



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS  
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



---

“VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN MUESTRAS DE AGUA NATURAL, RESIDUAL Y DE CONSUMO POR MEDIO DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON TÉCNICA DE VAPOR FRÍO”.

---

Trabajo de Investigación (Graduación). Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI). Presentado como Requisito Previo a la Obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

**AUTOR:** Cristina Fernanda Alarcón Quinapanta

**Tutor:** Dr. Román Rodríguez Ph.D.

AMBATO – ECUADOR

2011

Dr. Román Rodríguez Ph.D

TUTOR

CERTIFICA:

Que el presente trabajo investigativo: “VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN MUESTRAS DE AGUA NATURAL, RESIDUAL Y DE CONSUMO POR MEDIO DE ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON TÉCNICA DE VAPOR FRÍO”, desarrollado por la egresada Cristina Fernanda Alarcón Quinapanta; contempla las orientaciones metodológicas de la Investigación Científica

Que ha sido dirigida en todas sus partes, cumpliendo con las disposiciones por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Por lo expuesto:

Autorizo su presentación ante los organismos competentes para la aprobación del mismo.

Ambato, diciembre del 2011

---

Dr. Román Rodríguez Ph.D

## APROBACIÓN DEL TUTOR DE TESIS

Dr. Román Rodríguez Ph. D.

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Investigación realizado bajo el tema: “VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN MUESTRAS DE AGUA NATURAL, RESIDUAL Y DE CONSUMO POR MEDIO DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON TÉCNICA DE VAPOR FRÍO” de la egresada Cristina Fernanda Alarcón Quinapanta; considero que dicho trabajo investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del Jurado Examinador designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Ambato, diciembre de 2011

---

Dr. Román Rodríguez. Ph. D.

TUTOR DE TESIS

## AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

La responsabilidad del contenido del Proyecto de Investigación, corresponde exclusivamente a Cristina Fernanda Alarcón Quinapanta egresada; Dr. Román Rodríguez Ph.D, Tutor del Proyecto de Investigación; y el Laboratorio de Servicios Analíticos HAVOC; con el tema: “VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR MERCURIO EN MUESTRAS AMBIENTALES POR MEDIO DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON TÉCNICA DE VAPOR FRIO” y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Técnica de Ambato y al Laboratorio de Servicios Analíticos HAVOC Cia. Ltda.

---

Cristina Alarcón

Autor

---

Dr. Román Rodríguez Ph.D

Tutor Proyecto

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el presente Trabajo de Graduación de acuerdo a las disposiciones emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, diciembre del 2011

Para constancia firman:

---

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

---

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

## *Dedicatoria*

*Al Señor, por el amor reflejado  
a lo largo de todo este tiempo.*

*A mis padres por su gran  
apoyo, comprensión y  
protección interminables todos  
estos años y porque sin su  
ejemplo de lucha no hubiera  
llegado hasta aquí.*

*A mis hermanos Marco,  
Mónica y Manolo por su  
confianza y apoyo firme.*

*A mis amigos que han estado  
apoyándome y respaldándome  
siempre aquí.*

# *Agradecimiento*

*Aunque la nobleza vive de la parte del que da, el agradecer está de parte del que recibe. Y pues, ya dar es sabio, ya tengo con nombre honroso el nombre del generoso.*

*Déjame el de agradecido, pues lo puedo conseguir siendo agradecido, cuanto libera, pues honro tanto el dar como el recibir. (Pedro Calderón de la Barca)*

*Por ello, es inevitable agradecer, más aún cuando hay tantas personas a quienes decirles  
Gracias.*

*A mis padres y hermanos por su gran amor, comprensión, confianza y soporte durante toda mi vida y por hacer que esta sea más alegre y llevadera.*

*A todas las autoridades y profesores que presiden la Universidad Técnica de Ambato y en especial al Ing. Rommel Rivera quien de manera desinteresada ha empleado esfuerzo y tiempo para materializar uno de mis más grandes objetivos, la culminación de mi carrera.*

*Al Dr. Roman Rodríguez por su enseñanza, preocupación, motivación y amistad a lo largo de esta hermosa profesión.*

*A Alexandra Brito por su invaluable amistad, colaboración y apoyo desde el día en el que comenzamos este largo trayecto. Quien además ha sido la verdadera creadora de este trabajo que ahora se consuma.*

*A Marco Roberto, por ser mi apoyo sentimental y mi fortaleza todo este tiempo. Y por darme fuerzas para salir hacia adelante en todo momento.*

*A mis amigos Osmany, Carmita, Aracelly, Andreina, Verito, Cristy, Noris, Lily, Angélica, Santy, Moni, David, Mafer, por demostrarme todo este tiempo la verdadera amistad.*

*A todos ustedes, el mayor reconocimiento, pues su actitud positiva y su cariño me han permitido seguir adelante. Muchas gracias y mil bendiciones.*

## INDICE GENERAL DE CONTENIDOS

### CAPÍTULO I

1.	EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	1
1.1	Tema de la Investigación	1
1.2	Planteamiento del problema	1
1.2.1	Contextualización (macro, meso, micro)	2
1.2.2	Análisis Crítico	4
1.2.3	Prognosis	6
1.2.4	Formulación del problema	6
1.2.5	Interrogantes	7
1.2.6	Delimitación del objeto de investigación	7
1.3	Justificación	7
1.4	Objetivos	8
1.4.1	General	8
1.4.2	Específicos	8

### CAPÍTULO II

2.	Marco Teórico	9
2.1	Antecedentes Investigativos	9
2.1.1	Los Metales Pesados en el Medio Ambiente	9
2.1.2	La Intervención de Mercurio (Hg) en el Ecosistema	10
2.1.3	Origen y Clases de Contaminación del Agua	16
2.1.4	Técnicas de Detección de los Niveles de Contaminación	17
2.1.5	Proceso de Validación de Métodos Analíticos	21
2.2	Fundamentación Filosófica	25
2.3	Fundamentación Legal	26
2.4	Categorías Fundamentales	27
2.4.1	Gráfico de inclusión	27
2.5	Hipótesis	27
2.5.1	Hipótesis Nula	27
2.5.2	Hipótesis Alternativa	28
2.6	Señalamiento de Variables	28
2.6.1	Variable Independiente	28
2.6.2	Variable Dependiente	28

CAPÍTULO III		
3.	METODOLOGÍA	29
3.1	Modalidad Básica de la Investigación	29
3.1.1	Experimental	29
3.2	Tipo de la Investigación	29
3.2.1	Exploratoria	29
3.2.2	Descriptiva	29
3.2.3	Asociación de Variables	30
3.3	Método y Técnica de Investigación	30
3.3.1	Alcance de Condiciones Óptimas para el Equipo de Generación-Vapor Frío	30
3.3.2	Método Analítico Empleado para la Determinación de Mercurio	31
3.3.3	Validación del Método Analítico	35
3.4	Población y Muestra	42
3.4.1	Diseño Experimental	42
3.5	Operacionalización de Variables	44
3.5.1	Variable Dependiente:	44
3.5.2	Variable Independiente:	44
3.6	Recolección de Información	45
3.7	Procesamiento y Análisis	45
CAPÍTULO IV		
4.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	46
4.1	Análisis de los Resultados	46
4.1.1	Condiciones de Operación del Generador de Vapor Frío	46
4.1.2	Validación del Método Analítico	47
4.1.3	Determinación de los Rangos de trabajo	49
4.1.4	Estudio de las Matrices de Análisis con Adición de Estándar	49
4.2	Interpretación de Datos	50
4.2.1	Condiciones de Operación del Generador de Vapor Frío	50
4.2.2	Validación del Método Analítico	50
4.2.3	Determinación de los Rangos de trabajo	54
4.2.4	Estudio de las Matrices de Análisis con Adición de Estándar	54
4.3	Verificación de Hipótesis	54
CAPÍTULO V		
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
5.1	Conclusiones	56

