el valor conocido y la media del valor obtenido. Una diferencia sistemática importante en relación con el valor de referencia aceptado se refleja en un mayor valor del sesgo, en cuanto más pequeño es el sesgo, mayor es la veracidad. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

b. Recuperación

La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original. Es definida como la fracción de la sustancia agregada a la muestra (fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

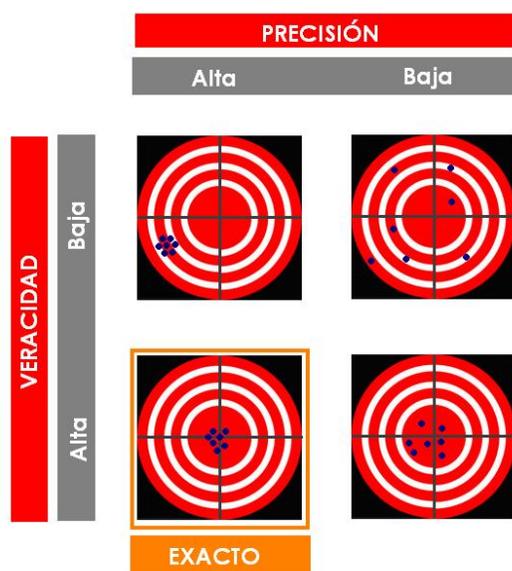
▪ Exactitud

De acuerdo con la Guía Eurachem (2016), “la exactitud de medición expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia.”

El término exactitud, esta aplicado a un conjunto de resultados de un ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios, y un componente común de error sistemático o sesgo. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

La validación de métodos analíticos trata de investigar la exactitud de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios sobre resultados individuales. Por lo tanto, normalmente la exactitud se estudia como dos componentes: *veracidad* y *precisión*. Lo cual se puede interpretar como: entre más veraz y preciso se sea, el método tendrá una alta exactitud. Eurachem (2016). Lo anterior se ejemplifica claramente en la figura 2.

Figura 2. Ejemplificación gráfica del término exactitud.



Fuente: Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

- Precisión

Expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones individuales obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea o bien a partir de varias muestras obtenidas por dilución de la muestra bajo condiciones establecidas. RTCA 11.03.39:06 (2006)

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

- a. Repetibilidad

La repetición es esencial para la obtención de estimaciones fiables de parámetros de desempeño del método, tales como la precisión y el sesgo. Los experimentos que implican análisis repetidos deben ser diseñados para tener en cuenta todas las variaciones en las condiciones operativas que se pueden esperar durante el uso rutinario del método. El objetivo debe estar planteado en determinar la variabilidad típica y no la variabilidad mínima. Eurachem (2016)

La desviación estándar es útil para calcular un “límite de precisión”. Esto le permitirá al analista decidir si existe o no una diferencia significativa, a un determinado nivel de confianza. Eurachem (2016)

Se puede determinar registrando como mínimo seis (6) mediciones bajo las mismas condiciones, es decir, mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y en un corto intervalo de tiempo, todo de un solo analito. A partir de estos registros calcular la Desviación Estándar y el porcentaje de coeficiente de variación. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

- b. Reproducibilidad

Grado de concordancia entre los resultados de mediciones de este mesurando realizadas en diferentes condiciones de medición. Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo, OGA-GEC-016 (2007)

Se puede determinar registrando como mínimo 10 mediciones en días distintos, o en un mismo día cambiando por lo menos una condición analítica. Estas condiciones pueden ser: operador, aparato, reactivos y largo intervalo de tiempo de un analito. Con los datos obtenidos calcular la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

- Robustez

De acuerdo con Eurachem (2016) la robustez de un procedimiento analítico es una medida de la capacidad para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método. La robustez proporciona una indicación de la fiabilidad de método durante un uso normal.

En otras palabras, la robustez es la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método. Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo (2007). Un método de ensayo es más robusto entre menos se vean afectados sus resultados frente a una modificación de las condiciones de análisis. Entre las condiciones de análisis que pueden afectar a un método se encuentran: el analista, el equipo, los reactivos, la temperatura, el pH, el tiempo de reacción, la estabilidad de la muestra, entre otros. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

En cualquier método existirán ciertas etapas que, si no se realizan con el suficiente cuidado, tendrán un efecto significativo en el desempeño del método e incluso en puede resultar que el método no es funcional en lo absoluto. Estas etapas deben de ser identificadas utilizando una “prueba de resistencia o de robustez”. Esta prueba implica hacer cambios deliberados en el método e investigar el efecto subsiguiente en el desempeño. Eurachem (2016)

La información sobre la robustez se debe indicar en el procedimiento del laboratorio en forma de los límites de tolerancia establecidos para los parámetros experimentales críticos. Eurachem (2016)

- Incertidumbre

La incertidumbre de una medición es el parámetro asociado al resultado, en otras palabras, caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al analito.

En este sentido, es importante que, para un método validado o verificado por el laboratorio, se realice la determinación de las diferentes fuentes de la incertidumbre de la medición presentes, estas pueden darse: en el muestreo, en la matriz o el almacenamiento de la muestra, los sesos instrumentales, la pureza de los reactivos, el analista, las condiciones de medición, entre otras asociadas al método de medición. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

Generalmente para el análisis de las fuentes de incertidumbre se recomienda utilizar un Diagrama Ishikawa o de espina de pescado, u otro método que permita con facilidad identificar las fuentes de incertidumbre presentes durante el proceso analítico. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

La incertidumbre puede ser clasificada en dos tipos:

Tipo A (Aleatoria): esta incertidumbre aparece cuando se realizan mediciones repetidas de una misma variable y da valores variados, con igual probabilidad de estar por arriba o por debajo del valor real. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

Tipo B (Sistemático): este tipo de incertidumbre presenta una desviación constante de todas las medidas ya sea hacia arriba o a hacia abajo del valor real, estas son producidas, por ejemplo, por la falta de calibración de un instrumento. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

Incertidumbre combinada: Los componentes de incertidumbre individuales, tanto los de tipo A y tipo B, deben combinarse siguiendo la ley de propagación de errores. De esta forma, se obtiene la incertidumbre total estándar. ($U_{combinada}$). Maroto (2002)

Incertidumbre expandida: la incertidumbre expandida proporciona un intervalo de confianza donde se encuentra el valor verdadero con una determinada probabilidad, esta incertidumbre se obtiene multiplicando la incertidumbre estándar por un factor de cobertura (k). Maroto (2002)

El factor de cobertura k depende de la probabilidad con la que se quiere encontrar el valor real dentro del intervalo, así como de la distribución y de los grados de libertad asociados a la incertidumbre combinada. Normalmente, se utiliza el valor de cobertura 2 ($k = 2$). Este valor asume una distribución normal y una probabilidad del 95%. Maroto (2002)

En concreto, el concepto de incertidumbre refleja cierta duda acerca de la exactitud del resultado obtenido una vez que se han evaluado todas las posibles fuentes de error y que se han aplicado las correcciones oportunas. Es decir, la incertidumbre proporciona una idea de la calidad del resultado ya que indica cuánto puede alejarse un resultado del valor considerado como verdadero. Por lo tanto, los resultados siempre deben ir acompañados de su incertidumbre para que puedan tomar decisiones basadas en esos resultados. Maroto (2002)

1.2.8. Aguas residuales

Las aguas residuales son aquellas que aguas que han sido alteradas por la acción de contaminantes, sufriendo una pérdida en su calidad que puede ser mejorada por la acción de diversos tratamientos. Se caracterizan por acarrear desechos de origen humano y animal, desperdicios caseros, desechos industriales, corrientes pluviales y contaminantes originados por la actividad agrícola. García (2017)

De acuerdo con el “Reglamento de las descargas y reuso de aguas residuales y de la disposición de lodos”, a partir de ahora mencionado como Acuerdo gubernativo 236-2006, las aguas residuales son aquellas que han recibido un uso y cuyas cuales han sido alteradas. Las aguas residuales pueden ser de dos tipos:

- a. Aguas residuales tipo ordinario: son aquellas generadas por las actividades domésticas, tales como uso en servicios sanitarios, pilas, lavamanos, lavatrastos, lavado de ropa y otras similares, así como la mezcla de estas, que se conduzcan a través de un alcantarillado público o pluvial. Acuerdo gubernativo 236 (2006)
- b. Aguas residuales tipo especial: son aquellas generadas por servicios públicos municipales y actividades de servicios, industriales, agrícolas, pecuarias, hospitalarias y todas aquellas que no sean de tipo ordinario, así como la mezcla de estas. Acuerdo gubernativo 236 (2006)

Las aguas residuales originadas por desechos humanos, que se encuentran contaminadas con material fecal y orina de origen humano y animal, requieren atención por parte de las autoridades competentes debido a que pueden contener microorganismos perjudiciales al ser humano, por lo que su tratamiento seguro y eficaz constituye el principal problema de acondicionamiento de las aguas negras para su disposición, sin que éstas representen un peligro para la salud pública. García (2017)

Por otro lado, las aguas originadas por las manipulaciones domésticas que involucran lavado de ropa, limpieza en general, preparación de alimentos y desperdicios de cocina, exceptuando las aguas provenientes de los retretes, también se les conoce como aguas grises. Estas se caracterizan por contener contaminantes como jabones, desinfectantes y detergentes domésticos, además de restos orgánicos como grasas, cabello, restos de alimentos y otro desecho casero que alteran las propiedades del agua. García (2017)

Para el tratamiento y eliminación de las aguas residuales generadas en la industria, deben tomarse en cuenta las precauciones necesarias para asegurar así que éstas no representan algún tipo de peligro para la población dado que pueden contener especies químicas potencialmente tóxicas, siendo necesario un tratamiento previo a su descarga al cuerpo receptor correspondiente. García (2017)

1.2.9. Normas guatemaltecas

Actualmente existe un reglamento que regula la descarga y el reuso de aguas residuales, así como la disposición de lodos, con el fin de proteger a los cuerpos receptores de agua de los impactos provenientes de la actividad humana, recuperar los cuerpos receptores de agua en proceso de eutrofización y promover el desarrollo del recurso hídrico. Dicho acuerdo es el No. 236-2006 Reglamento de las descargas y reuso de aguas residuales y de la disposición de lodos.

Figura 3. Tabla del Acuerdo Gubernativo 236-2006 con los parámetros establecidos para el control de las aguas residuales.

Parámetros	Dimensionales	Valores iniciales	Fecha máxima de cumplimiento			
			Dos de mayo de dos mil quince	Dos de mayo de dos mil veinte	Dos de mayo de dos mil veinticuatro	Dos de mayo de dos mil veintinueve
			Etapa			
			Uno	Dos	Tres	Cuatro
Temperatura	Grados Celsius	TCR +/- 7	TCR +/- 7	TCR +/- 7	TCR +/- 7	TCR +/- 7
Grasas y aceites	Miligramos por litro	100	50	10	10	10
Materia flotante	Ausencia/presencia	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Demanda bioquímica de oxígeno	Miligramos por litro	700	250	100	100	100
Sólidos suspendidos	Miligramos por litro	300	275	200	100	100
Nitrógeno total	Miligramos por litro	150	150	70	20	20
Fósforo total	Miligramos por litro	50	40	20	10	10
Potencial de hidrógeno	Unidades de potencial de hidrógeno	6 a 9	6 a 9	6 a 9	6 a 9	6 a 9
Coliformes fecales	Número más probable en cien mililitros	< 1x10 ⁵	< 1x10 ⁷	< 1x10 ⁴	< 1x10 ⁴	< 1x10 ⁴
Arsénico	Miligramos por litro	1	0.1	0.1	0.1	0.1
Cadmio	Miligramos por litro	1	0.1	0.1	0.1	0.1
Cianuro total	Miligramos por litro	6	1	1	1	1
Cobre	Miligramos por litro	4	3	3	3	3
Cromo hexavalente	Miligramos por litro	1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mercurio	Miligramos por litro	0.1	0.02	0.02	0.01	0.01
Níquel	Miligramos por litro	6	2	2	2	2
Plomo	Miligramos por litro	4	0.4	0.4	0.4	0.4
Zinc	Miligramos por litro	10	10	10	10	10
Color	Unidades platino cobalto	1500	1000	750	500	500

Fuente: Acuerdo Gubernativo 236 (2006)

1.2.10. Metales pesados

Cualquier catión que tenga un peso atómico superior a 23 (correspondiente al sodio), se considera un metal pesado. Estos son constituyentes importantes de muchas aguas, aunque su cuantificación sea a nivel de trazas. Simon (2008)

Las aguas residuales contienen un gran número de metales pesados distintos como el arsénico, cadmio, cobre, mercurio, cromo hexavalente, níquel, plomo y zinc; todos estos catalogados en el Acuerdo gubernativo 236-2006 sustancias contaminantes y necesarios de cuantificar para un buen manejo de las aguas residuales.

1.2.11. Generalidad del mercurio

El mercurio es un metal de transición que se encuentra presente en estado líquido a temperatura ambiente y es de color gris brillante. En la corteza terrestre se puede encontrar como sulfuro de mercurio (HgS). Además, se pueden encontrar más de 20 minerales que contienen al mercurio. García (2010)

Constituye un contaminante sumamente agresivo del medio ambiente. Se puede encontrar en diferentes estados de oxidación, Hg (0), Hg (I), Hg (II). Y en todos los estados de agregación. Es más común la presencia de estas especies en medio acuáticos que en suelos exceptuando los suelos aledaños a zonas acuáticas contaminadas. García (2010)

Tiene la propiedad de ser un compuesto volátil. Debido a esta naturaleza del mercurio, este puede transportarse grandes distancias por las lluvias y por el aire al mover los sedimentos en donde se ha depositado. La capacidad de retener mercurio por parte de los sedimentos puede retrasar la eliminación de la contaminación por muchos años. García (2010)

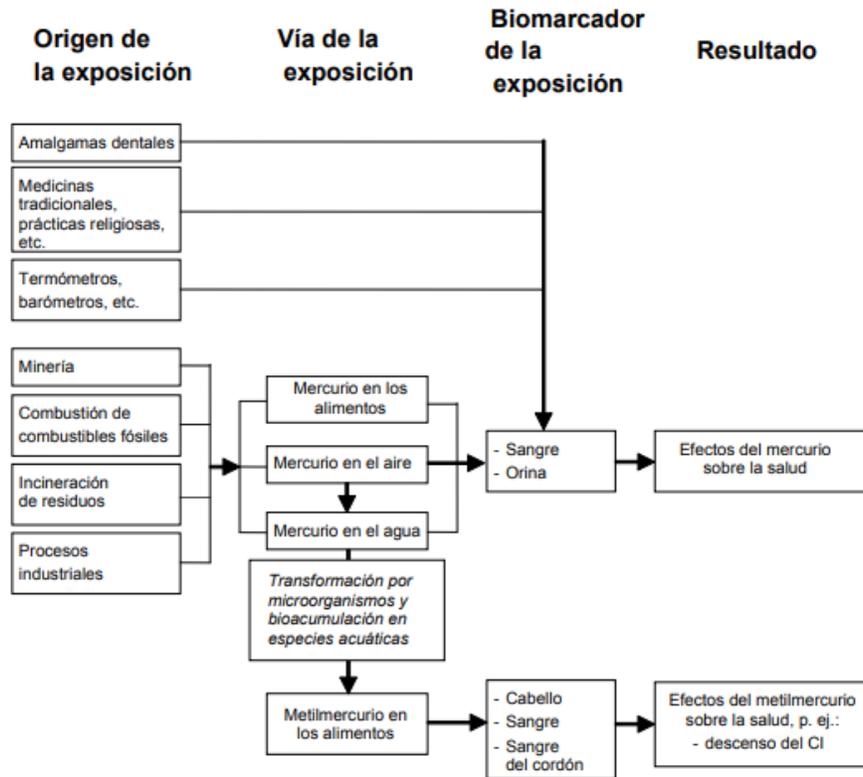
Se sabe que es inorgánico y puede ser metilado por parte de los microorganismos que están en los sedimentos, y que las formas orgánicas del mercurio son aún más tóxicas que las inorgánicas. García (2010)

La forma orgánica más común en que se puede encontrar este metal pesado es como el metilmercurio, el cual tiene una alta solubilidad en lípidos, atraviesa fácilmente las membranas celulares y entra rápidamente en las cadenas alimentarias acuáticas. En ninguna de sus formas, tiene una función benéfica alguna en los humanos, y en cualquier exposición de largo o de corto plazo puede conducir a una alteración progresiva del funcionamiento normal de los órganos donde se acumula. García (2010)

1.2.12. Fuentes de exposición y toxicología del mercurio

Es importante conocer todas las posibles fuentes de mercurio debido a que pueden ser significativas para los seres vivos que estén expuestos.

Figura 4. Resumen de las fuentes de exposición al mercurio.



Fuente: Poulin y Gibb (2008)

Tanto el mercurio elemental e inorgánico como el metilmercurio pueden causar grandes efectos en la salud del ser humano. Algunos de estos efectos pueden ser:

- a. El sistema nervioso: es de destacar que es el órgano más vulnerable a la exposición al mercurio. Se han descrito diversos trastornos neurológicos y conductuales, como temblores, eretismo, inestabilidad emocional, insomnio, alteraciones neuromusculares, cefaleas, entre otros. Se ha identificado que con concentraciones de mercurio en el aire de $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ el sistema nervioso central empieza a ser afectado. Poulin y Gibb (2008)
- b. Efectos renales: estos son otros de los principales órganos sensibles afectados por la contaminación de mercurio, aunque los efectos se observan en concentraciones más altas que en el caso de los problemas neurológicos. Poulin y Gibb (2008)
- c. Efectos cardiovasculares: han encontrado problemas de elevación de presión arterial, palpitaciones y aumento de la frecuencia cardíaca en casos de exposiciones agudas a altas concentraciones de mercurio. Poulin y Gibb (2008)
- d. Efectos cutáneos: se han observado erupciones, habones y dermatitis tras el contacto profesional y accidental con compuestos de mercurio inorgánico. Poulin y Gibb H (2008)
- e. Efectos respiratorios: la exposición aguda a vapores de mercurio en altas concentraciones causa trastornos respiratorios tales como tos disnea y opresión o sensación urente en el pecho. La exposición profesional crónica causa síntomas similares y efectos más graves como neumonitis, hiperinsuflación edema pulmonar y fibrosis por neumonía lobular. Poulin y Gibb (2008)

En conclusión, el grado de toxicidad y sus efectos pueden llegar a afectar el sistema nervioso, inmunológico, el aparato digestivo, la piel, los pulmones, riñones y ojos, todo dependerá del tiempo de exposición, la concentración y el tipo de compuesto al que se expone.

1.2.13. Ciclo natural del mercurio

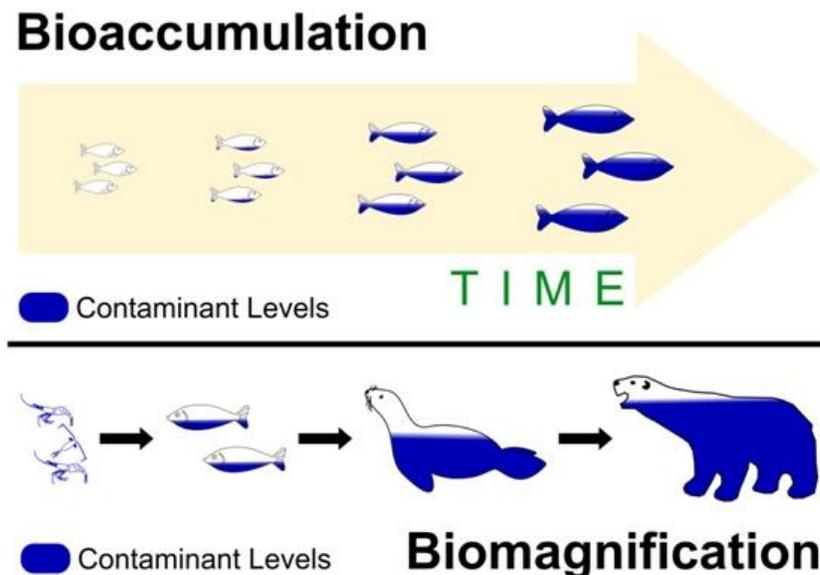
Este es un ciclo atmosférico y la principal incorporación del mercurio a la atmósfera es ocasionada por el vulcanismo y al proceso de desgasificación del mercurio natural por sublimación. Y a partir de la atmósfera se inhala directamente, o se incorpora a las cadenas tróficas mediante el ciclo del agua. Cuellar y Mena (2010)

1.2.14. Ciclo antropogénico del mercurio

La incorporación del mercurio a las cadenas tróficas mediante esta vía es más amplia que el ciclo natural. El mercurio puede entrar en un ciclo atmosférico por los vertidos industriales atmosféricos o por la combustión de carbones. También entra directamente en el ciclo del agua mediante el vertido de los residuos a las aguas de los ríos y mares, a través de vertidos industriales o domésticos. Por otro lado, debido al uso agrícola del mercurio, está presente como contaminante del suelo. Cuellar y Mena (2010)

- a. Bioacumulación: este término se relaciona con la acumulación neta en un organismo de metales provenientes de fuente bióticas (otros organismos) o abióticas (agua, suelo y aire). Cuellar y Mena (2010)
- b. Biomagnificación: este se relaciona con la acumulación progresiva de ciertos metales pesados y otras sustancias persistentes de uno a otro nivel trófico sucesivo. Está relacionada con el coeficiente de concentración en los tejidos de un organismo depredador en comparación con el de su presa. Cuellar y Mena (2010)

Figura 5. Demostración gráfica de bioacumulación y Biomagnificación.



Fuente: Econoticias (2016)

1.2.15. Digestión de muestras

Gran parte de las medidas analíticas se realizan con disoluciones acuosas del analito. Algunas muestras pueden ser disueltas fácilmente en agua o en soluciones acidificadas o alcalinizadas. Sin embargo, existen otras muestras que requieren de reactivos con una mayor eficiencia y tratamientos más rigurosos. Por lo que una digestión, busca degradar materia orgánica, microorganismos y material químico contaminante que permita una cuantificación más precisa. García (2010)

Una digestión es una etapa previa a la cuantificación de un analito, esta etapa del análisis es muy delicada cuando se trabaja a nivel de traza, ya que puede contaminar la muestra o en algunos casos se puede perder el analito, lo que puede limitar la exactitud del análisis. En muestras contaminadas con mercurio es delicado realizar un tratamiento, ya que se debe considerar la volatilidad de las especies. Los métodos más comunes para la digestión de muestras con este analito son por calentamiento con soluciones acuosas ácidas, por calentamiento con microondas con ácidos, por ignición a altas temperaturas en aire u oxígeno y por fusión en medios de sales fundidas. García (2010)

1.2.16. Espectrofotometría Ultravioleta Visible

Este es uno de los métodos de análisis más utilizados en la química analítica, y se basa en la relación que existe entre la absorción de luz por parte de un compuesto y su concentración. Cuando se hace incidir luz monocromática (de una sola longitud de onda) sobre un medio homogéneo, una parte de la luz incidente es absorbida por el medio y otra transmitida, como consecuencia de la intensidad del rayo de luz sea atenuada desde la intensidad de luz incidente a la intensidad del rayo transmitido. García (2010)

Cada sustancia tiene su propio espectro de absorción, el cual es una curva que muestra la cantidad de energía radiante absorbida (absorbancia), por la sustancia en cada longitud de onda del espectro electromagnético, es decir, a una determinada longitud de onda de la energía radiante, cada sustancia absorbe una cantidad de radiación que es distinta a la que absorbe otro compuesto. García (2010)

1.2.17. Absorbancia

Cuando un haz de luz incide sobre un cuerpo traslúcido, una parte de esta luz es absorbida por el cuerpo, y el haz de luz restante atraviesa dicho cuerpo. A mayor cantidad de luz absorbida, mayor será la absorbancia del cuerpo, y menor cantidad de luz será transmitida por dicho cuerpo. González (2010)

La medida de la absorbancia de una solución es usada con mucha frecuencia en un laboratorio, para determinar la concentración de ciertos analitos. Cada uno de estos analitos se hace reaccionar químicamente con determinados compuestos, a fin de obtener una solución coloreada. A mayor intensidad de color, mayor será la absorbancia de la solución en una determinada longitud de onda. González (2010)

1.2.18. Resumen de la metodología de análisis.

El método en general puede separarse en tres etapas.

En la primera etapa, llamada “Digestión de la muestra”, la muestra se digiere para convertir todas las formas en la que se encuentra el mercurio en la muestra en iones de mercurio (II) (Hg^{+2}). Los iones de mercurio (II) (Hg^{+2}) en la muestra digerida se convierten en vapor de mercurio en un sistema semicerrado. El vapor pasa por una columna de absorción activada químicamente, donde el vapor de mercurio se convierte en cloruro de mercurio (HgCl_2).

El cloruro de mercurio (HgCl_2) se extrae de la columna de absorción y se agrega un indicador sensible. El espectrofotómetro se coloca para la lectura de un blanco y se lee la absorbancia de la muestra indicadora sin reaccionar. Luego se agrega un agente complejante para liberar los iones de mercurio: complejo indicador. El incremento en el indicador sin reaccionar causa un aumento en la absorbancia que es proporcional a la cantidad de mercurio en la muestra original. Hach Company (1997)

1.2.19. Detalles generales del método

La muestra es digerida con una mezcla de ácido nítrico y sulfúrico. Este tratamiento convierte al mercurio en sales de mercurio (II). El mercurio de estas sales se reduce a estado metálico con una mezcla de sulfato de hidroxilamina o sulfato de estaño (II). Una vez finalizado el proceso de reducción, se bombea aire a través de la disolución para llevar el vapor resultante que contiene mercurio, a través de una columna de absorción. El vapor de agua generado es atrapado en el desecador a modo que al final de la columna se atrapa únicamente mercurio y agua. Luego, se ajusta el espectro UV en 254 nm, y se procede a la lectura de la absorbancia, la cual es directamente proporcional a la concentración de mercurio. Villanova y Sogorb (2004)

El mercurio es el único elemento que a temperatura ambiente puede ser llevado a su estado atómico basal, por la acción de agentes reductores como el sulfato de hidroxilamina. La corriente de gas inerte volatiliza al mercurio y es mediante esta acción que se logra eliminar las interferencias de la muestra matriz. El análisis del vapor frío de mercurio es mucho más sensible que el análisis mediante la

atomización con llama. Es por esta razón, que para lograr un alto porcentaje de recuperación de mercurio se debe considerar que: el mercurio al ser un elemento volátil, especialmente en su estado reducido, es necesario que, durante la digestión de la muestra, se tenga una alta concentración de un agente oxidante como el permanganato de potasio (KMnO_4) que garantice el estado oxidado, para así disminuir la pérdida de mercurio en esta parte del proceso que es la más importante. Villegas, Acereto y Vargas (2006)

1.2.20. Interferentes del método

Al igual que cualquier método analítico existen sustancia que pueden alterar la eficiencia del método, a continuación, se detalla una lista de las posibles sustancias que pueden actuar como interferente.

Tabla 1. Interferentes de la solución matriz.

Ion o sustancia	Concentración
Ag^{+2}	7 mg/L Ag^{+2}
Al^{+3}	10 mg/L Al^{+3}
Au^{+3}	500 $\mu\text{g/L}$ Au^{+3}
Cd^{+2}	10 mg/L Cd^{+2}
Co^{+2}	10 mg/L Co^{+2}
Cr^{+6}	10 mg/L Cr^{+6}
Cu^{+2}	10 mg/L Cu^{+2}
F^{-}	1.0 mg/L F^{-}
Fe^{+2}	100 mg/L Fe^{+2}
Mo^{+6}	10 mg/L Mo^{+6}
Pb^{+2}	10 mg/L Pb^{+2}
SiO_2	100 mg/L SiO_2

Fuente: Hach Company (1997)

II. Planteamiento del Problema

La economía en Guatemala depende en un 17.5% de las industrias manufactureras según el Banco de Guatemala, 2017. Siendo el agua uno de los recursos vitales para el sector industrial y cualquier otra actividad económica, y tomando en cuenta que posterior a su uso el agua se convierte en agua residual, en el año 2006 se creó el Acuerdo Gubernativo 236-2006, “Reglamento de las descargas y reuso de aguas residuales y de la disposición de lodos”. En este se establecen los parámetros y sus límites máximos permitidos para regular la descarga y el reuso de aguas residuales, y así prevenir el impacto desfavorable hacia el medio ambiente y mantener un equilibrio ecológico.

A partir de la creación de dicho acuerdo, surge la necesidad de impulsar entes que brinden un servicio de asesoría y análisis para el control de las descargas de aguas residuales. Y junto a ello, la necesidad de implementar métodos analíticos validados o verificados para cuantificar los parámetros que en el Acuerdo se establecen.

Uno de los parámetros incluidos en el Acuerdo Gubernativo entre los metales pesados es el mercurio, su cuantificación es muy importante puesto que este metal no tiene ninguna función benéfica en los seres vivos, y en cualquier exposición de largo o corto plazo puede conducir a una alteración progresiva del funcionamiento normal de los órganos en donde se acumula (García C., 2010). Es por ello que se plantea la verificación de un método analítico para la cuantificación de mercurio en aguas residuales por medio espectrofotometría UV con la técnica de vapor frío.

La importancia de la verificación del método se basa en garantizar que los resultados obtenidos sean confiables, por lo cual se evalúan criterios de desempeño como la precisión y la exactitud. Por otro lado, la verificación del método para un laboratorio ambientalista privado conllevaría a una reducción de costos, puesto que el análisis de mercurio se refería a un laboratorio externo, lo cual representaba un alto costo de análisis.

Por esta razón se plantea la siguiente pregunta de investigación ¿Es posible verificar un método analítico para la determinación de mercurio en aguas residuales por medio de espectrofotometría UV con técnica de vapor en frío?

2.1. Objetivos

2.1.1. Objetivo general

Verificar un método analítico para la determinación de mercurio en aguas residuales por medio de espectrofotometría UV con técnica de vapor en frío.

2.1.2. Objetivos específicos

- a. Determinar la validez del método propuesto por medio de los siguientes parámetros de desempeño: límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, precisión y exactitud.
- b. Determinar la incertidumbre asociada al método de análisis de mercurio en aguas residuales.
- c. Determinar la concentración de una muestra problema mediante el método para el análisis de mercurio en aguas residuales.

2.2. Hipótesis

2.2.1. Hipótesis nula

La muestra problema presentó una concentración entre 0.900 y 1.100 $\mu\text{g/L}$ Hg.

2.2.2. Hipótesis alterna

La muestra problema no presentó una concentración entre 0.900 y 1.100 $\mu\text{g/L}$ Hg.

2.3. Variables

2.3.1. Variables independientes

- a. Dilución del estándar de referencia

2.3.2. Variables dependientes

- a. Parámetros estadísticos para verificar el método
 1. Límite de detección
 2. Límite de cuantificación
 3. Linealidad
 4. Rango
 5. Precisión
 6. Exactitud
 7. Incertidumbre
 8. Muestra problema

2.4. Definición de las variables

2.4.1. Variables independientes

Dilución del estándar de referencia.

- a. Definición conceptual
Una dilución tiene como objetivo disminuir la concentración de una disolución añadiendo un disolvente. (RAE, 2018)
- b. Definición operacional
Variación de la concentración del estándar de referencia para determinar la linealidad del método. Se realizaron seis diluciones para su determinación.

2.4.2. Variables dependientes

Límite de detección (LOD)

- a. Definición conceptual
Este límite establece la concentración más baja de un analito que puede ser detectada con un determinado grado de incertidumbre. UNODC (2010)
- b. Definición operacional
Concentración más baja de mercurio que puede ser detectada por el método.
Dimensionales: $\mu\text{g/L}$

Límite de cuantificación (LQD)

- a. Definición conceptual
Este es el nivel mínimo de un analito que puede ser determinado con un desempeño aceptable. Eurachem (2016)
- b. Definición operacional
Concentración más baja de mercurio que puede ser cuantificada por el método. Es decir, que puede ser aceptada. Dimensionales: $\mu\text{g/L}$

Linealidad

- a. Definición conceptual
Capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras de un intervalo dado. RTCA 11.03.39 (2006)
- b. Definición operacional
Capacidad del método analítico para establecer una relación directamente proporcional entre la absorbancia y la concentración de los estándares.

Rango

- a. Definición conceptual
Es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. Eurachem (2016)
- b. Definición operacional
Amplitud entre la concentración más baja y la más alta que puede ser cuantificada por el método para la determinación de mercurio.

Precisión

- a. Definición conceptual
Expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones individuales obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea o bien a partir de varias muestras obtenidas por dilución de la muestra bajo condiciones establecidas. RTCA 11.03.39:06 (2006)
- b. Definición operacional
Dispersión de los datos obtenidos de una serie de repeticiones de una muestra homogénea, puede ser determinada por repetibilidad y/o reproducibilidad de los datos.

Exactitud

a. Definición conceptual

La exactitud de medición expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia. Eurachem (2016)

b. Definición operacional

Dispersión de los datos obtenidos de una serie de repeticiones de una muestra homogénea comparado contra un valor real de referencia. Puede ser establecida mediante la veracidad y precisión del método.

Incertidumbre

a. Definición conceptual

La incertidumbre es el parámetro asociado al resultado, en otras palabras, caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al analito. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010)

b. Definición operacional

Errores aleatorios que pueden ser determinados durante todo el proceso de cuantificación del mercurio.

Muestra problema

a. Definición conceptual

Parte representativa del sistema material objeto de estudio, de variable con valor conocido. Pérez (2014)

b. Definición operacional

Muestra representativa, objeto de estudio de concentración conocida.

2.5. Alcances y límites

2.5.1. Alcances

El estudio de investigación se centró en la verificación del método 10065 de HACH para la determinación de mercurio. Dicho método fue implementado en un laboratorio privado en donde únicamente se varió el espectrofotómetro UV en donde se realizarían las lecturas, por esta razón fue necesaria la verificación del método.

Para la verificación del método se utilizó un estándar de referencia no certificado con concentración de 1000 ± 10 mg/L de Hg y a partir de este se realizaron ocho diluciones para determinar los diferentes parámetros de referencia establecidos.

Se construyó un diagrama cualitativo: diagrama de Ishikawa, para establecer las distintas fuentes de incertidumbre que afectan al método. Y fue a partir de estas fuentes que se estableció la incertidumbre del método.

Por último, se analizó una muestra problema agregando a una muestra libre de mercurio el estándar de referencia con una concentración de $1.0 \mu\text{g/L}$, para confirmar el correcto funcionamiento del método y así confirmar la hipótesis establecida.

Es necesario resaltar que el presente estudio se centró en verificar un método analítico, por lo que no incluye un análisis ni estudio técnico-económico.

2.5.2. Límites

La contaminación de mercurio en aguas residuales es limitada, es decir, no se han identificado muestras que contengan mercurio, esto al menos en las muestras analizadas en el laboratorio privado en donde se realizó el estudio. Es por ello que fue necesaria la preparación de muestras problema para evaluar los parámetros de desempeño antes detallados. Las muestras problema fueron preparadas a partir de agua desmineralizada y también de aguas residuales que fueron previamente analizadas por un laboratorio externo y que se encontraban libres de mercurio.

La experimentación del presente trabajo fue realizada en las instalaciones de un laboratorio privado de análisis ambiental, por lo cual se optimizaron los recursos. El kit para realizar la técnica de vapor en frío fue adquirido por dicho laboratorio, y se contaba con el equipo básico para la ejecución del método. El kit utilizado para la verificación del método incluye reactivos (Detallados en la Tabla 1) los cuales presentan la limitante de no indicar la cantidad, ni la concentración del componente principal de los mismos. Por ello, fue necesario contactar con los proveedores quienes no dieron una respuesta favorable.

El método 10065 de HACH es el único con el que cuenta el laboratorio privado para la determinación de mercurio en aguas residuales. Además, es de resaltar que se realizaron las repeticiones y experimentos mínimos, y permitidas del método debido a la limitante de insumos que el laboratorio privado estableció.

Por otro lado, no se determinó la reproducibilidad, ni la robustez del método debido a que el laboratorio no cuenta con otro analista con las capacidades técnicas necesarias para ejecutar el método.

2.6. Aporte

A la sociedad guatemalteca y a las personas especializadas en el análisis de metales pesados en aguas residuales, la presentación de un método verificado para la determinación de mercurio (a nivel de trazas) utilizando un espectrofotómetro UV.

Al laboratorio privado, la implementación de un método verificado para la determinación de mercurio en aguas residuales de tipo ordinario y especial, cumpliendo los requisitos necesarios para optar a una acreditación en el futuro.

A los laboratorios ambientalistas y a la industria en Guatemala dedicados al análisis de aguas residuales, la información sobre un método verificado para la cuantificación de mercurio en un espectrofotómetro UV.

A la Universidad Rafael Landívar, a los estudiantes y a las personas interesadas en ampliar la investigación, se presenta el aporte de conocimientos e información sobre la verificación de un método analítico para la determinación de mercurio en aguas residuales por medio la técnica de vapor en frío y lectura en un espectro UV.

III. Método

3.1. Sujetos y unidades de análisis

3.1.1. Sujetos

Personas con experiencia en el campo de estudio

- a. Licenciada Mayra Benítez, graduada en Licenciatura en bioquímica y microbiología, gerente de laboratorio privado con amplia experiencia en validación de métodos y auditorías internas.
- b. Doctor Juan Carlos Quijano, profesor de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Con amplia experiencia en la validación y verificación de método analíticos y experiencia en auditorías de Normas ISO.