5.2	Recomendaciones	57
CAPÍTULO VI		
6.	PROPUESTA	59
6.1	Datos Informativos	59
6.2	Antecedentes de la Propuesta	60
6.3	Justificación	60
6.4	Objetivos	61
6.4.1	General	61
6.4.2	Específicos	61
6.5	Análisis de Factibilidad	62
6.6	Fundamentación	63
6.7	Metodología	64
6.8	Administración	65
6.9	Previsión de la Evaluación	66
MATERIALES DE REFERENCIAS		
	BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS		
	ANEXOS 1 TULAS Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes	72
	ANEXOS 2 Preparación de Reactivos	76
	ANEXOS 3 Equipos Utilizados	79
	ANEXOS 4 Tabla de Resultados y Análisis Estadístico	82
	ANEXOS 5 Gráficos	96

## INDICE DE TABLAS

### CAPÍTULO II

Tabla N° 2.1	Propiedades Físico-Químicas	11
Tabla N° 2.2	Consumo de mercurio en Países Industrializados	15
Tabla N° 2.3	Parámetros de Validación de un Método Analítico	23
Tabla N° 2.4	Fases de Validación de Métodos Analíticos	25

### CAPÍTULO III

Tabla N° 3.1	Factores y niveles de estudio para las mejores condiciones de operación del equipo de generación de vapor frío para la determinación de concentraciones de mercurio.	42
Tabla N° 3.2	Obtención de los tratamientos resultantes de la correlación de los factores de estudio para las mejores condiciones de operación del equipo de generación de vapor frío para la determinación de concentraciones de mercurio.	43
Tabla N° 3.3	Variable Dependiente	44
Tabla N° 3.4	Variable Independiente	44

### CAPÍTULO VI

Tabla N° 6.1	Recursos Económicos Estimados para la Propuesta Planteada	62
Tabla N° 6.2	Modelo Operativo (Plan de acción)	64
Tabla N° 6.3	Administración de la Propuesta	65
Tabla N° 6.4	Previsión de la Evaluación de la Propuesta	65

### ANEXO 1

TABLA 1.	Límites máximos permisibles para aguas de consumo humano y uso doméstico, que únicamente requieren tratamiento convencional.	73
TABLA 2.	Límites máximos permisibles para aguas de consumo humano y uso doméstico que únicamente requieran desinfección.	73
TABLA 6.	Criterios de calidad admisibles para aguas de uso agrícola	74
TABLA 8.	Criterios de calidad para aguas de uso pecuario	74
TABLA 11.	Límites de descarga al sistema de alcantarillado público	75
Tabla N° 1	Preparación de Estándares de Calibración	83
Tabla N° 2	Resultados Obtenidos de la Experimentación con el Equipo de Generación de Vapor Frío	83
Tabla N° 3	Resultados Medios de la Experimentación con el Equipo de Generación de Vapor Frío	84
Tabla N° 4	Porcentajes de Recuperación - Equipo de Generación de Vapor Frío	84
Tabla N° 5	Resultados del Cálculo de ANOVA de la Experimentación con el	85

## Equipo de Generación de Vapor Frío

Tabla N° 6	Resultados del Contraste Múltiple de Rangos para Absorbancia según Factor A	85
Tabla N° 7	Resultados del Contraste Múltiple de Rangos para Absorbancia según Factor B	86
Tabla N° 8	Resultados de la Prueba de Tukey para la interacción AB	86
Tabla N° 9	Reporte de ABS obtenidas en la curva de Calibración	87
Tabla N° 10	Comprobación de la Concentración de los Estándares de Calibración	87
Tabla N° 11	Valores Promedios para la Determinación de la Curva de Calibración	88
Tabla N° 12	Porcentajes de Recuperación de las Soluciones Estándar del Analito de Estudio	89
Tabla N° 13	Datos obtenidos del Estudio del Material de Referencia	89
Tabla N° 14	Datos obtenidos del Estudio del Material de Referencia	90
Tabla N° 15	Valores de F obtenidos	91
Tabla N° 16	Reproducibilidad	92
Tabla N° 17	Medias por Niveles de Concentración	92
Tabla N° 18	Repetibilidad de los tres días	92
Tabla N° 19	Repetibilidad entre Días	93
Tabla N° 20	Porcentaje de Recuperación-Exactitud	93
Tabla N° 21	Porcentaje de Recuperación-Exactitud	93
Tabla N° 22	Incertidumbre del Método	94
Tabla N° 23	Rangos de Trabajo	94
Tabla N° 24	Reporte de ABS obtenidas de la determinación de los niveles de mercurio en muestras de análisis	94
Tabla N° 25	Reporte de Datos de Adición de Estándares en muestras de agua residual	95
Tabla N° 26	Reporte de Datos de Adición de Estándares en muestras de agua natural	95
Tabla N° 27	Reporte de Datos de Adición de Estándares en muestras de agua de consumo	95

## INDICE DE GRAFICOS E IMAGENES

### CAPÍTULO I

Gráfico 1.1	Actividad Minera en el Ecuador	3
Gráfico 1.2	Árbol de Problemas para el análisis crítico	4

### CAPÍTULO II

Gráfico 2.1	Procesos de adsorción de metales pesados	10
Gráfico 2.2	Modelo conceptual del ciclo del mercurio en el medio ambiente	13
Gráfico 2.3	Esquema de equipo de absorción atómica	18
Gráfico 2.4	Esquema del proceso de determinación de mercurio por generación de vapor frío	19
Gráfico de inclusión		27

### ANEXO 3

Imagen 1.	Fotografía del Equipo SHIMADZU GHV-1	80
Imagen 2.	Fotografía del Mechero y Celda de Cuarzo	80
Imagen 3.	Fotografía de los Equipos SHIMADZU GHV-1 y SHIMADZU AA680	81

### ANEXO 5

Gráfico 1.	Esquema de la Preparación de Estándares de Calibración.	97
Gráfico 2.	Condiciones de Operación del Equipo de Generación de Vapor Frío	98
Gráfico 3.	Representación grafica del Factor A en relación con los valores de absorbancia	98
Gráfico 4.	Representación grafica del Factor B en relación con los valores de absorbancia	99
Gráfico 5.	Representación del intervalo de la prueba de Tukey al 95% para el Factor A.	99
Gráfico 6.	Representación del intervalo de la prueba de Tukey al 95% para el Factor B.	99
Gráfico 7.	Comportamiento de la interacción de los Factores de estudio.	100
Gráfico 8.	Curva de Calibración de Mercurio	100
Gráfico 9.	Determinación de los Límites de Confianza Máximos y Mínimos	101
Gráfico 10	Determinación de las Fuentes de Incertidumbre en Estándares entre 0.02mg/L y 0.06mg/L y el Material de Referencia	101
Gráfico 11.	Determinación de las Fuentes de Incertidumbre en Estándares entre 0.001mg/L y 0.003mg/L y el Material de Referencia	102

## INDICE DE ABREVIATURAS

- AAS**, Espectroscopía de Absorción Atómica
- ABS**, Absorbancia
- ANNCY**, Laboratorio de Servicios Analíticos
- APHA**, American Public Health Association
- BBC**, British Broadcasting Corporation
- CESAQ**, Centro de Servicios Ambientales y Químicos
- CESECCA**, Centro de Servicio para el Control de Calidad
- CFL**, Compact Fluorescent Lamp
- COPs**, Contaminantes Orgánicos Persistentes
- EDTA**, Ethylenediaminetetraacetic acid
- EPA**, Environmental Protection Agency
- EU**, European Union
- FC-GVF-EAA**, Flujo Continuo con Generación de Vapor Frío por Espectroscopía de Absorción Atómica
- FDA**, Food and Drug Administration
- GRUENTEC**, Compañía de Servicios Ambientales
- HAZWAT**, Tratamiento, Transporte y Disposición Final de Residuos Especiales y Peligrosos
- INEN**, Instituto Ecuatoriano de Normalización
- INP**, Instituto Nacional de Pesca
- INSAT**, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores
- IR**, Radiación Infrarroja
- ISAT**, Instituto de Salud y Trabajo
- ISO**, International Organization for Standardization
- IUPAC**, *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- NEMA**, Asociación Nacional de Fabricantes Eléctricos Norteamericana
- OAE**, Organismo de Acreditación Ecuatoriana
- OMS**, Organización Mundial de la Salud
- ONU**, Organización de Naciones Unidas
- OSP**, Oferta de Servicios y Productos
- PNUMA**, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
- ppb**, Partes Por Billón
- ppm**, Partes Por Millón
- ppt**, Partes Por Trillón
- PUCE**, Pontificia Universidad Católica del Ecuador
- RF**, Radiofrecuencias

**STEL**, Short-Term Exposure Limits (Límite de exposición a corto plazo)

**TLV**, Thresold Limite Value (valores límite umbral)

**TULAS**, Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria

**TWA**, Time-weighted Average (Media ponderada en el tiempo)

**SWISS-CONTACT**, Fundation for Technical Cooperation

**UNITAR**, United Nations Institute for Training and Research

**UV**, Ultravioleta

## INDICE DE NOMENCLATURA Y NOTACIÓN QUÍMICA

**Hg** Mercurio

**Hg<sup>0</sup>** Mercurio Elemental O Puro

**Hg(I)** Mercurio Monovalente

**Hg(II)** Mercurio Divalente

**HgO** Óxido De Mercurio

**HgS** Sulfuro De Mercurio

**HgCl<sub>2</sub>** Cloruro De Mercurio

**CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>** Ión Metil-Mercurio

**CH<sub>3</sub>Hg<sup>++</sup>** Ión Di-Metil-Mercurio

**SnCl** Cloruro De Estaño

**NaBH<sub>4</sub>** Borohidruro De Sodio

**Ar** Argón

**N<sub>2</sub>** Nitrógeno

**Cs** Cesio

**Sr** Estroncio

**K** Potasio

**HCl** Ácido Clorhídrico

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** Ácido Sulfúrico

**HNO<sub>3</sub>** Ácido Nítrico

**KMnO<sub>4</sub>** Permanganato De Potasio

## RESUMEN EJECUTIVO

Para la humanidad, a lo largo de la historia, el mercurio ha sido un elemento muy importante, puesto que posee características especiales que le permiten ser materia prima para muchos procesos industriales; pero su uso industrial ha llevado a la alteración de su ciclo normal, con lo cual se producen altas concentraciones del mismo especialmente en aquellos relacionados con su extracción y transformación. La contaminación del agua, el aire, el suelo y los alimentos, tanto a nivel del ambiente general como del ocupacional, resultado de su presencia bien sea natural o antropogénica, ha demostrado la vulnerabilidad del hombre ante el poder tóxico del mercurio.

A continuación se describe un procedimiento adecuado y económico para determinar el contenido de mercurio en muestras de agua natural, residual y de consumo, mediante la generación de vapor frío (GVF) y detección por espectroscopía de absorción atómica (EAA). La técnica de flujo continuo fue usada para la introducción de la muestra y los demás reactivos. Con este diseño todo el mercurio es reducido para formar vapor de mercurio elemental usando un reductor. Mediante la curva de calibrado se determinó que la altura de picos máxima se incrementa linealmente con la concentración de mercurio expresada por la ecuación:  $y = 7,6337x + 0,0058$ ; un límite de correlación de  $r^2 = 0,9984$ , un límite de cuantificación de  $0,0140\text{mg/L}$  y límite de detección =  $0,0025\text{mg/L}$ .

Con el método propuesto, se determinó el contenido de mercurio en las muestras de análisis con adición de estándar, se logró establecer que tanto el agua natural como el agua de consumo no presentan niveles de contaminación de mercurio, mientras que la matriz de agua residual presentó una concentración de  $0,002\text{mg/L}$  de mercurio, tomando en cuenta que el proceso de concentración y digestión no presenta interferencias para la determinación del mercurio contenido en la muestra.

## **CAPÍTULO I**

### **1. EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **1.1 Tema de la Investigación**

“Validación del método analítico para la determinación de mercurio en muestras de agua natural, residual y de consumo por medio de espectroscopía de absorción atómica con técnica de vapor frío”.

#### **1.2 Planteamiento del problema**

En la humanidad, a lo largo de la historia, el mercurio ha sido un elemento importante, puesto que posee características especiales que le permiten ser materia prima para muchos procesos industriales, lo que a través del tiempo ha llevado a la alteración de su ciclo normal, encontrándose altas concentraciones del elemento en lugares circunscritos, especialmente en aquellos procesos relacionados con la extracción y transformación de oro (Sepúlveda *et al.* 2006).

Se coincide con Alexander (2005) cuando plantea que, el mercurio es considerado un contaminante universal. Se ha demostrado la vulnerabilidad del hombre ante su poder tóxico al ser emitido a la atmósfera influyendo su contaminación a través del agua, el aire, el suelo y los alimentos. Al transformarse de mercurio en metilmercurio en medios acuáticos, genera una potente neurotoxina que se acumula en ciertos tejidos vivos, principalmente el tejido nervioso, evitando su metabolismo lo cual provoca un efecto multiplicador en la concentración del contaminante, efecto conocido como bioacumulación. Este efecto se presenta en peces y otros animales, y luego en los seres humanos al pasar a formar parte de la cadena alimenticia, lo que representa un grave problema para la salud humana y ambiental.

En tal sentido, es necesario e importante la implementación de métodos analíticos capaces de precisar las concentraciones de mercurio, especialmente cuando éste se encuentra en cantidades muy pequeñas, del orden de mg/kg o µg/kg, en diversos tipos de matrices, para lo cual se requiere una previa extracción cuantitativa, purificación y concentración del extracto obtenido antes de su detección y cuantificación (Alexander, 2005).

##### **1.2.1 Contextualización (macro, meso, micro)**

Macro

La producción mundial de mercurio en el año de 1985 fue de 7100 toneladas métricas y en el año 2000 fue reducida a 1800, evidenciándose su disminución, en especial, en países del

primer mundo (España, Italia, Rusia, China, Estados Unidos y Yugoslavia) donde se han establecido prohibiciones. En promedio, se han producido aproximadamente 4000 toneladas de mercurio por año emitidos directamente al ambiente en los últimos 20 años (PNUMA, 2005).

#### Meso

La extracción de oro es considerada en América Latina la fuente más importante de contaminación por mercurio. En 1996, en América Central y América del Sur se empleó un estimado de 100 toneladas de Hg para la extracción de oro artesanal. Según la literatura consultada, entre 1977 y 1992 se descargaron alrededor de 1500 a 3000 toneladas de Hg en el ecosistema del Amazonas. Esto revela la contaminación del sistema hídrico y el ecosistema a lo largo de las cuencas de Bolivia y Brasil. También se reportan actividades de extracción de oro artesanal en Colombia, Guyana, Nicaragua, Perú, Suriname y Venezuela, generalizando el problema de contaminación por Hg en América Latina (Maisonet, 2002).

#### Micro

El Gráfico 1.1 revela que el Ecuador posee yacimientos de oro dispersados en todo el país. Sin embargo, la actividad minera de extracción de oro se destaca en la zona Sur, en cuatro puntos geográficos: Ponce Enríquez, Zaruma, Portovelo y Nambija. En este sentido, los datos reportados muestran que por cada gramo de oro extraído se emiten 1.5 gramos de mercurio al ambiente, el 50% de éste mercurio liberado se dispersa en el agua a través de los relaves descargados en los procesos de lavado y concentrado de oro y el otro 50% se difunde al aire en los procesos de quemado de amalgamas (Ministerio del Ambiente, 2008; UNITAR, 2010).

En un informe preliminar realizado por la Dirección de Medio Ambiente del Municipio de Guayaquil, los ríos Siete, Tenguel, Gala y Chico, reportan valores de concentraciones de mercurio que fluctúan entre 1.03 y 3.56 mg/kg, lo que supera hasta en 2.56 mg/kg el límite máximo permisible establecido por la Unión Europea (EU), que es 1.0 mg/kg. A su vez, los ríos Calera, Puyango y Nambija se encuentran afectados por la influencia de este metal pesado (Ministerio del Ambiente, 2008).