3.1.2. Unidades de análisis

- a. Estándar de referencia con concentración de 1000 mg/L utilizado para la verificación del método.
- b. Investigaciones y otras fuentes de información tanto físicas como electrónicas, utilizadas como referencias para el diseño del plan de verificación.
- c. Política para la selección y validación de métodos de ensayo de la Oficina Guatemalteca de Acreditación: OGA-GEC-016.
- d. Método 10065 para la cuantificación de Mercurio de HACH.
- e. Guía EURACHEM: La adecuación al uso de lo método analíticos.
- f. Norma ISO 17025-2005, Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración.

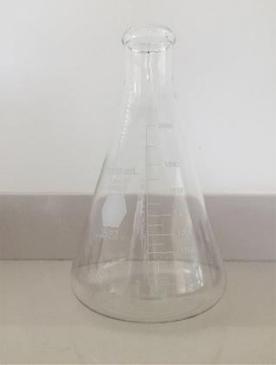
3.2. Instrumentos

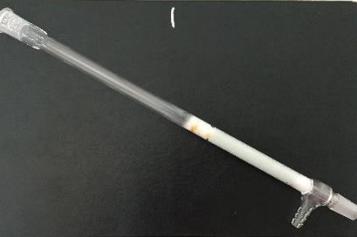
Tabla 2. Equipos utilizados.

Equipo	Uso	Descripción	Ilustración
Balanza analítica	Pesaje de reactivos para digestión de muestras	Marca AND modelo HR200. Capacidad máxima de 210 g, incertidumbre de ± 0.00005 g.	
Estufa agitadora	Utilizada para la digestión de la muestra (Calentamiento y agitación).	Marca Thermo Scientific, Modelo SP131325. Regulación electrónica de temperatura hasta 540°C y velocidad de agitación hasta 1200 rpm.	
Espectrofotómetro UV	Utilizado para la lectura de concentración muestras.	Marca Millipore, modelo Pharo 300. Lectura con UV-Visible.	
Bomba de vacío	Utilizada para la reacción de vapor en frío.	Marca Millipore, modelo WP6111560. 115V/60 Hz.	

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 3. Instrumentos de laboratorio utilizados.

Instrumento	Descripción	Ilustración
<p>Probeta graduada</p>	<p>Utilizada para la medición de volumen en la metodología. 50 ± 0.5.</p>	
<p>Espátulas</p>	<p>Utilizadas para la manipulación de reactivos.</p>	
<p>Pipetas</p>	<p>Utilizadas para la medición de volumen en la metodología. 5 ± 0.05 y 10 ± 0.05.</p>	
<p>Erlenmeyer</p>	<p>De 2 L utilizado para la digestión de las muestras.</p>	
<p>Probeta con esmerilado</p>	<p>Probeta de 10 ± 0.1, esmerilada, utilizada para coleccionar la muestra.</p>	

<p>Botella de lavado de vapor en frío</p>	<p>Utilizado en el equipo de vapor en frío para contener la muestra.</p>	
<p>Columna de absorción</p>	<p>Utilizado en el equipo de vapor en frío para absorber trazas de Hg.</p>	

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 4. Utensilios utilizados.

<p>Utensilio</p>	<p>Ilustración</p>
<p>Pipeteador</p>	
<p>Soporte universal, pinzas y anillo</p>	

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 5. Reactivos utilizados en la metodología.

Reactivo	Descripción
Ácido sulfúrico	97 – 98% grado analítico y en solución 0.5 N
Ácido nítrico	65% grado analítico
Peroxodisulfato de potasio	Grado analítico.
Permanganato de potasio	Grado analítico.
Cloruro de hidroxilamonio	Grado analítico. ($\leq 0.000001\%$)
Sulfato de estaño *	Reactivo A HgEx. Solución en ampollas
Hipoclorito de sodio *	Reactivo C HgEx. Solución.
Carbonato de sodio y Nitrito de sodio *	Reactivo 3 HgEx en sobre.
Yoduro de potasio y Cloruro de sodio *	Reactivo 4 HgEx en sobre. Indicador.
Hidróxido de sodio en solución *	Reactivo 5 HgEx en solución.
L-Cisteína y Cloruro de sodio *	Reactivo 6 HgEx en sobre.

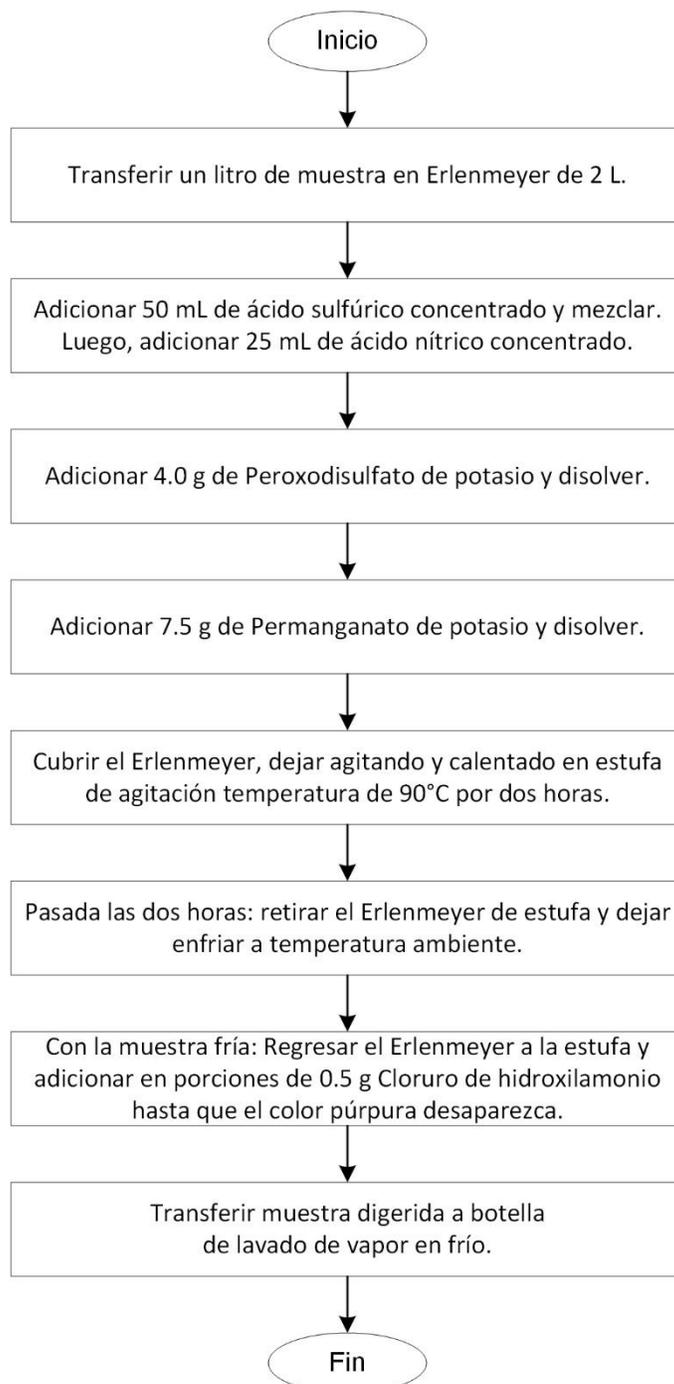
*Se desconoce la concentración de los reactivos.

Fuente: elaboración propia (2018)

3.3. Procedimiento

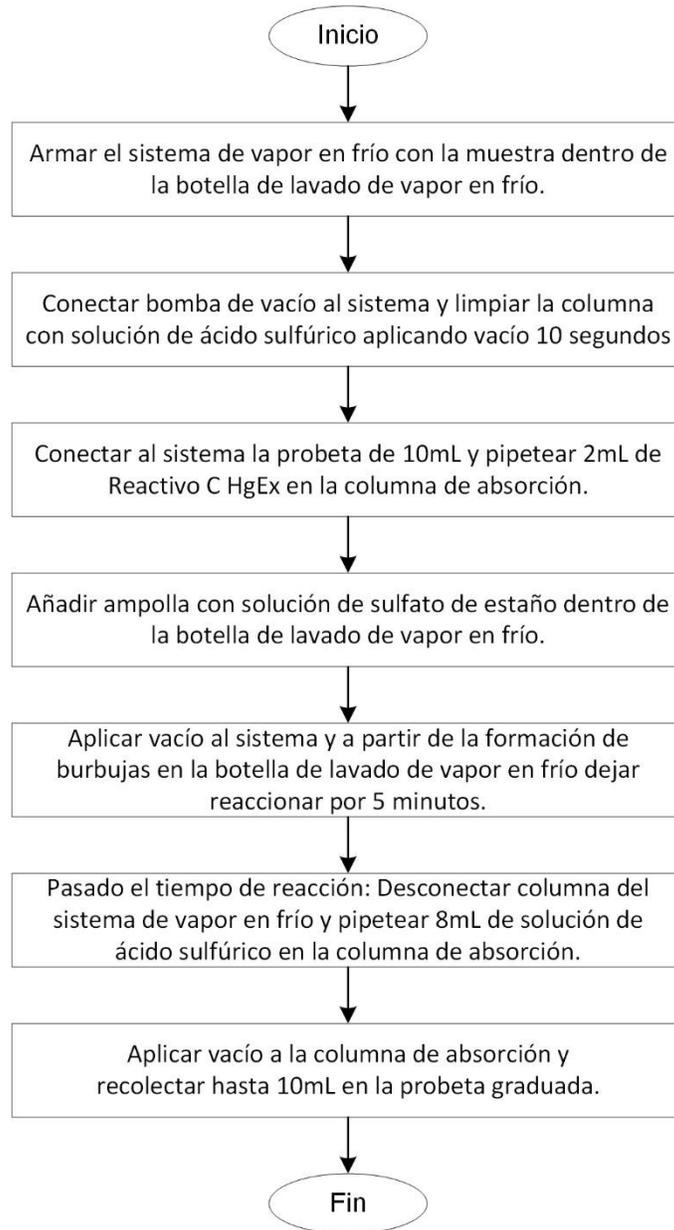
3.3.1. Metodología de análisis

Diagrama 1. Proceso de digestión de la muestra.



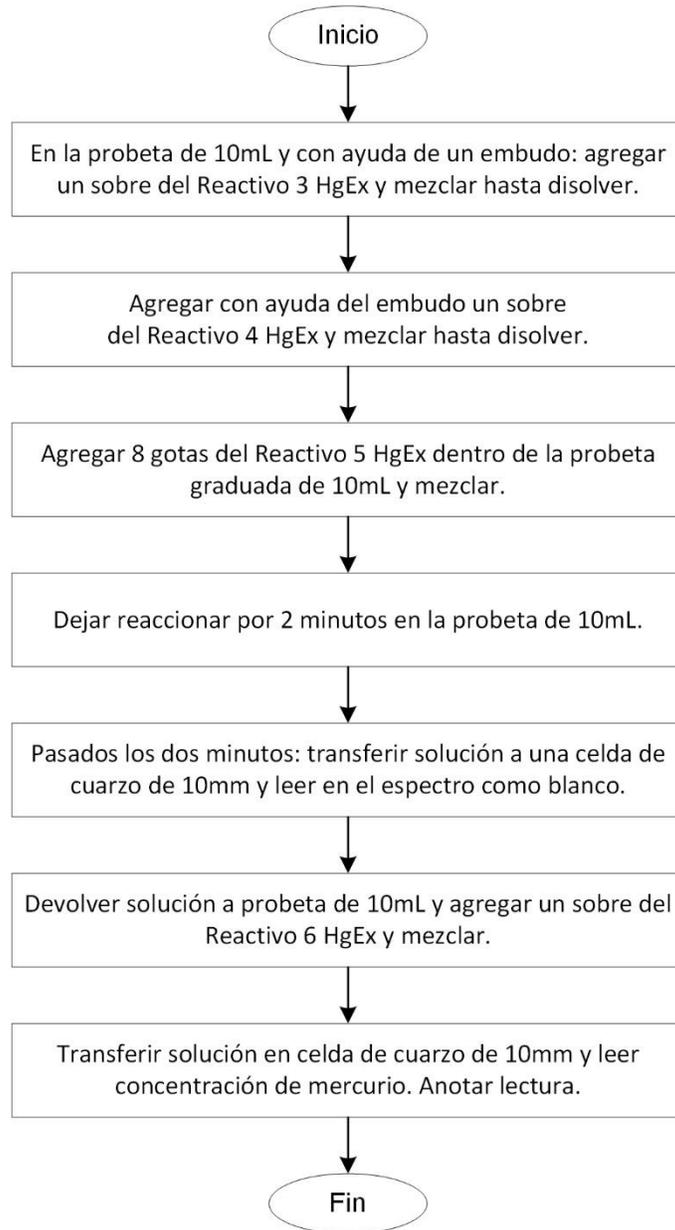
Fuente: elaboración propia (2018)

Diagrama 2. Proceso de reacción vapor en frío.



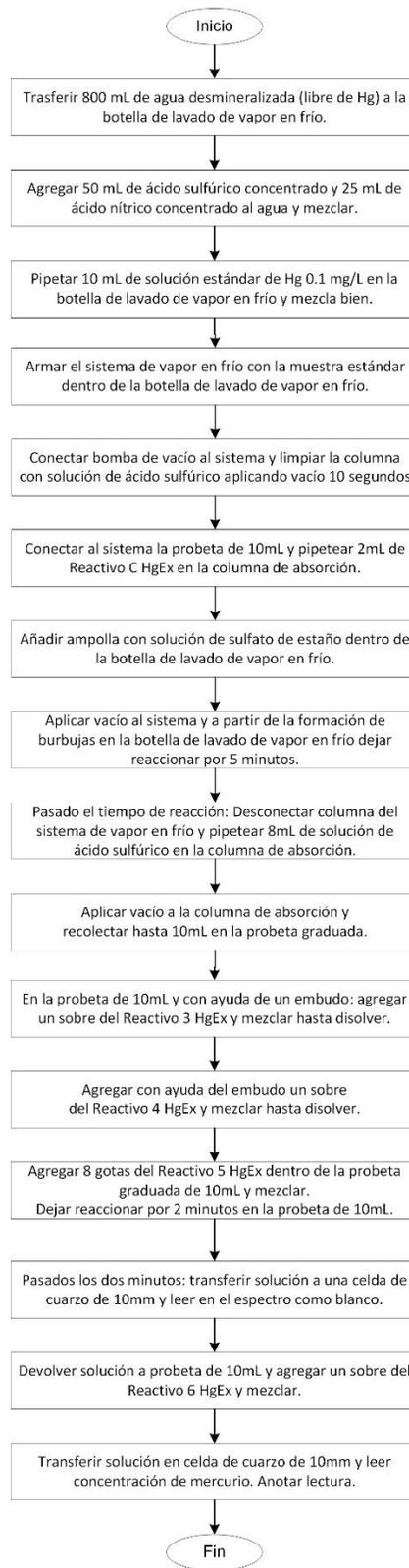
Fuente: elaboración propia (2018)

Diagrama 3. Reacción final y lectura en espectro UV.



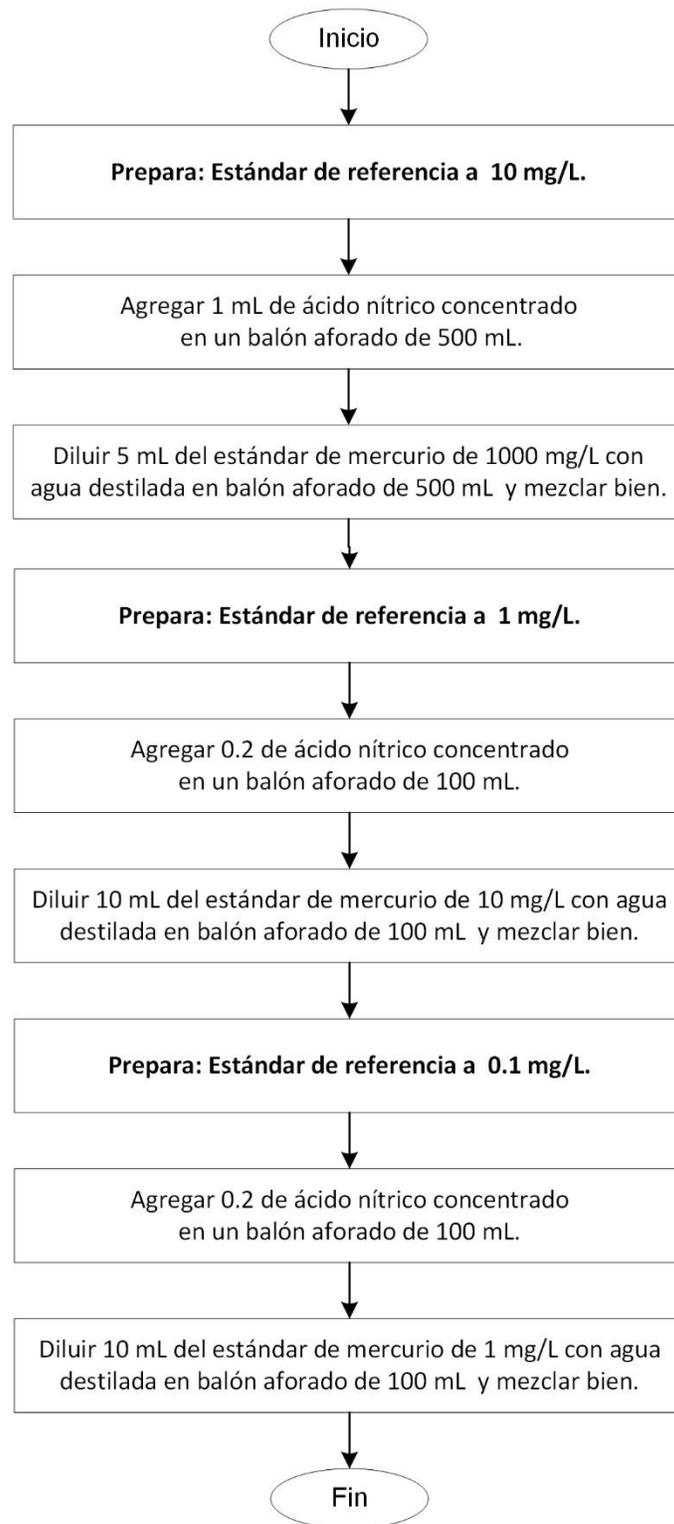
Fuente: elaboración propia (2018)

Diagrama 4. Método de análisis de solución estándar



Fuente: elaboración propia (2018)

Diagrama 5. Método de preparación de estándar 0.1 mg/L a partir de 1000 mg/L.



Fuente: elaboración fuente propia (2018)

3.4. Diseño y metodología estadística

3.4.1. Diseño experimental

Tabla 6. Detalle de experimentos realizados.