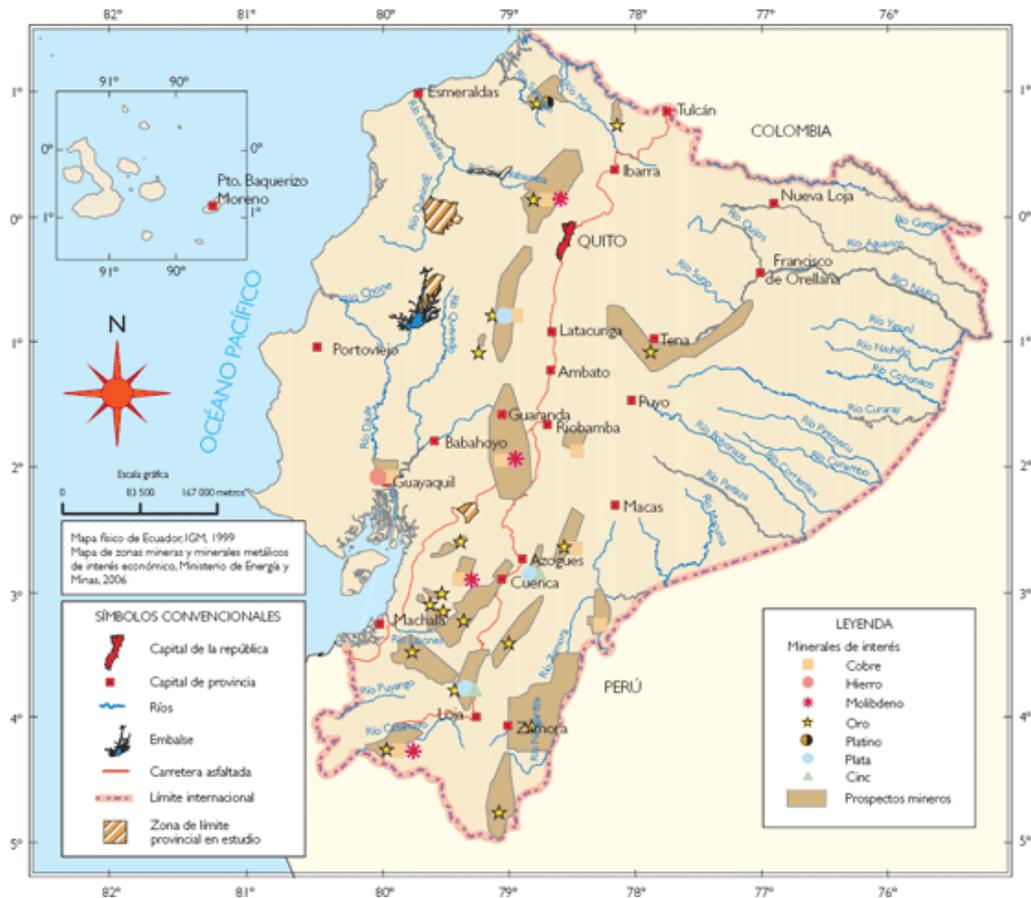


Gráfico 1.1 Actividad Minera en el Ecuador

Fuente: Ministerio del Ambiente, 2008.

Uno de los procedimientos más empleados para la comprobación del grado de contaminación con mercurio presente en el ambiente es mediante determinaciones analíticas efectuadas en el tipo de matriz de estudio. Este servicio es ofertado por diferentes laboratorios acreditados por el OAE (Organismo de Acreditación Ecuatoriana) en el país. A continuación, se presenta una lista de laboratorios que determinan la concentración de mercurio por medio de espectroscopía de absorción atómica (OAE, 2010).

- ✦ Laboratorio OSP, Oferta de Servicios y Productos, Facultad de Ciencias Químicas Universidad Central del Ecuador.
- ✦ Laboratorio de Análisis Químico y Microbiológico Instituto Nacional de Pesca – INP.
- ✦ Laboratorio del Centro de Servicio para el Control de Calidad-CESECCA, Universidad Laica de Manabí.
- ✦ Centro de Servicios Ambientales y Químicos CESAQ-PUCE.

↻ Laboratorios ANNCY.

↻ Laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda.

### 1.2.2 Análisis Crítico

El análisis crítico se sustenta a través del árbol de problemas, el cual permite conocer las causas y efectos que se generan para la investigación planteada (Ver Gráfico 1.2).

EFFECTOS



Gráfico 1.2 Árbol de Problemas para el Análisis Crítico.

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

#### Relación Causa-Efecto

##### Causa:

Carencia de Métodos Analíticos Validados.

##### Efecto:

Falta de Laboratorios de Ensayo Acreditados.

El mercurio en bajas cantidades forma parte natural de la litósfera. Las actividades agrícolas e industriales del hombre moderno han aumentado los niveles normales de este metal en la atmósfera e hidrósfera, originando, en algunos casos, graves intoxicaciones en núcleos importantes de la población (Ministerio del Ambiente, 2008). Por ejemplo, en la bahía de Minamata, ubicada al sur-este de Japón, una fábrica de plásticos vertió aguas residuales con un contenido de 0.1 ppb (partes por billón) de mercurio. Las aguas de la bahía contenían 2 ppb, concentración apta para beber. El plancton tomaba el agua con mercurio pero no lo eliminaba. Los peces pequeños que se acumulaban de plancton, tampoco lo excretaban, lo que generó una concentración de mercurio de 200 ppb. Por la acción de la cadena alimenticia, los grandes peces acumularon un nivel de mercurio entre 4.000 y 20.000 ppb. En el año 1956 se detectó el primer caso de una enfermedad cuya causa no pudo ser demostrada sino hasta 1959, donde se atribuyó a la ingesta de peces contaminados por mercurio. En tal sentido, el estudio médico determinó que el mercurio metilado en los sedimentos por acción bacteriana originó el síndrome tóxico conocido como enfermedad de Minamata de la cual muchos resultaron lisiados, paralizados, perdieron su visión, capacidades mentales o murieron (EPA, 1997).

En realidad todas las formas de mercurio son potencialmente tóxicas, el rango de toxicidad varía considerablemente. Alrededor del 80% del vapor de mercurio presente en la atmósfera puede difundirse a través de los pulmones hasta la sangre y luego hasta el cerebro, donde puede causar daños importantes prolongados en el sistema nervioso central y efectos perjudiciales en los sistemas digestivo, respiratorio e inmunitario y en los riñones, donde, su semiperíodo biológico de permanencia dura aproximadamente dos meses, además de provocar daños pulmonares, promueve la pérdida de Ca y Mg, y es perjudicial por absorción cutánea (Español, 2001).

El mercurio y sus interacciones químicas hacen que en la naturaleza se cumpla un ciclo, capaz de formar compuestos orgánicos, donde el óxido de mercurio o sulfuro de mercurio (HgO o HgS) son metilados a metil o dimetil mercurio con la participación de ciertos microorganismos, estos compuestos se caracterizan por ser altamente estables, con niveles de toxicidad superiores a las formas inorgánicas. Debido a éste efecto nocivo, aún de pequeñas concentraciones, resulta indispensable conocer en términos cuantitativos su presencia en el medio ambiente (Saucedo *et al*, 2007).

Los efectos adversos de la exposición al mercurio para la salud pueden ser: temblores, trastornos de la visión y la audición, parálisis, insomnio, inestabilidad emocional, deficiencia del crecimiento durante el desarrollo fetal y problemas de concentración y retraso en el desarrollo durante la infancia. Estudios recientes parecen indicar que el mercurio tal vez carezca de umbral por debajo del cual no se producen algunos efectos adversos (Lauwery, 2010).

El mercurio inorgánico se excreta principalmente por las heces y la orina. También se excretan pequeñas cantidades por las glándulas salivares, lacrimales y sudoríparas. En condiciones de exposición crónica existe, una relación entre la intensidad de la exposición reciente al vapor de mercurio y la concentración de mercurio en sangre u orina. Esta concentración puede variar en función del consumo de pescado y del número de empastes dentarios con amalgama de mercurio (EPA, 1997).

Es por ello que la incidencia de mercurio en el medio ambiente genera la implementación de métodos de análisis específicos, desarrollados en laboratorios de análisis químico para obtener resultados cuantitativos rápidos, selectivos y sensibles. Estos suministran evidencia objetiva, obtenida en un determinado análisis que proporciona datos confiables siendo un requisito importante para el alcance de la validación de los métodos (Bedoya, 2009).