# Experimento	Descripción	Tratamiento	Repeticiones
Experimento #1 Determinación del límite de detección	Se realizaron una serie de repeticiones con la concentración más baja establecida con el estándar de referencia (0.1 µg/L).	Reacción de vapor en frío.	6 repeticiones con la concentración más baja. (Ideal 10 repeticiones).
Experimento #2 Determinación del límite de cuantificación	Se identificó a partir de los datos obtenidos en el experimento #1.	No requiere	6 repeticiones con la concentración más baja. (Ideal 10 repeticiones).
Experimento #3 Determinación de la linealidad	Se realizaron distintas corridas con el estándar de referencia utilizando las siguientes concentraciones: (0.1, 1, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0) µg/L	Reacción de vapor en frío.	6 corridas con 2 repeticiones por punto del estándar de referencia. (Ideal 2 a 3 repeticiones)
Experimento #4 Determinación del rango	Con los experimentos #3 y #4 se determinó la concentración más baja y alta que puede ser cuantificada.	No requiere	No aplica
Experimento #5 Determinación de la precisión.	Se realizaron una serie de repeticiones a una muestra problema de concentración conocida.	Reacción de vapor en frío.	*5 repeticiones de la muestra problema. (6 a 15 repeticiones)
Experimento #6 Determinación de la exactitud.	Se terminó a mediante a los datos obtenido en el experimento #5 y el sesgo entre los mismos.	No requiere	No aplica
Experimento #7 Determinación de la incertidumbre	Se determinaron los errores aleatorios y sistemáticos a partir de los experimentos #3 y #5.	Reacción de vapor en frío.	No aplica.
Experimento #8 Análisis de una muestra problema.	Se realizaron una serie de repeticiones de cinco muestras problema contaminadas con el estándar de referencia. Se utilizaron los datos del experimento #5	Reacción de vapor en frío.	*5 repeticiones de la muestra problema.

*No fue posible realizar más repeticiones por limitaciones de recursos del laboratorio.

**De acuerdo con Eurachem, (2016) se cumple con las repeticiones mínimas para considerar válidos los resultados obtenidos en cada experimento.

Fuente: elaboración propia (2018)

3.4.2. Descripción de las unidades experimentales

Concentración: La concentración del material de referencia certificado fue la única variable experimental que sufrió variación durante la ejecución de los distintos experimentos y esta variación dependió del parámetro a evaluar. El material de referencia certificado tiene una concentración de 1000 ± 10 mg/L Hg.

3.4.3. Variable respuesta

La variable respuesta obtenida en cada uno de los experimentos realizados fue la absorbancia. Solamente se obtuvo esta variable respuesta puesto que solamente existe una variable experimental.

3.4.4. Metodología de análisis

Experimento #1 – Determinación del límite de detección.

- a) Previo a la determinación del límite de detección se calcula el valor crítico. Este se determinó utilizando un nivel de confianza del 95%, con grado de libertad infinito.

$$LC = t(1 - \alpha; v) * S_o \quad \text{Sí: } t(0.05, \infty) \rightarrow 1.645$$

$$LC = 1.645 * S_o$$

Eurachem (2016)

- b) Se calculó la media y la desviación estándar de los valores obtenidos durante la experimentación.

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

Eurachem (2016)

- c) Se calculó el límite de detención a partir de la siguiente ecuación.

$$LOD = 2 * LC * S_o \quad \text{Sí: } LC = 1.645 * S_o$$

$$LOD = 3.29 * S_o$$

Eurachem (2016)

Siendo:

$LC =$ Valor crítico

$t =$ t Student

$1 - \alpha =$ Probabilidad b

$v =$ grados de libertad

$LOD =$ Límite de detección

S_o = Desviación estándar
 \bar{X} = Media de los valores
 X_i = Valores obtenidos en las lecturas
 n = Número de valores obtenidos en las lecturas.

Experimento #2 – Determinación del límite de cuantificación.

Se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$LOQ = 10 * S_o$$

Eurachem (2016)

Siendo:

LOQ = Límite de cuantificación

S_o = Desviación estándar

Para el cálculo de este límite se considera que cualquier medición que se realice dará un valor que presentará una desviación estándar relativa que generalmente será del 10%. Este valor puede variar y se adecuará según lo considere el analista; otros valores utilizados es 5% o 6%. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010).

Experimento #3 – Determinación de la linealidad

Se analizaron 6 concentraciones distintas y espaciadas uniformemente, y se efectuaron 2 corridas por cada concentración. Estas concentraciones (x) dieron como variable respuesta una absorbancia (y). A partir de estos datos se determinó el promedio de las 2 corridas y se construyó un gráfico de la absorbancia (eje y) en función de la concentración (eje x).

Se utilizó el criterio del coeficiente de determinación (r^2) para establecer si el método en cuestión presenta una correlación lineal. El coeficiente de determinación indica el grado de relación entre la variable concentración (x) y la variable absorbancia (y) de la curva de calibración. El rango de valores que puede alcanzar este coeficiente es de 0 a +1. El resultado de este coeficiente indicará el porcentaje de la variación de una variable debido a la variación de la otra y viceversa. El valor máximo +1 indica una correlación positiva perfecta con una pendiente positiva. Y cuando el valor del coeficiente es igual a 0, no existe ninguna correlación entre las variables, lo que indica una independencia total de las variables. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010). Por lo tanto, se utilizó el siguiente criterio para establecer que el método presenta una correlación lineal $r^2 \geq 0.9950$.

No fue necesario realizar un análisis de t-Student ya que el coeficiente de correlación y determinación superan al criterio establecido y son pruebas representativas que demuestran que el método es lineal.

Experimento #4 – Determinación del rango

Este se determinó mediante la curva de calibración.

Experimento #5 – Determinación de la precisión

Se realizaron 5 repeticiones utilizando una muestra problema contaminada con 0.1µg/L de Hg, para determinar la precisión del método mediante su repetibilidad. Con los datos obtenidos se obtuvo la media y la desviación de los datos y se calculó el porcentaje del coeficiente de variación.

$$\%CV = \frac{S_o}{\bar{X}}$$

Maroto (2002)

$\%CV$ = *Porcentaje coeficiente de variación*

S_o = *Desviación estándar*

\bar{X} = *Media de los datos obtenidos*

Luego, se calculó el coeficiente de variación máximo que indica el porcentaje máximo para establecer que el método es altamente preciso. Este se determinó mediante el coeficiente de variación de Horwitz.

$$\%CV_H = 2^{[1-(0.5*\log(z))]}$$

Maroto (2002)

$\%CV_H$ = *Porcentaje coeficiente de variación de Horwitz.*

z = *Dato promedio de la concentración en $\frac{mg}{L}$.*

Por último, se utilizó el siguiente criterio para determinar la precisión del método.

$$Sí \rightarrow \%CV < \frac{\%CV_H}{2} \rightarrow \text{El método es altamente preciso.}$$

Eurachem (2016)

El criterio de aceptación utilizado para establecer la precisión fue el coeficiente de Horwitz, este coeficiente es usado comúnmente para evaluar la reproducibilidad de un método, la cual no fue evaluada en este estudio por las razones detalladas en las limitantes del estudio. A pesar de esto, el coeficiente de Horwitz puede ser utilizado como criterio de aceptación para establecer la precisión mediante repetibilidad utilizando como límite la mitad del valor del coeficiente. Por otro lado, solamente se realizaron 5 repeticiones ya que el laboratorio estableció un límite de reactivos destinados para la verificación del método.

Experimento #6 – Determinación de la exactitud

Previo a la determinación de la exactitud se realizó la determinación de la veracidad del método. Para determinar la veracidad del método se determinó el sesgo de los valores de concentración obtenidos en el experimento #5. Entre menor sea el sesgo de los datos, mayor veracidad tendrá el método.

$$s = (X - X_T)$$

Eurachem (2016)

$s = \text{Sesgo}$

$X = \text{Concentración obtenida de cada repetición}$

$X_T = \text{Concentración teórica del estándar de referencia}$

Para confirmar la veracidad del método se realizó una prueba de t-Student bajo el siguiente criterio:

$$t_{exp} < t_{ref}$$

$$t_{exp} = \frac{X - X_T}{S/\sqrt{n}}$$

Eurachem (2016)

$t_{exp} = t$ calculada a partir de datos experimentales

$X_T = \text{Concentración del estándar de referencia}$

$X = \text{Concentración promedio de los datos experimentales}$

$S = \text{Desviación estándar de los datos experimentales}$

$n = \text{número de datos experimentales evaluados}$

El valor crítico (t_{ref}) se obtuvo del Anexo C, para un nivel de confianza del 95% y con 4 grados de libertad (n-1).

Para determinar la exactitud del método se considera el grado de precisión obtenido en el experimento #5 y el grado de veracidad obtenido en este experimento. Si el método es altamente preciso y veraz se dice que es un método exacto.

Es importante mencionar que tanto para el experimento #5 como el #6, los valores establecidos como criterios máximos, son los límites para establecer si el método es altamente preciso y veraz.

Experimento #7 – Determinación de la incertidumbre

Se determinaron dos tipos de errores para establecer la incertidumbre el método.

- a) Error aleatorio (Tipo A): Este error es producido por las distintas repeticiones de las lecturas realizadas.

Se utiliza la siguiente ecuación para determinar la incertidumbre estándar generada por de las repeticiones de los experimentos anteriores:

$$u_i = \frac{S_o}{\sqrt{n}}$$

Eurachem (2016)

u_i = incertidumbre estándar

S_o = Desviación estándar de las mediciones

n = número de mediciones

- b) Error sistemático (Tipo B): Este error es producido por los equipos y el material volumétricos utilizado en la metodología. Los cuales son: balanza analítica, pipeta volumétrica de 10 mL y de 5 mL, probeta volumétrica de 50mL y el espectrofotómetro.

Primero se determina la incertidumbre estándar de los instrumentos y equipos mencionados y se procede a determinar la incertidumbre combinada mediante la siguiente ecuación:

$$u_{combinada} = \sqrt{(U_a)^2 + (U_b)^2}$$

Eurachem (2016)

U_a = Incertidumbre tipo A

U_b = Incertidumbre tipo B

Con el valor de la incertidumbre combinada se procedió a determinar la incertidumbre expandida del método. Se utilizó un nivel de confianza del 95%, lo cual da un factor de cobertura (k) de 2.

$$u_{expandida} = k * u_{combinada}$$

Eurachem (2016)

Experimento #8 – Análisis de una muestra problema.

Este experimento se realizó con la finalidad de confirmar la hipótesis nula: “La muestra problema presentó una concentración entre 0.900 y 1.100 $\mu\text{g/L}$ Hg.”

Los datos fueron obtenidos del experimento #5 en donde se analizó una muestra problema contaminada con el estándar de referencia. La muestra problema se preparó cada vez que se analizaría y fue variándose la base de la muestra, utilizando agua destilada y muestras de agua residual verificadas como libres de mercurio dejado constante la concentración de mercurio agregada. Se determinó el promedio de los datos obtenidos y se comparó para aceptar o rechazar la hipótesis planteada.

$$H_0: 0.900 \leq \theta \leq 1.100$$

$$H_i: 0.900 < \theta \text{ ó } \theta > 1.100$$

H_0 : Hipótesis nula

H_i : Hipótesis alterna

θ : parámetro de referencia (Concentración).

IV. Presentación y Análisis de Resultados

4.1. Linealidad del método

Tabla 7. Datos experimentales de linealidad.

No.	Corrida 1		Corrida 2	
	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Absorbancia	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Absorbancia
0	0.0	0.649	0.0	0.649
1	0.1	0.674	0.1	0.676
2	1.0	0.859	1.0	0.858
3	1.5	0.925	1.5	0.926
4	2.0	1.025	2.0	1.016
5	2.5	1.120	2.5	1.103
6	3.0	1.187	3.0	1.192

Fuente: elaboración propia (2018)

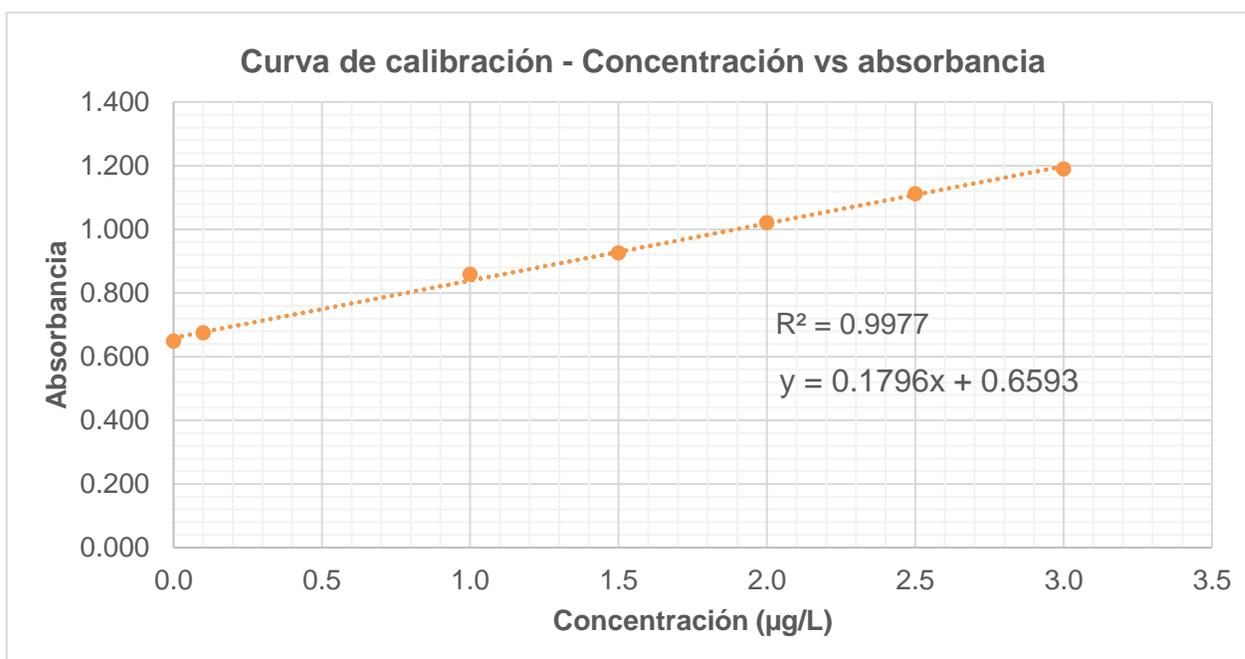
Tabla 8. Datos experimentales promedio de linealidad.

No.	Promedio		
	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Absorbancia	Coefficiente de determinación
0	0.0	0.649	0.9977
1	0.1	0.675	
2	1.0	0.859	
3	1.5	0.926	
4	2.0	1.021	
5	2.5	1.112	
6	3.0	1.190	

Fuente: elaboración propia con base en Tabla 7 (2018)

A partir del siguiente criterio $r^2 \geq 0.9950$, se comprueba que el método en cuestión es un método lineal, ya que su coeficiente de determinación es mayor al criterio establecido. ($r^2 = 0.9977$).

Diagrama 6. Curva de calibración del método.



Fuente: elaboración propia con base en datos de Tabla 8 (2018)

No se realizó el análisis de t-Student ya que el coeficiente de determinación superó al criterio establecido y es una prueba representativa que demuestran que el método es lineal. (Ver Diagrama 6).

4.2. Límite de detección y límite de cuantificación

Tabla 9. Límites del método.

Descripción	Dato
Límite de detección (LOD)	0.039 µg/L
Límite de cuantificación (LOQ)	0.119 µg/L

Fuente: elaboración propia (2018)

4.3. Rango del método.

Tabla 10. Límite inferior y superior.

Descripción	Dato
Límite inferior	0.119 µg/L
Límite superior	3.000 µg/L

Fuente: elaboración propia con base en Diagrama 7 (2018)

4.4. Precisión del método.

Tabla 11. Repetibilidad del método.

Corrida	Concentración (µg/L)	Promedio (µg/L)	Desviación	CV%	%CV _H
1	0.982	0.994	± 0.0169	1.70%	5.66%
2	1.014				
3	0.974				
4	0.993				
5	1.008				
%CV < (%CV _H / 2) = El método es altamente preciso					

* %CV_H: Coeficiente de variación de Horwitz.

Fuente: elaboración propia (2018)

El porcentaje del coeficiente de variación es menor que la mitad del porcentaje del coeficiente de variación de Horwitz. Por lo tanto, cumple con el criterio de aceptación y se demuestra que el método es altamente preciso.

4.5. Exactitud del método.

Tabla 12. Exactitud y sesgo.

Descripción	Concentración (µg/L)	Sesgo
Corrida 1	0.982	-0.018
Corrida 2	1.014	0.014
Corrida 3	0.974	-0.026
Corrida 4	0.993	-0.007
Corrida 5	1.008	0.008
Media	0.994	
Desviación estándar	± 0.0169	
t experimental	-0.768	
t crítica (α=0.05)	2.132	
Se acepta la prueba. (t experimental < t crítica)		

Fuente: elaboración propia (2018)

Al aceptar la prueba t-Student se demuestra que el método es exacto.

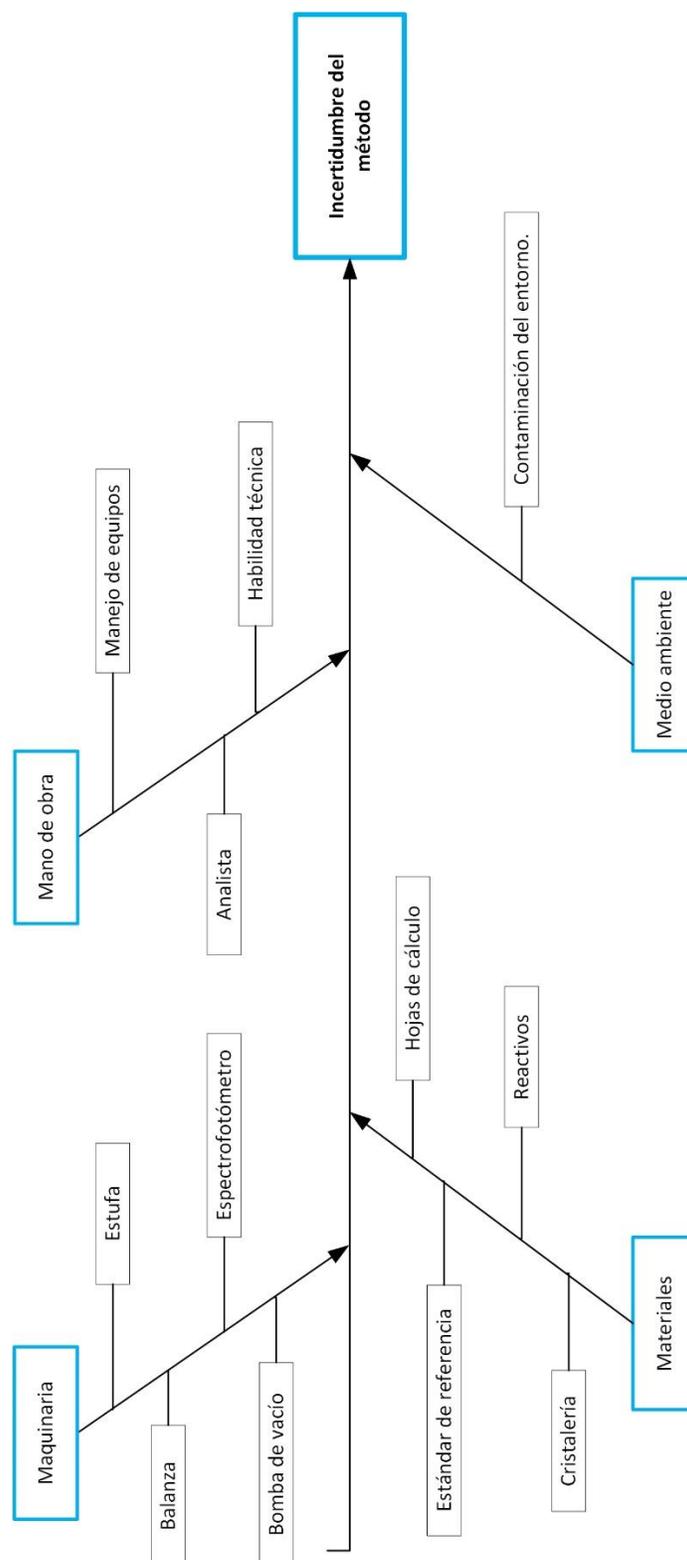
4.6. Incertidumbre del método

Tabla 13. Incertidumbres.