### **1.2.3 Prognosis**

La obtención de datos para la determinación de mercurio por medio de espectroscopía de absorción atómica por generación de vapor frío, es el resultado de un proceso que comienza con la selección y validación de un método analítico, cuya ejecución a de ser permanentemente controlada. Para su correcta selección es necesario considerar todos aquellos factores que pueden influir en la validez del resultado (extracción, eliminación de interferencias y determinación).

A su vez, es determinante conocer la dificultad que presentará la ejecución del método analítico, pues trabajar con límites de determinación muy bajos limita la obtención de una precisión y exactitud adecuada a esos niveles. Cualquier método analítico antes de ser utilizado debe ser validado; es decir, se deben realizar las comprobaciones que aseguran que el método es científicamente correcto en las condiciones en que va a ser aplicado.

Según Hanlon (2007), en el proceso de validación se comprueban características técnicas en cuanto a selectividad, especificidad, sensibilidad, linealidad, límites de detección, cuantificación, exactitud y precisión, siguiendo las Normas Internacionales establecidas. En este sentido, al no obtenerse la validación del método de análisis para la determinación de mercurio, se presenta un problema relacionado con la acreditación del laboratorio y el control de calidad, originando una falencia al momento de servir de guía para los laboratorios que utilizan ensayos en áreas relacionadas con la química ambiental.

### **1.2.4 Formulación del problema**

Existen varios tipos de análisis capaces de determinar mercurio en muestras de agua. Sin embargo, es preciso seleccionar un método analítico capaz de establecer concentraciones

que puedan alcanzar determinaciones de mercurio hasta de 200 partes por trillón (ppt). La utilización de espectrofotometría de absorción atómica con técnica de vapor frío, favorece la transformación de la matriz de estudio, permitiendo establecer características de desempeño de los procedimientos, tales como: selectividad, exactitud, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, linealidad, límites de detección y cuantificación, medición de la incertidumbre, sensibilidad, robustez y recuperación, basadas en las exigencias expuestas por la INEN ISO/IEC 17025.

### 1.2.5 Interrogantes

- ¿Es necesario implementar la validación de métodos analíticos para la detección de mercurio mediante la técnica de vapor frío por medio de espectroscopía de absorción atómica?
- ¿Cuáles son las probables interferencias que presenta el analito?
- ¿Qué rango de incertidumbre debe presentar el método analítico?
- ¿Qué beneficio aportará a la comunidad, la validación de un método analítico que permita determinar la concentración de mercurio en agua natural, residual y de consumo?

### 1.2.6 Delimitación del objeto de investigación

<b>Área</b>	: Investigación Aplicada
<b>Sub-área</b>	: Química Analítica
<b>Sector</b>	: Validación
<b>Sub-sector</b>	: Mercurio
<b>Situación Geográfica</b>	: Quito/Laboratorio de Servicios Analíticos HAVOC Cía. Ltda.
<b>Espacial</b>	: Julio de 2010 – Febrero 2011

### 1.3 Justificación

La presencia de mercurio en el ambiente tiene implicaciones importantes por los efectos tóxicos que produce en los seres vivos, debido a su acumulación en los tejidos blandos, lo que provoca enfermedades irreversibles e incluso la muerte (Castellucci, 2005). A medida que aumenta la influencia del hombre sobre la naturaleza y aparecen nuevas necesidades como consecuencia de la vida en sociedad, el medio ambiente se deteriora cada vez más (Saucedo *et al*, 2007).

En tal sentido, el hombre debe armonizar entre el desarrollo tecnológico, el avance de la civilización y el mantenimiento del equilibrio ecológico, siendo de este modo indispensable

proteger los recursos renovables y no renovables a más de tomar conciencia de que el saneamiento ambiental es fundamental para la vida sobre el planeta (Nebel, 1999).

En tal sentido, es importante determinar los niveles de concentración de mercurio en muestras de agua residual, natural y de consumo, a fin de identificar oportunamente posibles focos de contaminación mediante el reporte de resultados confiables, con elevada sensibilidad, precisión, confiabilidad y bajos límites de detección. Debido a esto, es significativo que el laboratorio de ensayos pueda disponer de procedimientos analíticos adaptables a las condiciones del laboratorio, sin dejar de lado, el cumplimiento de los requerimientos establecidos en la Norma NTE INEN-ISO/IEC 17025:2005; lo cual demuestra la competitividad técnica para la ejecución del método analítico en el país.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 General**

Validar un método analítico para la determinación del mercurio en muestras de agua natural, residual y de consumo por medio de espectroscopía de absorción atómica con técnica de vapor frío.

### **1.4.2 Específicos**

- Descubrir las mejores condiciones de gas de arrastre y agente reductor en las que el equipo de generación de vapor frío se desempeñe de manera sobresaliente.
- Determinar el límite de cuantificación y de detección a través del método para el análisis de mercurio en muestras de agua natural, residual y de consumo.
- Conocer el nivel de incertidumbre que se genera durante la ejecución del proceso analítico.
- Corroborar que el método analítico propuesto para la determinación de mercurio en muestras de agua natural, residual y de consumo proporciona datos confiables.

## **CAPÍTULO II**

### **2. Marco Teórico**

#### **2.1 Antecedentes Investigativos**

Los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos ofrecen resultados fiables, pues las decisiones que se toman están basadas en la información que estos proporcionan. En este sentido, la validación de las metodologías junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados con un alto grado de confianza.

Según la norma NTE INEN-ISO/IEC 17025, los laboratorios deben validar todos los métodos que estos utilicen, tanto los empleados por ellos mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas o desarrolladas por otros laboratorios. Además, es necesario que se validen los métodos de referencia, así como todo el procedimiento analítico, teniendo en cuenta el intervalo de concentraciones y matrices de las muestras de rutina (Maroto, 2002).

Los niveles de concentración de mercurio se han obtenido utilizando espectrofotometría de absorción atómica con técnica de vapor frío en distintos tipos de matriz. Por ejemplo, se ha realizado la evaluación de los aspectos básicos del sistema de calidad implantado en el laboratorio de riesgos químicos del Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores (INSAT) de la Habana - Cuba en el año 2005 (Novas *et al*, 2006). A su vez, un estudio realizado en Arequipa - Perú ha establecido los niveles de exposición ambiental, ocupacional y estado de salud de los niños de la comunidad minera artesanal de oro en el sector de Mollehuaca con el uso de esta técnica en muestras biológicas (orina) (ISAT, 2001).

En muestras de agua, la validación de un método para determinar mercurio total y mercurio inorgánico se realizó en 2003 en Córdoba (Valiente, 2005), además se determinó el impacto ambiental por la contaminación de mercurio en aguas, peces y sedimentos en la cuenca del río San Jorge, con el aval del Centro de Investigaciones de la Universidad de Córdoba (Marrugo & Ceballos, 2006).

##### **2.1.1 Los Metales Pesados en el Medio Ambiente**

Los metales pesados son componentes naturales de la corteza terrestre, los cuales tienen una concentración inferior al 0.01%. El término de metal pesado, refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una relativa densidad alta y sea tóxico o venenoso en concentraciones bajas. En el Gráfico 2.1, se observa que tanto en el suelo, agua y aire existen metales pesados que se encuentran en bajas concentraciones y tienen la capacidad de provocar cambios evolutivos debido a sus efectos dañinos en elementos bióticos, dado a que tienden a

bioacumularse y no pueden ser degradados o destruidos. La acción provocada por la lluvia ácida o la actividad industrial genera la formación de grietas en los suelos, ocasionando que los metales pesados penetren hacia aguas subterráneas, ríos, lagos, mares. En pequeñas proporciones se incorporan a los cuerpos por medio del alimento, el agua potable y el aire. Sin embargo, en concentraciones altas pueden conducir a la intoxicación. El envenenamiento por metales pesados podría resultar, de la contaminación del agua potable, las altas concentraciones en el aire cerca de fuentes de emisión, o producto de la ingesta de alimentos (Baird, 1999).