Descripción	Dato
Incertidumbre combinada	$\pm 0.033 \mu\text{g/L}$
Incertidumbre expandida	$\pm 0.066 \mu\text{g/L}$

Fuente: elaboración propia (2018)

Diagrama 7. Ishikawa para evaluar las posibles fuentes de incertidumbre.



Fuente: elaboración propia (2018)

4.7. Muestra problema

Tabla 14. Datos obtenidos del análisis de muestra problema.

Corrida	Concentración (µg/L)	Absorbancia	Promedio (µg/L)
1	0.982	0.836	0.994
2	1.014	0.841	
3	0.974	0.834	
4	0.993	0.838	
5	1.008	0.840	

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 15. Análisis ANOVA para la concentración experimental obtenida en función de la concentración teórica esperada.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8.41E-05	1	8.41E-05	0.5898	0.4646	5.3177
Dentro de los grupos	0.00114	8	0.0001426			
Total	0.00122	9				

Fuente: elaboración propia (2018)

Para el análisis ANOVA de un factor se utilizó un nivel de significación de 5% y como se puede observar: el valor de F obtenido es menor que el valor de F crítica ($0.5898 < 5.3177$), por lo tanto, no existe diferencia significativa en la concentración determinada para la prueba de hipótesis.

Con base en el análisis ANOVA y el resultado obtenido del análisis: se acepta la hipótesis nula ya que cumple con las condiciones establecidas $H_0: 0.900 \leq 0.994 \leq 1.100$. Además, se confirma el correcto funcionamiento del método evaluado.

V. Discusión de Resultados

El presente estudio demuestra que el método para la cuantificación de mercurio en aguas residuales vía espectrofotometría UV, con técnica de vapor en frío, es un método confiable y práctico para su implementación dentro de un laboratorio. El objetivo principal fue la verificación de dicho método mediante el análisis de parámetros de desempeño seleccionados. Además, se cuantificó una muestra problema para la confirmación del buen funcionamiento del método.

Este método es uno de los métodos más útiles para la determinación de mercurio ya que aprovecha la baja solubilidad del mercurio en la mezcla de reacción y su alta presión de vapor (2×10^{-3} torr a 25°C). Villanova y Sogorb (2004). El mercurio es el único elemento que a temperatura ambiente puede ser llevado a su estado atómico basal, esto puede ser provocado por la acción de agentes reductores como el NaBH_4 o el SnCl_2 . Este último es el que se utiliza en el método actual. Villegas, Acereto y Vargas (2006)

El método se divide en tres fases, la primera fase es la fase de digestión, la muestra a analizar se digiere con una mezcla de ácido nítrico, ácido sulfúrico, Peroxodisulfato de potasio y permanganato de potasio. Este tratamiento convierte al mercurio en sales de mercurio (II). Luego, el mercurio de estas sales se reduce a estado metálico con una mezcla de cloruro de hidroxilamonio y cloruro de estaño. Una vez finalizado el proceso de reducción, inicia la fase dos (reacción de vapor en frío), en donde aprovechando las propiedades del mercurio se bombea aire a través de la disolución para llevar el vapor resultante, que contiene mercurio, a través de una columna de absorción quien solamente deja pasar al mercurio y aire, hasta una probeta, en donde el vapor de mercurio es convertido en cloruro de mercurio. Villanova y Sogorb (2004). Es aquí en donde inicia la tercera fase (fase del análisis colorimétrico), la solución colectada en la probeta se hace reaccionar con los reactivos identificados en el Diagrama 3, y se realiza la lectura de la concentración de mercurio en un espectrofotómetro UV.

El objeto de estudio es un método normalizado que fue afectado por una alteración menor, la cual fue el cambio del espectrofotómetro de lectura. Por esta razón surgió la necesidad de confirmar la confiabilidad del método. De acuerdo con la Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010), la verificación tiene como objetivo comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y lo utiliza correctamente. Por lo tanto, para determinar la confiabilidad del método se decidió realizar una verificación de este, empleando únicamente las pruebas que evidencien que la variación realizada no afecta al método.

Para poder demostrar validez del método se seleccionaron los siguientes parámetros de desempeño: límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, precisión y exactitud. Estos parámetros son considerados básicos para poder confirmar la validez del método y fueron seleccionados con base en el Anexo E.

Previo al análisis de los parámetros de desempeño establecidos fue necesario la preparación de las muestras con el estándar de referencia. Para el estudio se utilizó una solución estándar de referencia certificada, con concentración de 1000 ± 10 mg/L de Hg^{+2} .

Primero fue necesario diluir el estándar de referencia de 1000 ± 10 mg/L de Hg^{+2} , hasta una concentración de 0.1 mg/L de Hg^{+2} , de acuerdo con el procedimiento establecido en el Diagrama 5. Es a partir de esta concentración del estándar de referencia que se preparan las distintas diluciones necesarias para la preparación de las muestras a evaluar. Para evaluar los parámetros de desempeño establecidos era necesario preparar muestras contaminadas con el estándar de referencia, en distintas concentraciones. Estas muestras fueron preparadas utilizando agua desmineralizada empleando el procedimiento detallado en el Diagrama 4.

Una vez preparada la muestra, se procede al análisis de esta y así evaluar los diferentes parámetros de desempeño. El método para la cuantificación de mercurio consta de tres fases: fase de digestión, fase de vapor en frío y fase de lectura en espectrofotómetro. Para el análisis de los parámetros de desempeño el método inicia desde la fase dos ya que la muestra se encuentra contaminada y con los iones de mercurio libre. En los Diagrama 1, 2 y 3 se detalla el procedimiento que lleva cada una de las fases del método.

El primer parámetro de desempeño evaluado fue la linealidad del método. Para establecer la linealidad se prepararon 6 muestras del estándar de referencia con las siguientes concentraciones: 0.1 $\mu\text{g/L}$, 1.0 $\mu\text{g/L}$, 1.5 $\mu\text{g/L}$, 2.0 $\mu\text{g/L}$, 2.5 $\mu\text{g/L}$ y 3.0 $\mu\text{g/L}$. Para cada una de estas concentraciones se realizaron dos corridas, obteniendo como resultado dos absorbancias por punto analizado, las cuales se muestran en la Tabla 7. A partir de estos datos se calculó la media de las absorbancias obtenidas en las dos corridas realizadas. (Ver Tabla 8)

En el Diagrama 7, se muestra la curva de calibración del método, construida con los datos de la Tabla 8. A simple vista se puede observar un comportamiento lineal, y para poder confirmar dicho comportamiento se utilizó el criterio del coeficiente de determinación que debía ser mayor a 0.9950 ($r^2 \geq 0.9950$). El valor experimental del coeficiente de determinación es de 0.9977, por lo tanto, se confirma que el método en un rango entre 0.0 $\mu\text{g/L}$ y 3.0 $\mu\text{g/L}$ presenta un comportamiento lineal. Además, en el Diagrama 7, se presenta la ecuación lineal de la curva de calibración, la cual es: ($y = 0.1796x + 0.6593$). Se consideró que no era necesario realizar otra prueba de confinación para aceptar la linealidad del método ya que el coeficiente de determinación experimental superó considerablemente el criterio establecido.

Al obtener la linealidad del método se estableció el límite de detección y el límite de cuantificación. El límite de detección establece la concentración mínima que el método es capaz de detectar, y el límite de cuantificación establece la concentración mínima que el método es capaz de cuantificar, es decir de arrojar un valor cercano al real. Para determinar dichos límites se realizaron 6 repeticiones utilizando la concentración más baja que el método permita, para este caso la concentración más baja utilizada fue de 0.10 $\mu\text{g/L}$.

En la Tabla 9, se muestra que el límite de detección (LOD) del método es 0.039µg/L, y el límite de cuantificación (LOQ) es 0.119 µg/L.

Luego, se evaluó el rango de medición del método. Según la Guía Eurachem (2016), el rango o intervalo de trabajo es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. Este se estableció con base en el límite de cuantificación y la linealidad del método. En la Tabla 10, se puede observar que el rango de medición del método es de 0.119 µg/L a 3.000 µg/L.

Como ya se mencionó, el método en cuestión es un método normalizado, el cual tiene un rango de medición de 0.1 µg/L a 2.5 µg/L. Se puede observar que este rango es similar al rango experimental encontrado, pero con la variación que el método verificado utiliza dos decimales más. Este aumento en los decimales es provocado por el espectrofotómetro UV utilizado, ya que tiene la capacidad de entregar hasta tres decimales, lo cual hace que el método presente valores más exactos. Es por esta razón que, los resultados de concentración presentados en la sección anterior cuentan con esta cantidad de decimales.

Según la Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010), la precisión de un método puede ser determinada en términos de repetibilidad y/o reproducibilidad. Para la determinación de la precisión del método en cuestión se realizó la prueba de repetibilidad, está consistió en realizar 5 repeticiones de una muestra de concentración constante (1.000 µg/L). Como se observa en la Tabla 11, la media de los datos obtenidos fue de 0.994 µg/L, la desviación estándar de 0.0169 µg/L y el coeficiente de variación de 1.70%. El criterio utilizado para establecer la precisión del método fue el siguiente: $\%CV < \%CV_H / 2$. Maroto (2002). A pesar de que el coeficiente de variación de Horwitz es utilizado comúnmente para establecer la reproducibilidad de un método, este también puede ser utilizado para establecer la repetibilidad, utilizando como límite la mitad del coeficiente encontrado. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010). Sí el $\%CV$ cumple esta condición se puede concluir que el método es altamente preciso. De acuerdo con la Tabla 11, el $\%CV_H$ fue de 5.66%, la mitad de este valor es de 2.83%, por lo tanto, se cumple con la condición antes mencionada ($1.70\% < 2.83\%$), y se concluye que el método es altamente preciso.

De acuerdo con la Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010), cuando el termino exactitud se relaciona con un método de ensayo, se refiere a una combinación entre veracidad y precisión. Es decir, para concluir que un método es exacto tiene que ser altamente preciso y veraz. Por ello, previo a la determinación de la exactitud, fue necesario determinar la veracidad del método. Esta fue determinada utilizando los datos obtenidos para determinar la precisión del método. Se encontró el sesgo que existía entre cada uno de estos datos y para confirmar la veracidad del método se realizó la prueba con la t-Student. El criterio de aceptación fue el siguiente: $t_{\text{experimental}} < t_{\text{crítica}}$. Como se puede observar en la Tabla 12, el valor de la t-experimental es de -0.768 y el valor de la t-crítica con un nivel de significancia de 5% y 4 grados de libertad es de 2.132 ($-0.768 < 2.132$). Por esta razón, se acepta la prueba de la t-Student y se comprueba que no existe una diferencia significativa

entre los datos obtenidos. Al analizar los resultados obtenidos de repetibilidad y sesgo mediante la t-Student, se concluyó que el método es exacto.

Para determinar la incertidumbre del método primero se construyó un diagrama de Ishikawa (Ver Diagrama 6), en donde se identificaron las posibles fuentes generadoras de incertidumbre. Luego, para cuantificar la incertidumbre del método se consideraron dos tipos de error: errores tipo A (Aleatorios) y errores tipo B (Sistemáticos). Los errores tipo A son provocados por las mediciones realizadas en la experimentación, es decir, todas las repeticiones realizadas para encontrar los parámetros de desempeño y los estudios estadísticos involucrados. Por otro lado, los errores tipo B son los errores ocasionados por el uso de material volumétrico, equipo gravimétrico y equipos de mediciones específicas. Estos errores se obtienen a partir de datos puntuales que brinda el fabricante mediante certificaciones de calibración. Una vez identificadas las fuentes considerables de incertidumbre se procedió al cálculo. Dentro de los errores de tipo A se consideró el error generado por las repeticiones realizadas para determinar la linealidad del método y las repeticiones realizadas para determinar la precisión y exactitud del método.

Dentro de los errores de tipo B, se consideraron las incertidumbres aportadas por: balanza analítica, pipetas, probetas y espectrofotómetro, siendo este último quien aporta la mayor cantidad de incertidumbre (0.15 adimensional). Una vez cuantificadas las incertidumbres se procedió a calcular la incertidumbre combinada, la cual da un valor de $\pm 0.033 \mu\text{g/L}$. Luego, se calculó la incertidumbre expandida utilizando un valor de cobertura de 2 ($K=2$) con un nivel de confianza del 95%, obteniendo una incertidumbre de $\pm 0.066 \mu\text{g/L}$. De acuerdo con método normalizado la incertidumbre es de $\pm 0.05 \mu\text{g/L}$, y como se puede observar, la incertidumbre del método en cuestión aumentó ($\pm 0.066 \mu\text{g/L}$). Este aumento, se debe principal al cambio del espectrofotómetro UV, ya que como se mencionó anteriormente, este es quien aporta mayor incertidumbre al método. A pesar de este aumento, el sesgo entre estos valores es mínimo ($0.016 \mu\text{g/L}$) y los valores de incertidumbre no supera la unidad, por lo que se considera que el método no deja de ser confiable y se acepta este valor de incertidumbre.

Por último, para confirmar el buen funcionamiento y ejecución del método, se adicionó a una muestra libre de mercurio estándar de referencia con concentración de $1.0 \mu\text{g/L}$ para utilizarla como muestra problema y determinar su concentración. Por esta razón se planteó la siguiente hipótesis nula: “La muestra problema presentó una concentración entre $0.900 \mu\text{g/L}$ y $1.100 \mu\text{g/L}$ ”.

Se realizaron 5 mediciones de la muestra problema para determinar la media de los valores obtenidos (ver Tabla 14) que dio un valor de $0.994 \mu\text{g/L}$. Como se puede observar, el valor obtenido se encuentra dentro del rango establecido en la hipótesis nula. Para confirmar y dar validez a este resultado, se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) a los valores obtenidos (ver Tabla 15). Este análisis prueba la hipótesis de que las medias de dos o más poblaciones son iguales.

Se utilizó un nivel de significación de 5% y como se puede observar, el valor de F obtenido es menor que el valor de F crítica ($0.5898 < 5.3177$), por lo tanto, no existe diferencia significativa en la concentración determinada para la prueba de hipótesis. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula y con esto se confirma el buen funcionamiento y ejecución del método.

Cabe destacar que se utilizaron muestras de agua residual y agua destilada para preparar la muestra contaminada y no una muestra de valor conocido debido a la limitante de no contar con una muestra contaminada. Además, si existirá una muestra de agua residual contaminada con mercurio, se estaría incurriendo en un problema grave de impacto ambiental. Con esto se comprobó que no existió una alteración significativa en la preparación de la muestra problema al variar el agua utilizada.

Por otro lado, al contar con el método verificado el laboratorio en donde se realizó el estudio procedió con la determinación del costo de análisis de mercurio, el cual es menor al costo de subcontratar dicho análisis. La reducción del costo de análisis se dio en un 22%, beneficiando claramente al laboratorio privado. Es de resaltar que los datos de los costos no se presentaron en la investigación a solicitud de la empresa privada en donde se realizó el estudio.

VI. Conclusiones

1. El método para la determinación de mercurio en aguas residuales vía espectrofotometría UV con técnica de vapor en frío, es un método válido de acuerdo con todos los parámetros de desempeño evaluados, para un rango de medición de 0.119 µg/L a 3.000 µg/L.
2. El método para la cuantificación de mercurio es un método lineal, con un coeficiente de determinación de 0.9977, con un límite de detección de 0.039µg/L y un límite de cuantificación de 0.119 µg/L.
3. El método para la cuantificación de mercurio es un método preciso, con un coeficiente de variación 1.70%, menor al límite de 2.83% en cuanto a repetibilidad. Y es un método exacto con una desviación de ± 0.0169 y aceptado mediante la prueba t-Student.
4. El método presenta una incertidumbre de ± 0.066 µg/L, identificada a partir de las repeticiones realizadas para la verificación y los equipos utilizados.
5. La concentración media obtenida del análisis de una muestra problema es de 0.994 ± 0.066 µg/L, aceptando el valor de la prueba de hipótesis nula esperado.
6. Existe una reducción de costos del 22% al realizar el análisis dentro del laboratorio en comparación con subcontratarlo.

VII. Recomendaciones

1. Evaluar los parámetros de desempeño de reproducibilidad y robustez para ampliar el alcance de verificación del método y dar mayor confiabilidad al mismo.
2. Obtener un material de referencia certificado internacionalmente y avalado por los entes de reguladores nacionales para ampliar el alcance del método y poder optar a una acreditación de este.
3. Mantener el área de trabajo lo más limpio posible durante la ejecución del método para evitar la contaminación cruzada. Además, utiliza el EPP apropiado dentro del laboratorio y tener una bata y guantes específicos para el análisis de mercurio debido a que es un compuesto letal.
4. Almacenar todo el material de descarte generado durante la ejecución del método en recipientes de vidrio o plástico y evitar descartar directamente al drenaje. Se recomienda subcontratar una empresa que se encargue del buen manejo de los desechos.
5. Utilizar azufre en polvo en caso de que exista un derrame de una muestra contaminada para absorber la mayor cantidad de mercurio y recoger el sobrante con material descartable.
6. Mantener la columna de absorción de mercurio húmeda mientras no se utilice; dejar el Erlenmeyer esmerilado en la parte inferior y cubrir la parte superior con tapón esmerilado para evitar la contaminación de esta.
7. Lavar toda la cristalería utilizada durante el proceso cada vez que se utiliza. Utilizar una solución 1:1 de ácido clorhídrico para los lavados y enjuagar en varias ocasiones con agua desmineralizada.
8. Evaluar todos los requerimientos de la Norma ISO 17025:2017 al momento que el laboratorio quiera optar para una acreditación del método.
9. Solicitar al proveedor la modificación de las fichas técnicas de los reactivos utilizados proporcionando las concentraciones y los reactivos utilizados en la ejecución del método.

VIII. Referencias

- Acuerdo Gubernativo No. 236 (2006). "Reglamento de las descargas y reuso de aguas residuales y de la disposición de lodos. Mayo. Guatemala".
- Arcila, A. (2012). Determinación de mercurio por espectrofotometría de absorción atómica-vapor frío para agua (tratada y cruda). Informe de validez de mercurio en agua tratada y cruda. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia.
- Arias, L. (2014). Validación de un método analítico para la cuantificación de vitamina A en alimentos, por cromatografía líquida de alta resolución y su determinación en guayaba fresa (*Psidium cattleianum sabine*). Universidad Rafael Landívar. Guatemala.
- Banco de Guatemala. Departamento de estadísticas macroeconómicas. Sección de cuentas nacionales. (2018). Producto Interno Bruto trimestral. Tercer trimestre 2017. Guatemala.
- COGUANOR NTG/ISOIEC 17025. (2005). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. COGUANOR. Guatemala.
- Cuellar, E. y Mena, K. (2010). Determinación del contenido de mercurio por espectrofotometría de absorción atómica de vapor frío en atún enlatado comercializado en la ciudad de Santa Ana. Universidad de El Salvador. Facultad de química y farmacia. El Salvador.
- Duffau, B., et. al. (2010). Guía técnica No. 1. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Santiago de Chile, Chile.
- García, C. (2010). Determinación de mercurio por generación de vapor frío y detección vía absorción y fluorescencia atómica. Universidad Simón Bolívar. Venezuela.
- García, L. (2012). Evaluación del tratamiento terciario actual de la planta de tratamiento de aguas residuales del campus central de la Universidad Rafael Landívar para determinar la remoción de la carga microbiológica contaminante en la descarga hacia el río Contreras. Universidad Rafael Landívar, Guatemala.
- González, M. (2010). Transmitancia y absorbancia. España.
- HACH Company. (1997). Método 10065: Método por vapor en frío para la determinación de mercurio.

- Maroto, A. (2002). Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. Universidad Rovira I Virgili. Tarragona, España.
- McCabe, W., Smith, H. y Harriot, P. (2007). Operaciones Unitarias en Ingeniería Química, (7ma. Ed). México: McGraw-Hill.
- Mercader, F., Herrera, R. y Carrasco, J. (2008). Validación del método de medición de Hg en agua por espectrofotometría de absorción atómica con sistema de generación de vapor frío utilizando amalgamación en trampa de oro como medio de preconcentración. Centro Nacional de metrología. México.
- Morillas, P. y colaboradores. (2016). Guía EURACHEM: La adecuación al uso de los métodos analíticos. Una guía de laboratorio para validación de métodos y temas relacionados. (1ra. Ed. En español) Eurolab. España.
- OGA-GEC-016. (2007). Política de selección y validación de métodos de ensayo. Consultado en internet el 23 de mayo de 2018 a las 17:24 horas, en: <http://oga.org.gt/images/files/File/OGA-GEC-016.pdf>
- Pérez, V. (2014). Muestreo y preparación de la muestra. Editorial Síntesis. Madrid, España.
- Poulin, J. y Gibb, H. (2008). Mercurio: Evaluación de la carga de morbilidad ambiental a nivel nacional y local. Editora Prüss-Üstün A. OMS, Ginebra.
- Real Academia Española. (s.f). Varios términos. Consultado en internet el 26 de mayo del 2018 a las 19:47 horas, en: <http://dle.rae.es/>
- Reglamento Técnico Centroamericano. (2006). RTCA 11.03.39:06: Productos farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos. Guatemala.
- Rodríguez, G. (2011). Validación de tres métodos analíticos espectrofotométricos para la determinación de la calidad del agua en una planta generadora de energía eléctrica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Schmid, W., y Martínez, R. (2010). Guía para estimar la incertidumbre de la medición. CENAM. Ciudad de México, México.

Simon, E. (2008). Los metales pesados en las aguas residuales. Grupo de fisicoquímica de procesos industriales y medioambientales. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. Consultado en internet el 24 de mayo de 2018 a las 13:20 horas, en: <http://www.madrimasd.org/blogs/remtavares/2008/02/02/83698>

Tabla: Áreas acumuladas de la distribución t-Student. (s.f.). Consultado en internet el 27 de julio de 2018 a las 14:24 horas, en: <http://www-eio.upc.edu/teaching/estad/MC/taules/TStud.pdf>

UNODC. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Nueva York, Estados Unidos.

Villanova, E. y Sogorb, M. (2004). Técnicas analíticas de contaminantes químicos. Aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias. Editorial Díaz de Santos. España.

Villegas, W., Acereto, P. y Vargas, M. (2006). Análisis Ultravioleta-visible. La teoría y la práctica en el ejercicio profesional. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán. México.

IX. Anexos

9.1. Glosario

1. Aguas residuales: las aguas que han recibido uso y cuyas calidades han sido modificadas. Acuerdo gubernativo 236-2006.
2. Análisis cuantitativo: análisis que se emplea para determinar la cantidad de cada elemento o ingrediente en una sustancia. (RAE, 2018).
3. Analito: sustancia (química, física o biológica) buscada o determinada en una muestra, que debe ser recuperada, detectada o cuantificada por el método. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010).
4. Calidad: propiedad o conjunto de propiedades inherentes a algo, que permiten juzgar su valor. (RAE, 2018).
5. Coeficiente de variación: desviación estándar relativa, expresada en porcentaje. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010).
6. Diluir: disminuir la concentración de una disolución añadiendo un disolvente. (RAE, 2018).
7. Incertidumbre: parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mesurando. Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010).
8. Medir: determinar la dimensión, medir. (RAE, 2018).
9. Método: procedimiento que se sigue en las ciencias para hallar la verdad y enseñarla. (RAE, 2018).
10. Muestra: la parte representativa, a analizar, de las aguas residuales, aguas para reuso o lodos. Acuerdo gubernativo 236-2006.
11. Parámetro: la variable que identifica una característica de las aguas residuales, aguas para reuso o lodos, asignándoles un valor numérico. Acuerdo gubernativo 236-2006.

9.2. Anexo A. Datos recolectados y clasificados.

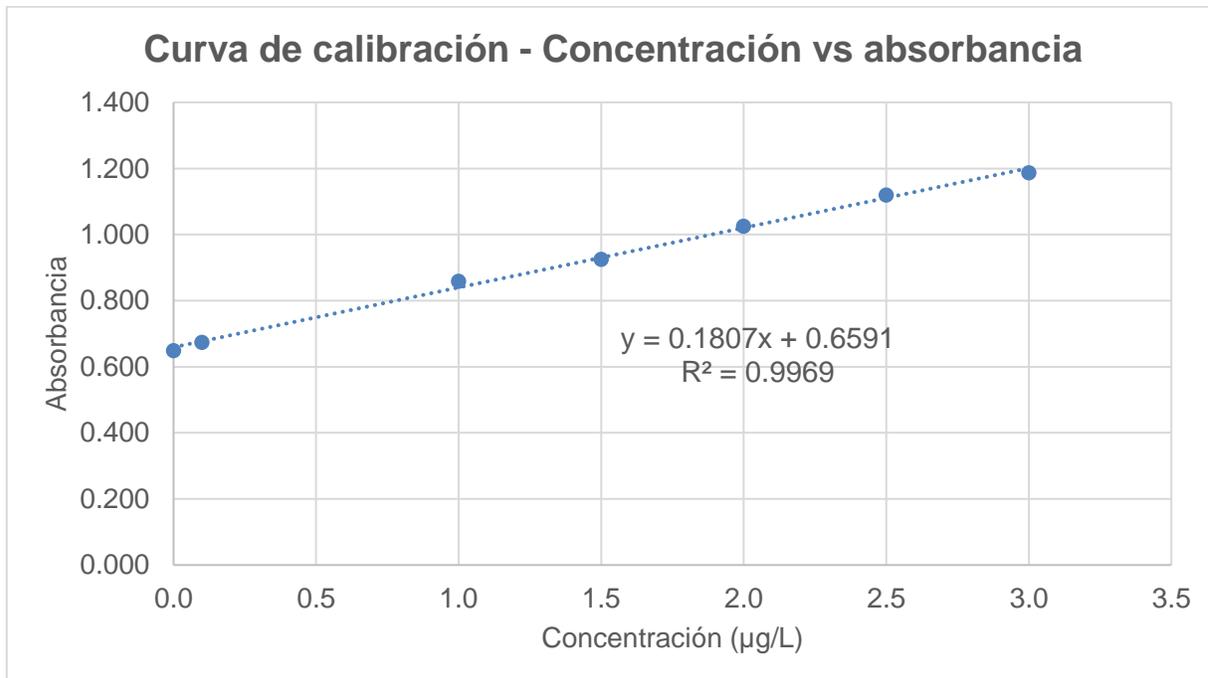
A continuación, se muestran los datos obtenidos durante la ejecución de los experimentos detallados en la Tabla 6.

Tabla 16. Datos de primera corrida para la determinación de linealidad.

#	Concentración (µg/L)	Absorbancia
0	0.0	0.649
1	0.1	0.674
2	1.0	0.859
3	1.5	0.925
4	2.0	1.025
5	2.5	1.120
6	3.0	1.187

Fuente: elaboración propia (2018)

Diagrama 8. Curva de calibración de datos primera corrida de linealidad.



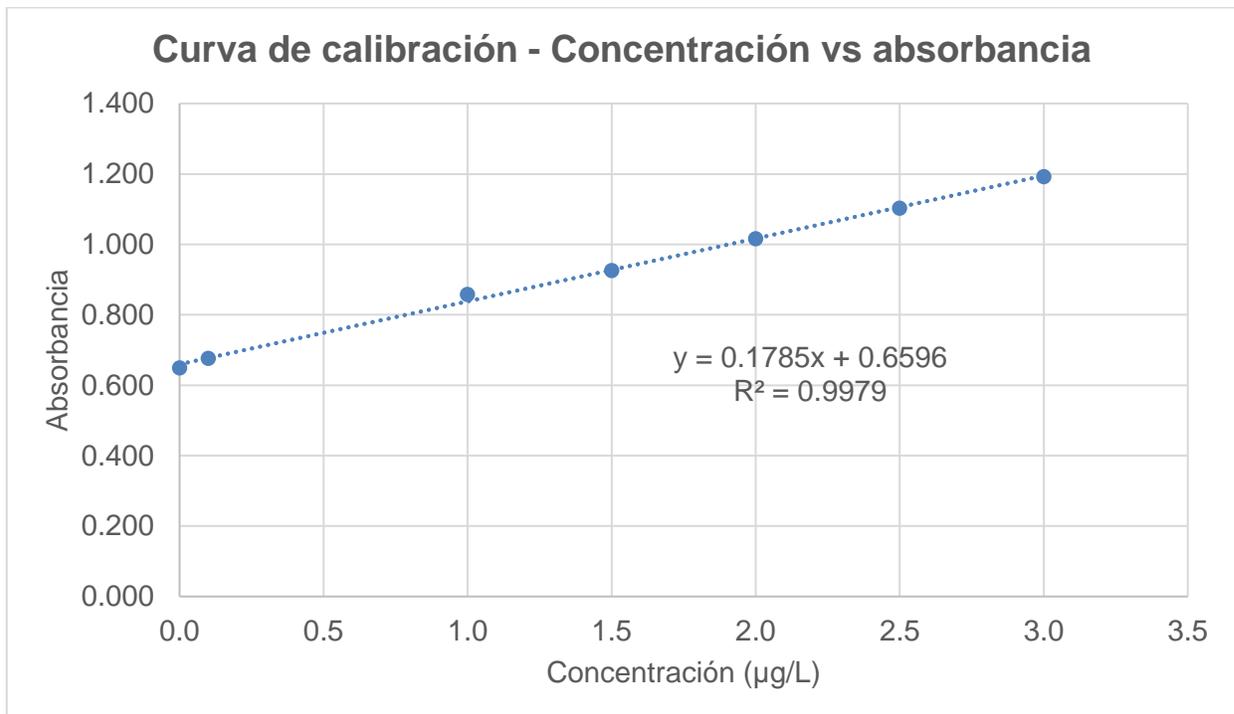
Fuente: elaboración propia con base en Tabla 15 (2018)

Tabla 17. Datos de segunda corrida para la determinación de linealidad.

#	Concentración (µg/L)	Absorbancia
0	0.0	0.649
1	0.1	0.676
2	1.0	0.858
3	1.5	0.926
4	2.0	1.016
5	2.5	1.103
6	3.0	1.192

Fuente: elaboración propia (2018)

Diagrama 9. Curva de calibración de datos segunda corrida de linealidad.



Fuente: elaboración propia con base en Tabla 16 (2018)

Tabla 18. Datos originales para la determinación de los límites del método.

#	Concentración (µg/L)	Absorbancia
1	0.096	0.676
2	0.096	0.676
3	0.085	0.674
4	0.101	0.677
5	0.113	0.679
6	0.079	0.673

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 19. Datos originales para la determinación de la precisión y exactitud.

#	Concentración (µg/L)	Absorbancia
1	0.982	0.836
2	1.014	0.841
3	0.974	0.834
4	0.993	0.838
5	1.008	0.840

Fuente: elaboración propia (2018)

9.3. Anexo B1 Muestra de cálculo.

Muestra de cálculo para el límite de detección.

Se calculó la media y la desviación estándar de los valores obtenidos durante la experimentación.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} = \frac{0.096 + 0.096 + 0.085 + 0.101 + 0.113 + 0.079}{6} = \mathbf{0.095 \mu g/L}$$

$$S_o = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} = \mathbf{0.0119}$$

$$S_o = \sqrt{\frac{(0.001)^2 + (0.001)^2 + (-0.01)^2 + (0.006)^2 + (0.018)^2 + (-0.016)^2}{6 - 1}}$$

Previo a la determinación del límite de detección se calculó el valor crítico. Este se determinó utilizando un nivel de confianza del 95%, con grados de libertad infinito.

$$LC = t(1 - \alpha; v) * S_o \quad \text{Sí: } t(0.05, \infty) \rightarrow 1.645$$

$$LC = 1.645 * S_o = 1.645 * 0.0119 = \mathbf{0.0195 \mu g/L}$$

A partir de esto, se calculó el límite de detención con la siguiente ecuación.

$$LOD = 2 * LC * S_o \quad \text{Sí: } LC = 1.645 * S_o$$

$$LOD = 3.29 * S_o = 3.29 * 0.0119 = \mathbf{0.0391 \mu g/L}$$

LC = Valor crítico

t = t Student

1 - α = Probabilidad b

v = grados de libertad

LOD = Límite de detección

S_o = Desviación estándar

X̄ = Media de los valores

X_i = Valores obtenidos en las lecturas

n = Número de valores obtenidos en las lecturas.

Muestra de cálculo el límite de cuantificación.

Se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$LOQ = 10 * S_o = 10 * 0.0119 = \mathbf{0.119 \mu g/L}$$

$LOQ = \text{Límite de cuantificación}$

$S_o = \text{Desviación estándar}$

Se consideró que, cualquier medición que se realice dará un valor que presentará una desviación estándar relativa del 10%. Este valor puede variar y se adecuará según lo considere el analista.

Muestra de cálculo para la determinación de la precisión

Se realizaron 5 repeticiones utilizando una muestra problema contaminada con el estándar de referencia de Hg, para determinar la precisión del método mediante su repetibilidad. Con los datos obtenidos se obtuvo la media y la desviación de los datos y se calculó el porcentaje del coeficiente de variación.

$$\%CV = \frac{S_o}{\bar{X}} = \frac{0.0119}{0.095} * 100 = \mathbf{12.51\%}$$

$\%CV = \text{Porcentaje coeficiente de variación}$

$S_o = \text{Desviación estándar}$

$\bar{X} = \text{Media de los datos obtenidos}$

Luego, se calculó el coeficiente de variación máximo que indica el porcentaje máximo para establecer que el método es altamente preciso. Este se determinó mediante el coeficiente de variación de Horwitz.

$$\%CV_H = 2^{[1-(0.5*\log(z))]} = 2^{[1-(0.5*\log(\frac{0.994}{1000}))]} = \mathbf{5.66\%}$$

$\%CV_H = \text{Porcentaje coeficiente de variación de Horwitz.}$

$z = \text{Dato promedio de la concentración en } \frac{mg}{L}.$

Por último, se utilizó el siguiente criterio para determinar la precisión del método.

$$\text{Sí} \rightarrow \%CV < \frac{\%CV_H}{2} \rightarrow \text{El método es altamente preciso.}$$

*El coeficiente de Horwitz es utilizado para determinar la precisión mediante la reproducibilidad. Para utilizarlo como un parámetro de criterio de repetibilidad se utiliza la mitad de este valor, por esta razón se planteó el criterio anterior.

Muestra de cálculo para la determinación de la exactitud

Previo a la determinación de la exactitud se realizó la determinación de la veracidad del método. Para determinar la veracidad del método se determinó el sesgo de los valores de concentración obtenidos.

$$s = (X - X_T) = (0.982 - 1) = -\mathbf{0.018}$$

$s = \text{Sesgo}$

$X = \text{Concentración obtenida de cada repetición}$

$X_T = \text{Concentración teórica del estándar de referencia}$

Para confirmar la veracidad del método se realizó una prueba de t-Student bajo el siguiente criterio:

$$t_{exp} < t_{ref}$$
$$t_{exp} = \frac{X - X_T}{S/\sqrt{n}} = \frac{0.994 - 1}{0.0169/\sqrt{5}} = -\mathbf{0.768}$$

$t_{exp} = t$ calculada a partir de datos experimentales

$X_T = \text{Concentración del estándar de referencia}$

$X = \text{Concentración promedio de los datos experimentales}$

$S = \text{Desviación estándar de los datos experimentales}$

$n = \text{número de datos experimentales evaluados}$

El valor crítico (t_{ref}) se obtuvo del Anexo C, para un nivel de confianza del 95% y con 4 grados de libertad (n-1).

$$t_{exp} < t_{ref}$$
$$-0.768 < 2.132$$

Mediante esta prueba se confirma que el método es veraz, por lo tanto, es un método exacto al ser altamente preciso.

Muestra de cálculo para la determinación de la incertidumbre

Se determinaron dos tipos de errores para establecer la incertidumbre el método.

Error aleatorio (Tipo A): Este error es producido por las distintas repeticiones de las lecturas realizadas.