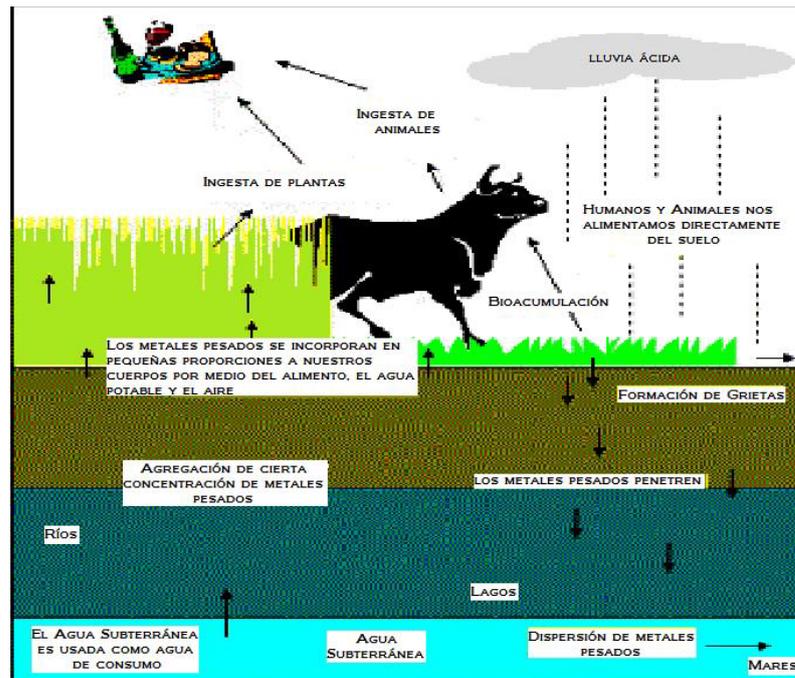


Gráfico 2.1 Procesos de absorción de metales pesados

Fuente: Kiely, 1999

### 2.1.2 La Intervención de Mercurio (Hg) en el Ecosistema. Características y Propiedades

El mercurio se manifiesta de manera natural en el medio ambiente, ocupa el lugar 67 de abundancia entre los elementos de la corteza terrestre. Rara vez se le encuentra en estado puro, de color blanco plateado y brillante, se caracteriza por ser el único metal líquido a temperatura ambiente, lo cual no es buen conductor del calor comparado con otros metales, pero sí es buen conductor de la electricidad. Se combina fácilmente con muchos otros metales como el oro o la plata produciendo amalgamas. Es insoluble en agua pero soluble en ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrado. Es incompatible con el acetileno, el amoníaco, el cloro y los metales (Lacerda & Salomons, 2005).

El mercurio en su estado más conocido es bivalente, esto significa que se asocia con sólo dos átomos. Es dañino por inhalación, ingestión y contacto: se trata de un producto muy

irritante para la piel, ojos y vías respiratorias (Housecraft y Sharpe, 2006). Si no está encapsulado el mercurio metálico, usualmente a temperaturas por encima de los 40 °C se volatiliza parcialmente formando vapores de mercurio que son incoloros e inodoros, tóxicos y corrosivos, más pesados que el aire. La emanación de vapores de mercurio presenta una relación directamente proporcional con la temperatura, esto es, a mayor temperatura, mayor cantidad de vapores de mercurio emanados (Lacerda & Salomons, 2005). En este sentido, la Tabla N°2.1 contiene información acerca de las propiedades fisicoquímicas más importantes del mercurio:

Tabla N°2.1 Propiedades Físico-Químicas

PROPIEDAD	DETALLE
Nombre	Mercurio
Nomenclatura	Hg
Número atómico	80
Valencia	1,2
Estado de oxidación	+2
Electronegatividad	1,9
Radio covalente (Å)	1,49
Radio iónico (Å)	1,10
Radio atómico (Å)	1,57
Configuración electrónica	(Xe)4f <sup>14</sup> 5d <sup>10</sup> 6s <sup>2</sup>
Primer potencial de ionización (eV)	10,51
Masa atómica (g/mol)	200,59
Densidad (g/ml)	16,6
Punto de ebullición (°C)	357
Punto de fusión (°C)	-38,4
Sólido (at)	7.640
Dilatación	Uniforme

Fuente: Proske *et al*, 1960 y Lenntech, 2009.

El mercurio puede enlazarse con otros compuestos como mercurio monovalente Hg (I) o divalente Hg (II). A partir del Hg (II) se pueden formar diversos compuestos orgánicos e inorgánicos de mercurio. Algunos de los compuestos inorgánicos de mercurio son: sulfuro de mercurio (HgS), óxido de mercurio (HgO) y cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) conocidos como sales de mercurio. La mayoría de estos compuestos son polvos o cristales blancos, a excepción del sulfuro de mercurio, que es rojo y se vuelve negro con la exposición a la luz. Algunas sales de mercurio como el HgCl<sub>2</sub> son lo bastante volátiles para existir como gas atmosférico. Sin embargo, la solubilidad en agua y reactividad química de estos gases inorgánicos de mercurio hacen que su degradación en la atmósfera sea mucho más rápida que el mercurio elemental. Esto significa que la vida atmosférica de los gases de mercurio divalentes son mucho más corta en relación al gas de mercurio elemental (Lacerda & Salomons, 2005).

Cuando el mercurio se combina con carbono se forman compuestos conocidos como compuestos "orgánicos" de mercurio u organomercuriales. Existe una gran cantidad de compuestos orgánicos de mercurio como el di-metil-mercurio, fenil-mercurio, etil-mercurio y metil-mercurio que es el más conocido de todos los compuestos orgánicos por ser generado por microorganismos y procesos naturales. El metilmercurio, es un compuesto particularmente inquietante para la comunidad porque puede acumularse en muchos peces de agua dulce y salada, así como en mamíferos marinos comestibles (O'Neill, 2005).

### **2.1.2.1 Ciclos del Mercurio en el Medio Ambiente**

En su ciclo global, el mercurio pasa de los continentes, por desgasificación a los océanos, gracias a la acción de la lluvia y la escorrentía. El mercurio que llega a los océanos se volatiliza y se puede depositar nuevamente en los continentes por acción de los vientos o en los mismos océanos (Sepúlveda *et al*, 2006). Por ello, las reacciones de óxido-reducción transforman las sales inorgánicas de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{HgO}$  y  $\text{HgS}$ ). El  $\text{HgS}$  insoluble, al oxidarse se transforma en sulfitos y sulfato de mercurio solubles, que permiten la ionización del metal y su participación en reacciones químicas posteriores. Los vapores de mercurio se oxidan y se transforman en mercurio iónico divalente en presencia de agua y oxígeno.

El mercurio iónico divalente ( $\text{Hg}^{+2}$ ) puede sufrir dos importantes reacciones en el medio. La primera es la reducción a vapor de mercurio metálico en condiciones reductoras apropiadas con ayuda de algunas bacterias del género *Pseudomonas*. Su biotransformación permite que el plancton contaminado con metil-mercurio sirva de alimento para pequeños peces y mariscos que bioacumulan este elemento, los peces de mayor tamaño y los depredadores, que se alimentan de los de menor tamaño, concentran aún más el mercurio en sus tejidos, proceso conocido como biomagnificación. Estos peces pueden ser comidos por animales superiores como aves o mamíferos, incluso el hombre (Valiente, 2005). Este proceso se encuentra evidenciado en el Gráfico 2.2.

La segunda reacción es la conversión a compuestos de metil y di-metil-mercurio y las interconversiones entre estos compuestos; dichas metilaciones se producen anaeróbica y aeróbicamente. La vía anaeróbica comprende la metilación de mercurio inorgánico por compuestos de metilcobalamina producidos por bacterias metanogénicas en un ambiente moderadamente reductor. En la vía aeróbica, el metil-mercurio unido a la homocisteína, se metila por procesos celulares que, normalmente, dan lugar a la formación de metionina (Sepúlveda *et al*, 2006).