Incertidumbre de la ordenada (mediciones de linealidad)

$$u_i = \frac{S_o}{\sqrt{n}} = \frac{0.00035}{\sqrt{2}} = 0.00025$$

$u_i =$ incertidumbre estándar

$S_o =$ Desviación estándar de las mediciones

$n =$ número de mediciones

Incertidumbre de la pendiente (mediciones de linealidad)

$$u_i = \frac{S_o}{\sqrt{n}} = \frac{0.00156}{\sqrt{2}} = 0.0011$$

Incertidumbre de la repetición de mediciones del método.

$$u_i = \frac{S_o}{\sqrt{n}} = \frac{0.0169}{\sqrt{5}} = 0.0076$$

Error sistemático (Tipo B): Este error es producido por los equipos y el material volumétricos utilizado en la metodología.

Incertidumbre del espectrofotómetro.

$$u_i = \frac{Error}{\sqrt{3}} = \frac{0.15/3}{\sqrt{3}} = 0.0289$$

Incertidumbre de pipeta 10 mL.

$$u_i = \frac{Error}{\sqrt{3}} = \frac{0.025}{\sqrt{3}} = 0.0144$$

Incertidumbre combinada

$$u_{combinada} = \sqrt{(U_a)^2 + (U_b)^2}$$
$$= \sqrt{(0.00025)^2 + (0.0011)^2 + (0.0076)^2 + (0.0289)^2 + (0.00031)^2 + (0.0144)^2}$$

$$u_{combinada} = \mathbf{0.033}$$

$U_a =$ Incertidumbre tipo A

$U_b =$ Incertidumbre tipo B

Con el valor de la incertidumbre combinada se procedió a determinar la incertidumbre expandida del método. Se utilizó un nivel de confianza del 95%, lo cual da un factor de cobertura (k) de 2.

$$u_{expandida} = k * u_{combinada}$$

$$u_{expandida} = 2 * 0.033$$

$$u_{expandida} = \mathbf{0.066}$$

Anexo B2 Datos cálculos.

Tabla 20. Media de datos de la linealidad del método.

#	Concentración (µg/L)	Absorbancia
0	0.0	0.649
1	0.1	0.675
2	1.0	0.859
3	1.5	0.926
4	2.0	1.021
5	2.5	1.112
6	3.0	1.190

Fuente: elaboración propia (2018)

Tabla 21. Datos calculados para la determinación de los límites.

#	Concentración (µg/L)	Media	Desviación	LC	LOD	LOQ
1	0.096	0.095 µg/L	0.0119 µg/L	0.0195 µg/L	0.0391 µg/L	0.119 µg/L
2	0.096					
3	0.085					
4	0.101					
5	0.113					
6	0.079					

Fuente: elaboración propia con base en datos de Tabla 17 (2018)

Tabla 22. Datos calculados para la determinación de precisión y sesgo.

#	Concentración (µg/L)	Media	Desviación	CV%	Sesgo
1	0.982	0.994 µg/L	0.0169 µg/L	1.70%	-0.02
2	1.014				0.01
3	0.974				-0.03
4	0.993				-0.01
5	1.008				0.01

Fuente: elaboración propia con base en datos de Tabla 18 (2018)

Tabla 23. Datos calculados para la determinación de incertidumbre.

Descripción	Incertidumbre (u)
Ordenada	0.00025
Pendiente	0.0011
Repetibilidad	0.0076
Espectrofotómetro	0.0289
Balanza analítica	0.00031
Pipeta	0.0144
Incertidumbre combinada	0.033
Incertidumbre expandida	0.066

Fuente: elaboración propia (2018)

9.4. Anexo C. Tabla utilizada para prueba t-Student.

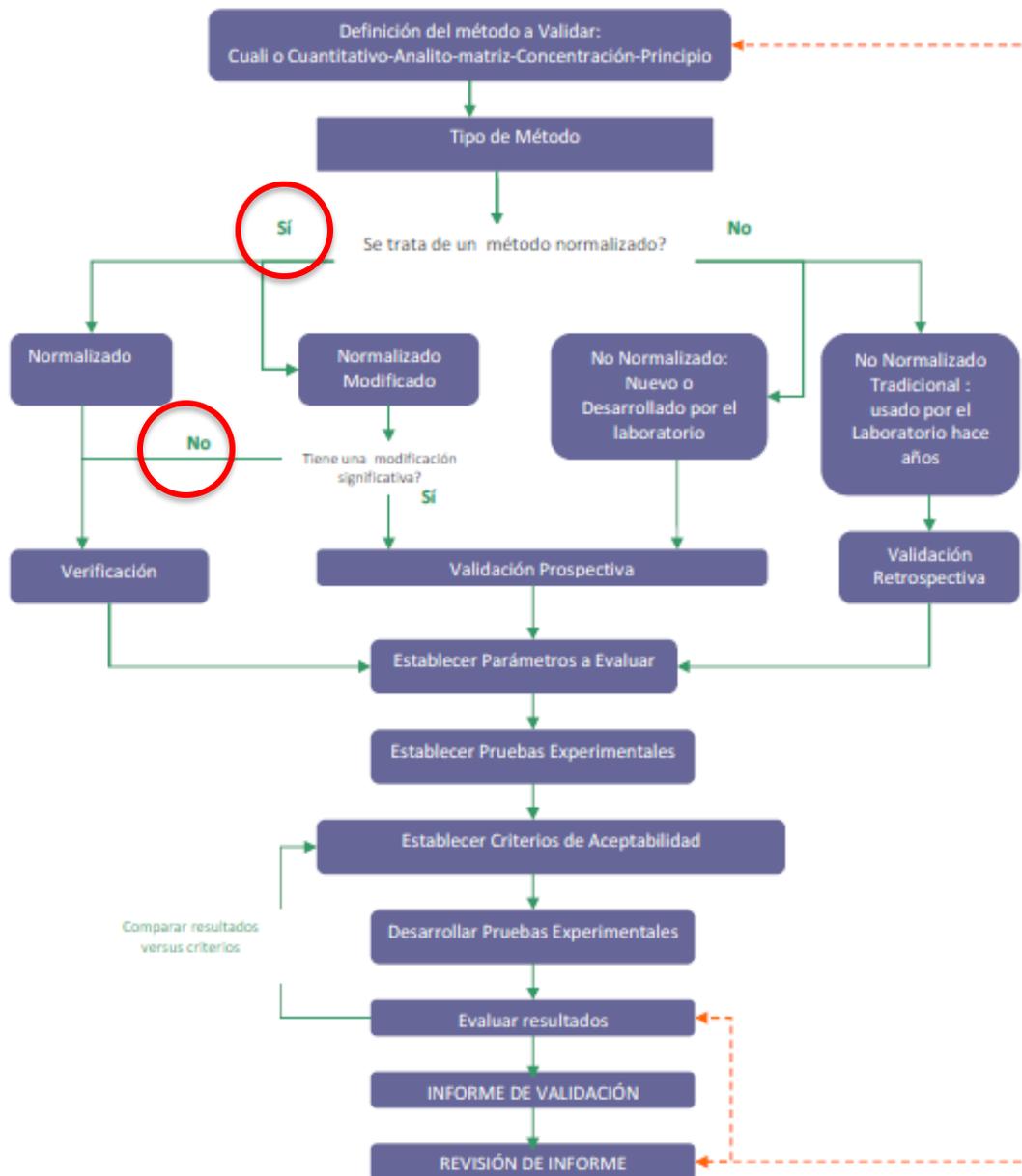
Diagrama 10. Valores para prueba t-Student.

v	0,6	0,75	0,9	0,95	0,975	0,99	0,995	0,9975	0,999	0,9995
1	0,325	1,000	3,078	6,314	12,706	31,821	63,656	127,321	318,289	636,578
2	0,289	0,816	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	14,089	22,328	31,600
3	0,277	0,765	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	7,453	10,214	12,924
4	0,271	0,741	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	5,598	7,173	8,610
5	0,267	0,727	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	4,773	5,894	6,869
6	0,265	0,718	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	4,317	5,208	5,959
7	0,263	0,711	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,029	4,785	5,408
8	0,262	0,706	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	3,833	4,501	5,041
9	0,261	0,703	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	3,690	4,297	4,781
10	0,260	0,700	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	3,581	4,144	4,587
11	0,260	0,697	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	3,497	4,025	4,437
12	0,259	0,695	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,428	3,930	4,318
13	0,259	0,694	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,372	3,852	4,221
14	0,258	0,692	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,326	3,787	4,140
15	0,258	0,691	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,286	3,733	4,073
16	0,258	0,690	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,252	3,686	4,015
17	0,257	0,689	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,222	3,646	3,965
18	0,257	0,688	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,197	3,610	3,922
19	0,257	0,688	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,174	3,579	3,883
20	0,257	0,687	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,153	3,552	3,850
21	0,257	0,686	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,135	3,527	3,819
22	0,256	0,686	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,119	3,505	3,792
23	0,256	0,685	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,104	3,485	3,768
24	0,256	0,685	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,091	3,467	3,745
25	0,256	0,684	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,078	3,450	3,725
26	0,256	0,684	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,067	3,435	3,707
27	0,256	0,684	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,057	3,421	3,689
28	0,256	0,683	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,047	3,408	3,674
29	0,256	0,683	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,038	3,396	3,660
30	0,256	0,683	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,030	3,385	3,646
40	0,255	0,681	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	2,971	3,307	3,551
60	0,254	0,679	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	2,915	3,232	3,460
120	0,254	0,677	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	2,860	3,160	3,373
∞	0,253	0,674	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	2,807	3,090	3,290

Fuente: Áreas acumuladas de la distribución t-Student. (s.f.).

9.5. Anexo D. Diagrama de flujo para el proceso de verificación

Diagrama 11. Diagrama de flujo para establecer el proceso de verificación.



Fuente: Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010).

9.6. Anexo E. Tabla guía para la selección de parámetros de desempeño.

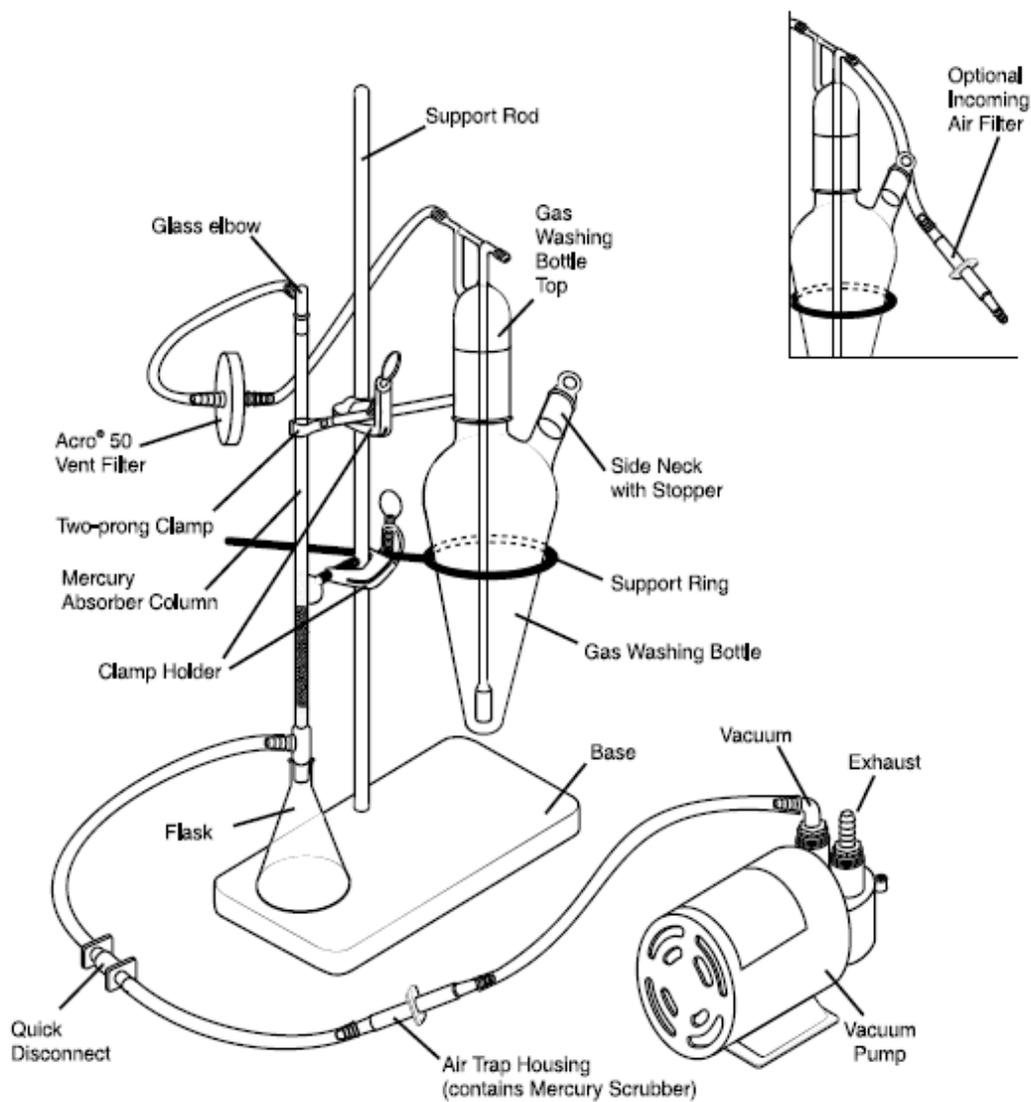
Diagrama 12. Guía para la selección de parámetros de desempeño.

PARAMETRO A EVALUAR	CARACTERISTICA(S)	METODO CUALITATIVO	METODO CUANTITATIVO		
			NORMALIZADO	MODIFICADO	NUEVO
SELECTIVIDAD	Identificación analito Interferencia de matriz	Sí	No	Sí	Sí
LINEALIDAD	Rango lineal	No	Sí	Sí	Sí
SENSIBILIDAD	Pendiente	No	Sí o No	Sí	Sí
LIMITES	Critico (LC) Detección (LOD) Cuantificación (LOQ)	Sí	Sí o No	Sí	Sí
PRECISION	Repetibilidad Reproducibilidad	No	Sí	Sí	Sí
VERACIDAD	Sesgo (s) Recuperación (R)	No	Sí o No	Sí o No	Sí
ROBUSTEZ	Test de Youden y Steiner	No	No	Sí o No	Sí
APLICABILIDAD	-----	Sí	Sí	Sí	Sí

Fuente: Guía Técnica N°1 del ISPCH (2010).

9.7. Anexo F. Ilustración del equipo para utilizado para reacción de vapor en frío.

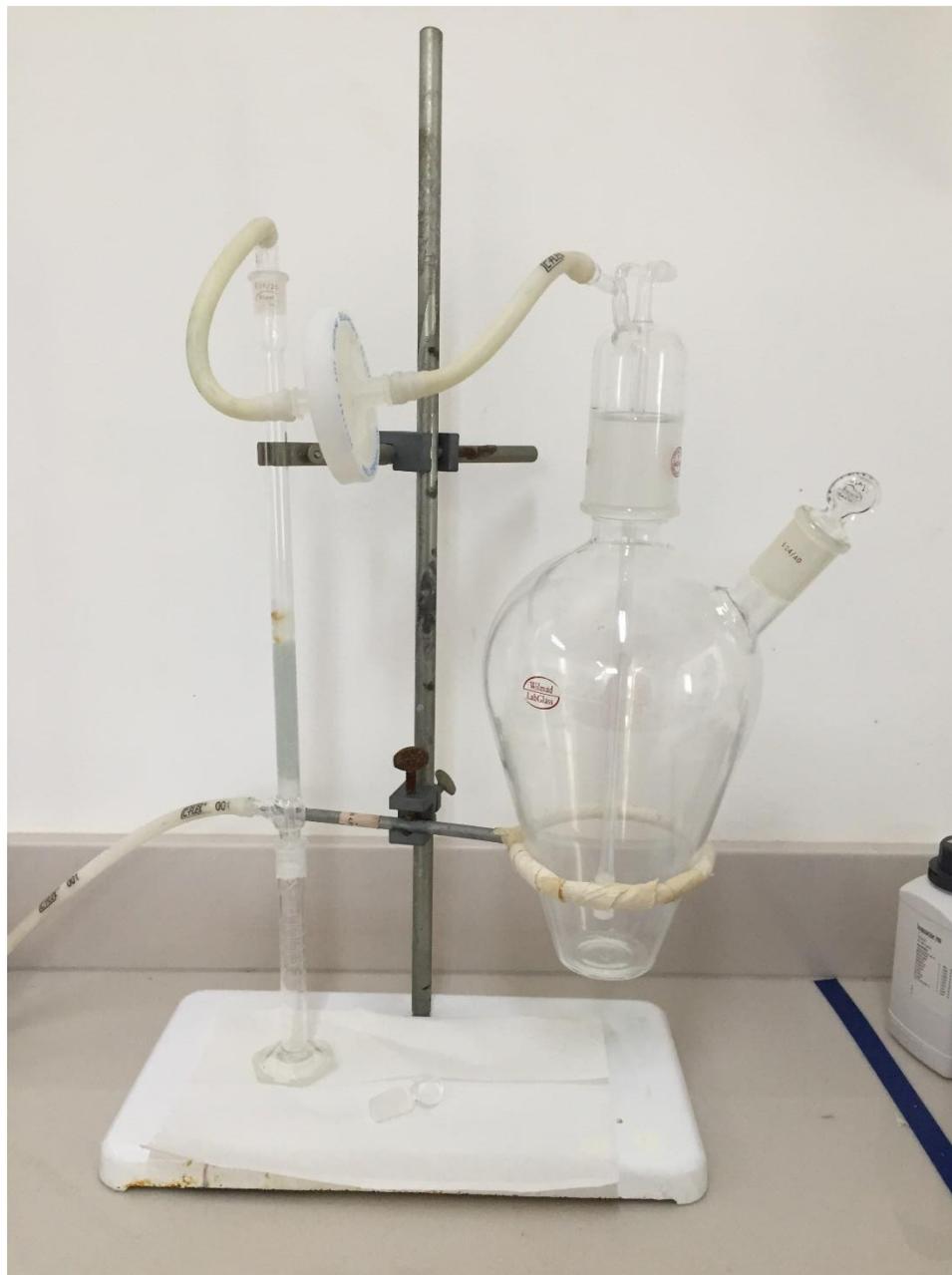
Figura 6. Ilustración de cristalería utilizada para reacción de vapor en frío.



Fuente: HACH Company (2018)

9.8. Anexo G. Ilustración real del equipo para reacción de vapor en frío.

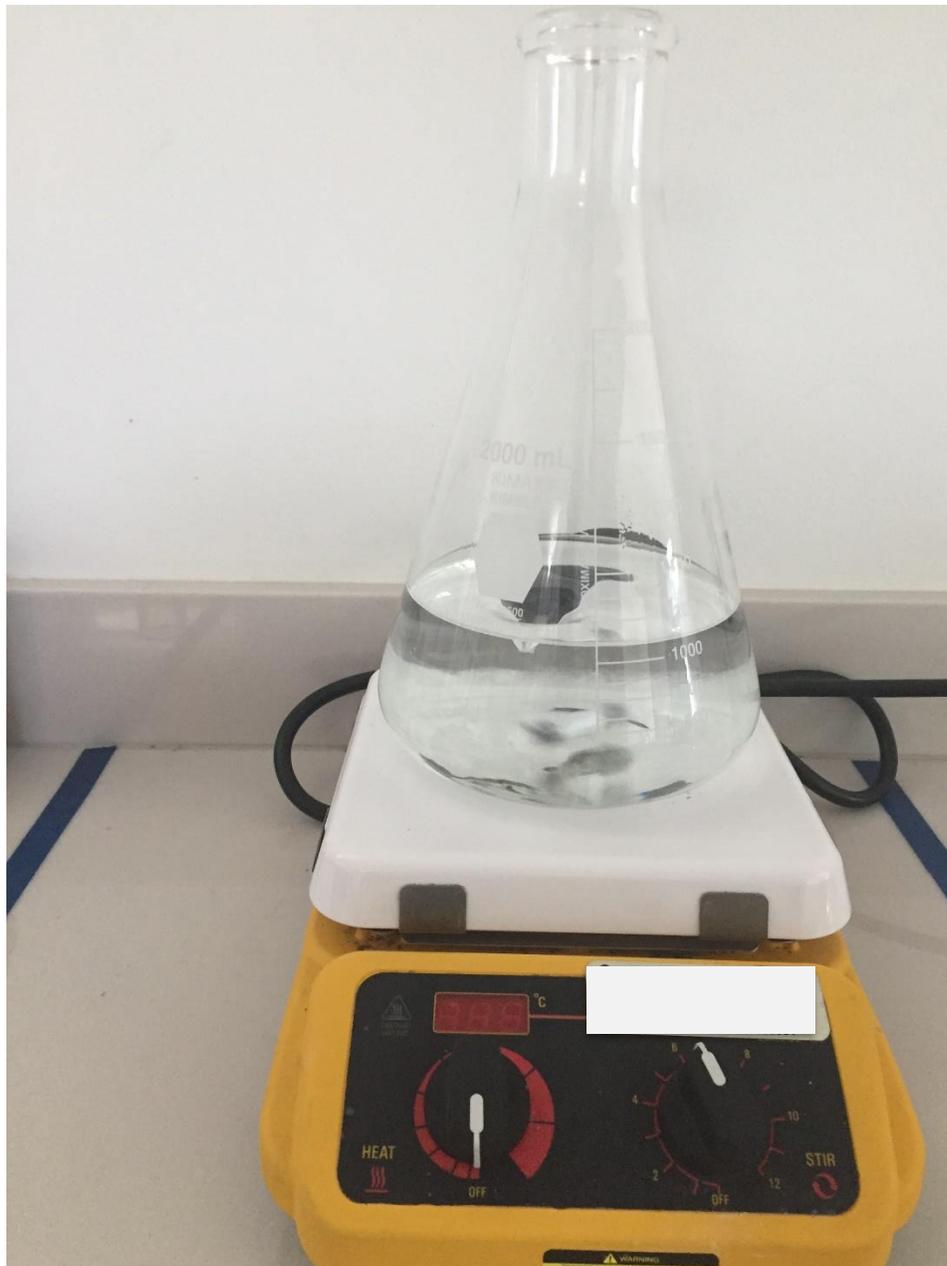
Figura 7. Cristalería utilizada para la reacción de vapor en frío.



Fuente: elaboración propia (2018)

9.9. Anexo H. Ilustraciones de la fase 1 del método: Digestión de muestra.

Figura 8. Muestra real previa a su digestión.



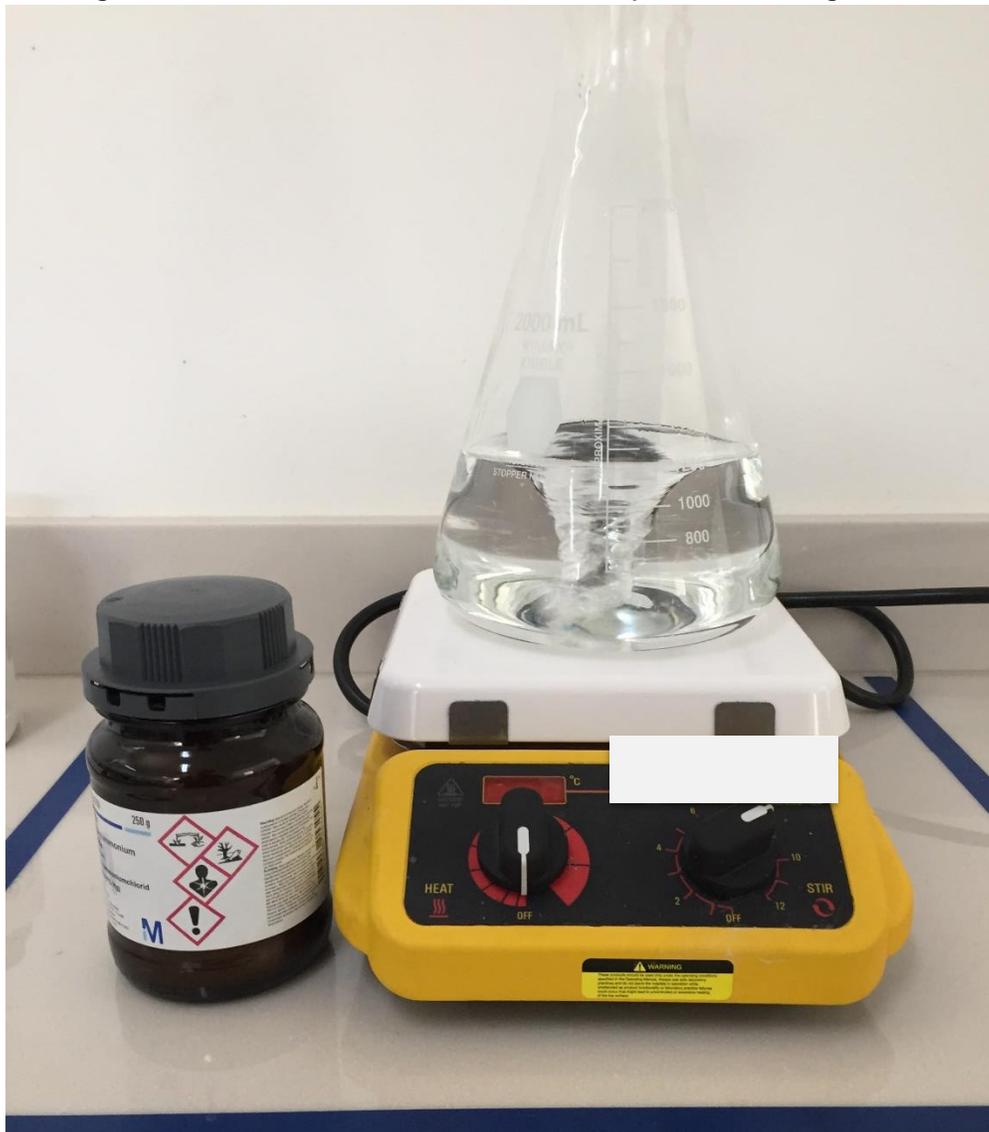
Fuente: elaboración propia (2018)

Figura 9. Muestra real en proceso de digestión.



Fuente: elaboración propia (2018)

Figura 10. Muestra real, finalización del proceso de digestión.



Fuente: elaboración propia (2018)

9.10. Anexo I. Método 10065 de HACH verificado.

Phase 1: Sample digestion

⚠ WARNING	
	Gas inhalation hazard. Operate the instrument in a fume hood to prevent exposure to hazardous gas.
⚠ CAUTION	
 	Chemical exposure hazard. Obey laboratory safety procedures and wear all of the personal protective equipment appropriate to the chemicals that are handled. Refer to the current safety data sheets (MSDS/SDS) for safety protocols.



1. Measure 1 liter of the sample into a 2000-mL Erlenmeyer flask.



2. Put the flask on a magnetic stirring hot plate. Add a 50-mm magnetic stir bar to the sample. Set the stirrer power to on.



3. Add 50 mL of concentrated sulfuric acid to the sample.



4. Add 25 mL of concentrated nitric acid to the sample.



5. Add 4.0 g of potassium persulfate to the sample. Alternatively, add one 5 gram measuring scoop of potassium persulfate to the sample. Stir until dissolved.



6. Add 7.5 g of potassium permanganate to the sample. Alternatively, add a 10 gram measuring scoop of potassium permanganate to the sample. Stir until dissolved.



7. Use a watch glass as the flask cover. After the reagents dissolve, increase the temperature of the sample to 90 °C (194 °F). Do not boil. *Note: It is not necessary to increase the temperature for a mercury standard or reagent blank in distilled water.*



8. Continue to stir and keep the sample temperature at 90 °C for 2 hours. The solution must stay dark purple during the entire digestion. Some samples (e.g., seawater, industrial effluents or samples that are high in organic matter or chloride) require additional permanganate. It can be difficult to see a dark purple color if the sample contains black/brown manganese dioxide precipitate. Add more potassium permanganate if the solution is not dark purple.



8. Set the hot plate power to off. Let the temperature of the digested sample decrease to room temperature.

A brown/black precipitate of manganese dioxide can form during this step. If the digested sample does not have a purple color, the digestion is not complete. Add more potassium permanganate. Put the sample back on the stirring hot plate and continue the digestion until the sample has a purple color.



10. Put the cool digested sample on the cool stirring hot plate. Set the stirrer power to on.



11. Add hydroxylamine-hydrochloride until all manganese dioxide is dissolved. Use a 0.5-g measuring spoon to add 0.5 g additions of hydroxylamine-hydrochloride until the purple color is gone. Wait 30 seconds after each addition and look for the color change.



12. Remove the stir bar. The digested sample is now ready for the cold vapor separation and preconcentration procedure.

Go to [Phase 2: Cold vapor separation and preconcentration of mercury](#) on page 4.

Phase 2: Cold vapor separation and preconcentration of mercury

⚠ WARNING

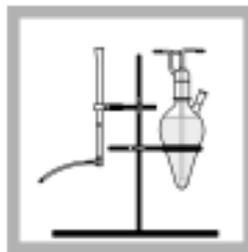


Gas inhalation hazard. Operate the instrument in a fume hood to prevent exposure to hazardous gas.



1. Pour the digested sample into the Cold Vapor Gas Washing Bottle.

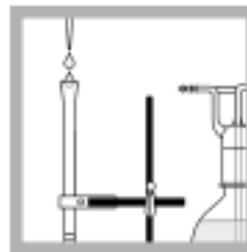
Note: The volume of the digested sample must contain 0.1 to 2.6 μg Hg.



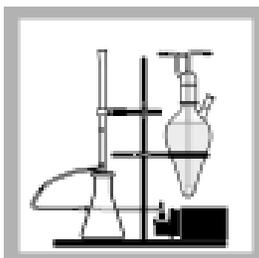
2. Set the Gas Washing Bottle in the support ring. Place the top on the Gas Washing Bottle. Wait until step 9 to connect the mercury absorber column to the Gas Washing Bottle.



3. Connect the 100-mL Erlenmeyer flask to the mercury absorber column.



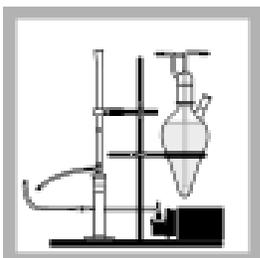
4. Pipet 8 mL of HgEx Reagent B into the Mercury Absorber column.



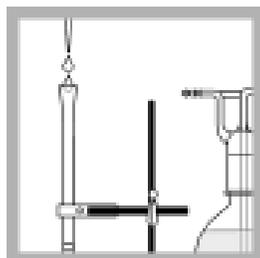
5. Apply a vacuum to the Mercury Absorber Column. Pull most of the HgEx Reagent B into the Erlenmeyer flask.



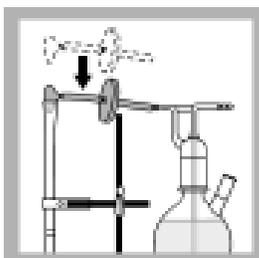
6. Use the quick disconnect to disconnect the vacuum pump when HgEx Reagent B starts to drip from the inner delivery tube on the Mercury Absorber Column (approximately 10 seconds after starting the vacuum). Make sure to not pull too much air through the Mercury Absorber Column, to prevent drying the packing.



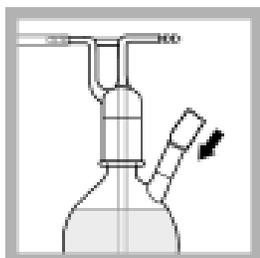
7. Remove the 100-mL Erlenmeyer flask from the Mercury Absorber Column. Replace it with the 10-mL Distilling Receiver.



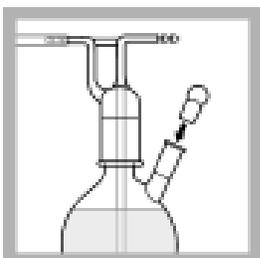
8. Pipet 2 mL of HgEx Reagent C into the Mercury Absorber Column.



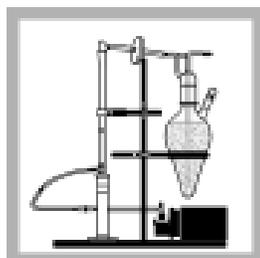
9. Use the glass elbow to connect the Mercury Absorber column to the Gas Washing Bottle.



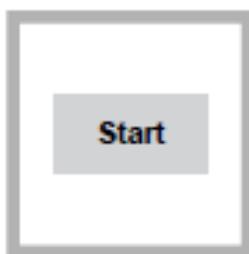
10. Shake an ampule of HgEx Reagent A to suspend undissolved reagent. Open the ampule and carefully pour the contents into the Gas Washing Bottle through the side neck.



11. Put the stopper on the side neck of the Glass Washing Bottle.



12. Use the quick disconnect to connect the vacuum pump to the Mercury Absorber Column again. Apply the vacuum to pull HgEx Reagent C through the Mercury Absorber Column packing and into the 10-mL receiver. Air bubbles should be produced at the gas dispersion tube in the Gas Washing Bottle. Complete the next two steps immediately.



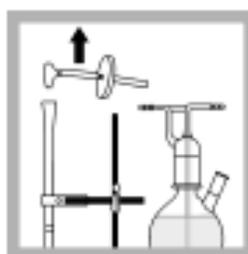
13. Start program 312 Mercury, Gold Vap.

For information about sample cells, adapters or light shields, refer to [Instrument-specific Information](#) on page 1.

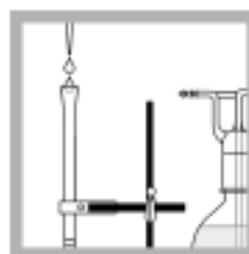
Note: Although the program name can be different between instruments, the program number does not change.



14. Start the instrument timer. A 5-minute reaction time starts. Let the solution bubble for this period. The air flow rate through the Gas Washing Bottle should be between 1-5 L/min. Let the solution bubble for more time when the air flow rate is low. For example, if the air flow rate is 1 L/min., let the solution bubble for 10 minutes.



16. After the timer expires, remove the glass elbow from the top of the Mercury Absorber Column. Keep the vacuum pump power on.



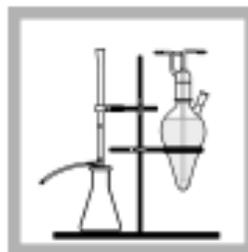
18. Pipet 8 mL of HgEx Reagent B into the Mercury Absorber Column to elute the captured mercury. Continue to apply the vacuum to pull the HgEx Reagent B into the Distilling Receiver.



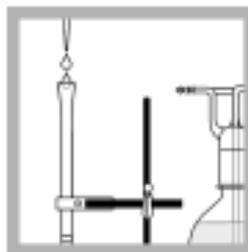
17. Set the vacuum pump to off when the volume in the Distilling Receiver is at the 10-mL mark.

If necessary, adjust the volume in the Distilling Receiver a maximum of 10 mL with HgEx Reagent B.

To prevent low volumes in the future, disconnect the vacuum sooner in step 6. This leaves more HgEx Reagent B in the packing of the Mercury Absorber Column.



18. Remove the Distilling Receiver from the Mercury Absorber Column. Connect the 100-mL Erlenmeyer flask to the column again.



19. Use a pipette to add 3 mL of HgEx Reagent B into the Mercury Absorber Column without applying vacuum. This keeps the absorber packing wet between tests.

The Mercury Absorber Column eluate in the Distilling Receiver is ready for analysis.

Go to [Phase 3: Colorimetric analysis](#) on page 7.

Phase 3: Colorimetric analysis

⚠ WARNING

 Gas inhalation hazard. Operate the instrument in a fume hood to prevent exposure to hazardous gas.



1. Use the supplied funnel to add the contents of one HgEx Reagent 3 foil pillow to the eluate in the Distilling Receiver.



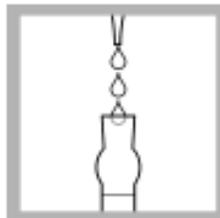
2. Put the stopper on the receiver. Invert to dissolve the reagent.



3. Use the supplied funnel to add the contents of one HgEx Reagent 4 foil pillow to the Distilling Receiver.



4. Put the stopper on the receiver. Invert to dissolve the reagent.



5. Add 8 drops of HgEx Reagent 5 to the Distilling Receiver.



6. Put the stopper on the receiver. Invert to mix the reagent.



7. Start the instrument timer. A 2-minute reaction time starts.



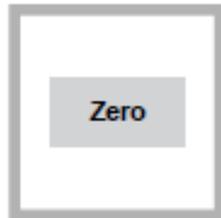
8. During the reaction period, pour the solution into a sample cell.



9. Clean the prepared sample cell.



10. Insert the sample cell into the cell holder.



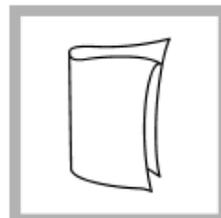
11. Push ZERO. The display shows 0.1 $\mu\text{g/L}$ Hg (this program uses a non-zero intercept).



12. Remove the cell from the cell holder. Add the contents of one HgEx Reagent 6 foil pillow to the solution.
Note: Do not use the funnel to add HgEx Reagent 6 to the sample cell. HgEx Reagent 6 contamination from the funnel will make it impossible to find mercury in subsequent tests.



13. Swirl the cell until the reagent is completely dissolved. Immediately continue with next step.



14. Clean the prepared sample cell.



15. Insert the prepared sample into the cell holder.



16. Push READ. Results show in $\mu\text{g/L}$ Hg. This is the concentration in the original sample.