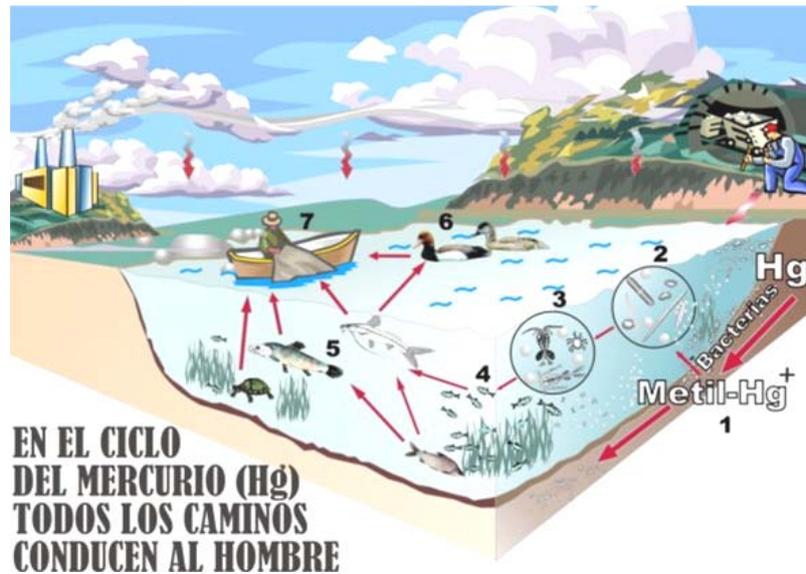


Gráfico 2.2 Modelo conceptual del ciclo del mercurio en el medio ambiente

Fuente: Valiente, 2005

### 2.1.2.2 Usos Industriales del Mercurio

El mercurio metálico se utiliza para la fabricación de interruptores eléctricos y conmutadores automáticos para los refrigeradores como material líquido de contacto, como fluido de trabajo en bombas de difusión en técnicas de vacío, en la fabricación de rectificadores de vapor de mercurio, termómetros, barómetros, tacómetros y termostatos. En la manufactura de lámparas de vapor de mercurio y tubos fluorescentes. Se utiliza en la formación de amalgamas de plata y zinc en odontología como empastes de dientes. Se usa como cátodo en la producción electrolítica como electrodos de referencia en la medición de potenciales y en titulaciones potenciométricas (Carrasquero & Adams, 2002).

El  $\text{HgCl}_2$ , precipita proteínas y se usa como conservante de tejidos y catalizador químico. El cloruro mercurioso o calomel se usa en terapéutica dermatológica como mercurio amoniacado antiséptico y antipsoriásico. El óxido rojo de mercurio se emplea en la fabricación de las pinturas anti-incrustantes que se aplican en los cascos de los barcos y como pigmento rojo. Los óxidos sirven tanto para hacer baterías secas de larga duración como para producir antisépticos. Las sales oxomercúricas, como el sulfonato de mercurio, sirven de catalizadores en la síntesis de ácido acético, cloruro de vinilo y metilestireno (Revelle & Revelle, 1984).

El nitrato ácido de mercurio (mordiente de piel de conejo para convertirlo en fieltro) para taxidermia y tratamientos especiales de pieles. El fluoruro mercúrico para la fluoración de compuestos orgánicos; las sales en las pinturas protectoras, el tratamiento de la madera y el papel. Las sales multicinadas son usadas como fármacos dermatológicos tópicos (psoriasis,

pigmentaciones y antisépticos). El fulminato de Hg es detonante de cartuchería, fácilmente absorbible y cáustico irritante. El acetato de mercurio (alquil) se usa en el tratamiento de granos y simientes, como plaguicida en árboles frutales y como absorbente del etileno. Los fenilmercúricos se utilizan en agricultura como antisépticos para el tratamiento de la madera y los granos. El mercurocromo, el mercurófén, el timerfonato sódico y el timerosal son fármacos antisépticos (Sepúlveda *et al*, 2006).

### **2.1.2.3 Contaminación Provocada por Mercurio**

Debido a la toxicidad que presentan los metales pesados es importante mencionar que no se han encontrado métodos de destrucción o degradación, por lo cual estos deben ser dispuestos de una forma tal que sean inmovilizados para minimizar su dispersión y las consecuencias de su contaminación tanto en plantas, agua, aire, suelo, animales y el hombre (Sepúlveda & Velasco, 2002). El factor a tener en cuenta ante un posible contaminante es su bioacumulación, ya que cuando este tipo de sustancias penetran en los seres vivos no son metabolizadas (Colombo *et al*, 2008).

La contaminación existente provocada por la presencia de mercurio en el medioambiente es una aflicción mundial. En el planeta la concentración de mercurio siempre ha sido la misma, así como con el resto de los elementos químicos naturales, pero la contaminación surge de la mayor movilización que el mercurio sufre desde el comienzo de la era industrial (Sánchez, 2005).

Las actividades industriales que hoy por hoy continúan liberando al ambiente contaminantes mercuriales son, la obtención de oro y plata a partir de minerales por medio de la formación de amalgamas mercuriales; baterías; incineradores de residuos domiciliarios; hospitalarios e industriales; la fabricación de termómetros; barómetros y de contadores directos de corriente eléctrica; lámparas eléctricas y válvulas de radio; la producción de hilo y varillas de tungsteno-molibdeno; la fabricación de compuestos farmacéuticos e instrumentos quirúrgicos que contienen sales de mercurio; la tinción de cristales ópticos y grabados fotográficos; el encurtido del cuero y la manufactura de sombreros de fieltro; la identificación de huellas dactilares mediante el empleo de un polvo de mercurio y yeso y el relleno de cavidades dentarias con amalgamas (Valiente, 2005).

En la Tabla 2.2, se pueden apreciar los porcentajes de consumo promedio de mercurio en el grupo de países llamados industrializados en América, países denominados desarrollados o industrializados según la ONU los cuales son: Canadá, Estados Unidos y Barbados. De alguna manera, estos países denotan la dimensión de los riesgos, de acuerdo con cada quehacer industrial (Lacerda & Salomons, 2005):

Tabla N°2.2 Consumo de mercurio en Países Industrializados

<b>ACTIVIDAD INDUSTRIAL</b>	<b>CONSUMO DE MERCURIO</b>
Plantas de compuestos cloro-alcalis	25%
Equipo eléctrico	20%
Usos militares	20%
Pintura	15%
Sistemas de medición y control	10%
Agricultura	5%
Odontología	3%
Laboratorios	2%

Fuente: Manuhan, 2002 y Sepúlveda *et al*, 2006.

El envenenamiento agudo por mercurio se caracteriza por trastornos de la función intestinal y renal, y por alteraciones del sistema nervioso central. Las exposiciones leves están caracterizadas por pérdida de la memoria, temblores, inestabilidad emocional (angustia e irritabilidad), insomnio e inapetencia. A exposiciones moderadas, se observan desórdenes mentales más importantes y perturbaciones motoras. Las exposiciones breves a altos niveles de vapor de mercurio pueden producir daños pulmonares y la muerte (Valiente, 2005).

#### **2.1.2.1 Límites de Exposición Permisibles de Mercurio**

Los límites permisibles para el mercurio son según TLV (valores límite umbral) en Hg<sup>0</sup> de 0.05 mg/m<sup>3</sup>. En TWA (media ponderada en el tiempo) 0.01 mg/m<sup>3</sup>. En STEL (Límite de exposición a corto plazo) 0.03 mg/m<sup>3</sup>. En el caso de vapor de mercurio, su exposición máxima debe ser de 0.05 mg/m<sup>3</sup> según la TWA. La FDA de los Estados Unidos, fijó un máximo permisible de 0.5 ppm en los alimentos; la OMS en 1971 fijó para la ingesta semanal 0.3 mg de Hg metálico y 0.2 mg de metil-mercurio; y en España el límite permisible para alimentos es de 1 mg/L (Lacerda & Salomons, 2005).

La normativa que controla los límites permisibles de mercurio en agua, es el TULAS, con límites máximos permisibles según el uso que se le dará al agua. En este sentido, el Anexo 1, expone las tablas que confirman la concentración máxima de Hg en los distintos tipos de agua, tal es el caso de las aguas de consumo humano y uso agrícola los cuales presentan un límite de 0.001mg/L, para aguas de uso pecuario y de descarga al sistema de alcantarillado con una concentración de 0.01mg/L y en agua dulce con un límite de concentración del 0.005mg/L (TULAS, 2003).

### **2.1.3 Origen y Clases de Contaminación del Agua**

Un hecho que agrava la ya escasa disponibilidad de agua dulce, es la contaminación a causa de actividades humanas. Aunque también existe la contaminación natural, que es aquella provocada por algunos fenómenos naturales como las corrientes marinas (Corriente del Niño), las mareas rojas o los aluviones (Sánchez, 2005). La contaminación directa de las aguas por los vertidos incontrolados de algunas industrias a través de grandes tubos a ríos, lagos o mares es la acción que más afecta a la flora y la fauna acuática, en especial a los peces, que son, ampliamente, el alimento más sometido a la contaminación mercurial. Por ejemplo, a medida que se asciende en la cadena trófica o alimentaria, los niveles de contaminación mercurial son mayores, así, los peces depredadores acumulan más mercurio que aquellos que están en niveles más bajos de la cadena alimenticia (Nebel, 1999).

La contaminación del agua es un problema complejo, que se clasifica en tres tipos que inciden en gran medida sobre el agua, estas son: la contaminación por residuos industriales como la explotación minera, forestal y la agricultura, los cuales arrojan residuos industriales líquidos y productos químicos tóxicos a las redes de alcantarillado, al suelo o directamente a los cursos de agua. De la misma manera, algunos compuestos orgánicos sintéticos producidos en procesos industriales (pulpa y papel, químicos, relaves mineros, petroquímicos, metalúrgicos, textiles) van a parar a ríos o al mar (Metcalf & Eddy, 2006).

La contaminación difusa se manifiesta tanto en aguas subterráneas, donde las filtraciones en las capas de la tierra absorben la lluvia con sedimentos, sales de mercurio, fertilizantes y pesticidas, como en las aguas servidas que son utilizadas para riego, provenientes de las actividades agrícola, forestal, acuícola o minera (Sánchez, 2005). Y la contaminación por petróleo y otras sustancias tóxicas donde los derrames accidentales en las costas marinas, el océano, los ríos o lagos provocan un detrimento en el ecosistema, matando especies o provocando efectos duraderos en organismos biológicos propios de la zona al retener alta concentración de contaminantes (Tapia & Toharia, 2005).

El contenido de las aguas de formación varía en los diferentes yacimientos, pero puede contener además de petróleo y aniones, metales pesados como el mercurio (American Petroleum Institute, 2005). A su vez, los contaminantes orgánicos persistentes (COPs) como el metil-mercurio o el di-metil-mercurio, resistentes a la desintegración, se acumulan en los tejidos de organismos vivos, alterando el funcionamiento del sistema hormonal que, a su vez, provoca problemas de infertilidad, induce el cáncer, afecta al sistema inmunológico e incluso puede llegar a provocar la muerte (Nebel, 1999).

Cuando todas estas clases de contaminación se intensifican, el agua no tiene tiempo suficiente para auto depurarse por vías naturales y requiere de tratamientos especiales que la limpien. Si esto no ocurre, se mantiene contaminada por más y más tiempo, amenazando la disponibilidad de agua limpia para el hombre y afectando los sistemas biológicos naturales de peces y otras formas de vida hidrobiológica (Revelle & Revelle, 1984).

#### **2.1.4 Técnicas de Detección de los Niveles de Contaminación**

Para detectar y medir la concentración de mercurio en los diferentes estratos de la biosfera se utilizan muchas técnicas, entre las cuales se destacan; el método colorimétrico de la ditizona, el fotómetro para luz ultravioleta, la absorbimetría atómica, el método de espectrofotometría de absorción atómica sin llama y el detector de gases (Sepúlveda & Velasco, 2002).

##### **2.1.4.1 Generalidades de la Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS). Principios y Usos**

Los métodos analíticos espectroscópicos se fundamentan en medir la cantidad de radiación que producen o absorben las especies moleculares o atómicas de interés. Es posible clasificar los métodos espectroscópicos según la región del espectro electromagnético utilizado para la medida. Las regiones del espectro que se han utilizado abarcan los rayos gama, rayos X, radiación ultravioleta (UV), radiación infrarroja (IR), microondas y radiofrecuencias (RF). La espectroscopía, es conocida como la ciencia que establece las interacciones de la radiación electromagnética absorbida, dispersada o emitida por átomos, moléculas u otras especies químicas (Skoog *et al*, 2005).

Dado que cada especie posee estados energéticos característicos, la espectroscopía puede utilizarse para identificarlas y cuantificarlas. Constituye la base del análisis espectroquímico, donde la interacción de la radiación electromagnética con la materia genera información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición de una muestra. Dentro del análisis espectroquímico, la espectroscopía atómica estudia la absorción y emisión de la radiación por especies atómicas, las cuales son generadas y examinadas en un medio gaseoso de alta energía, que constituye una fuente de vaporización-atomización-ionización-excitación, la atomización en particular se logra únicamente a altas temperaturas, salvo el caso del mercurio que presenta presión de vapor favorable a temperatura ambiente. (Rouessac & Rouessac, 2007).

La espectroscopía atómica se usa ampliamente para analizar átomos metálicos en cantidades traza (ppm, ppb) en minerales, muestras biológicas, metalúrgicas, farmacéuticas, aguas, alimentos, suelos y sedimentos. En el Gráfico 2.3, se muestra un esquema típico del equipo de absorción atómica que consiste en: una lámpara de cátodo hueco, una lámpara de

deuterio para corrección de lectura por absorción no atómica, un modulador o detector, un atomizador, un monocromador y un transductor o amplificador (Manosalvas, 2005; Harris, 2007).

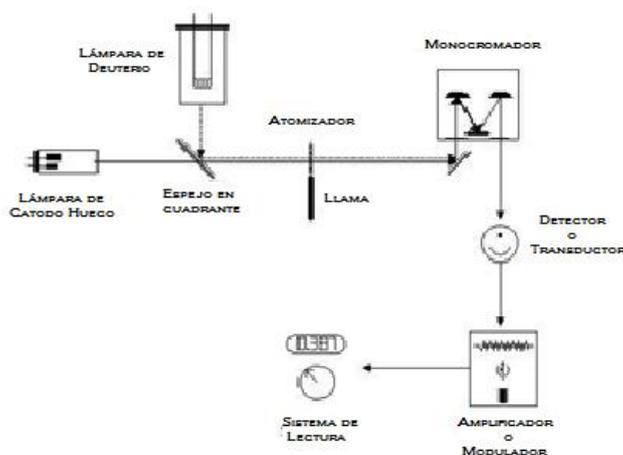


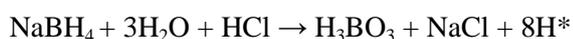
Gráfico 2.3 Esquema de equipo de absorción atómica

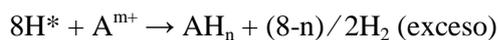
Fuente: Castro, 2000.

#### 2.1.4.2 Técnica de Atomización con Generación de Vapor Frío.

La técnica de atomización por vapor frío, es aplicable solo a la determinación de Hg por ser el único metal que tiene una adecuada presión de vapor a temperatura ambiente, por ello no es necesario entregarle la energía de una llama a la muestra de análisis (Antuña, 2007). Se convierte todo el mercurio de la muestra en Hg (II) y posteriormente se reduce a Hg<sup>0</sup> por adición de cloruro de estaño (SnCl<sub>2</sub>) o borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) que actúan como agente reductor. El mercurio volátil es acarreado por un gas inerte (Ar o N<sub>2</sub>) a una celda de cuarzo interpuesta sobre el paso óptico. Dependiendo de la cantidad de Hg que posea la muestra de análisis, este se abre camino, con la ayuda del gas de arrastre hasta llegar a la celda, absorbiendo la energía proveniente de la lámpara y traduciéndose en señal de absorbancia como muestra el Gráfico 2.4 (Harvey, 2002).

La técnica de generación de vapor frío a través de espectroscopía de absorción atómica consta de tres etapas fundamentales que son: la generación y volatilización del hidruro, la transferencia del mismo y su posterior atomización en el espectrómetro de absorción atómica. La reacción generada por el borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>), el ácido clorhídrico (HCl), y la muestra de análisis es conducida a través del equipo de generación hacia el espectrómetro de absorción atómica por medio del efecto del flujo del gas de arrastre (Ar o N<sub>2</sub>), del cual se obtiene:





Donde  $\text{H}^*$  es el hidrógeno naciente; “A” es el elemento formador de hidruro y “m” su estado de oxidación (que puede no coincidir con “n”, el índice de coordinación) (Skoog *et al*, 2005).

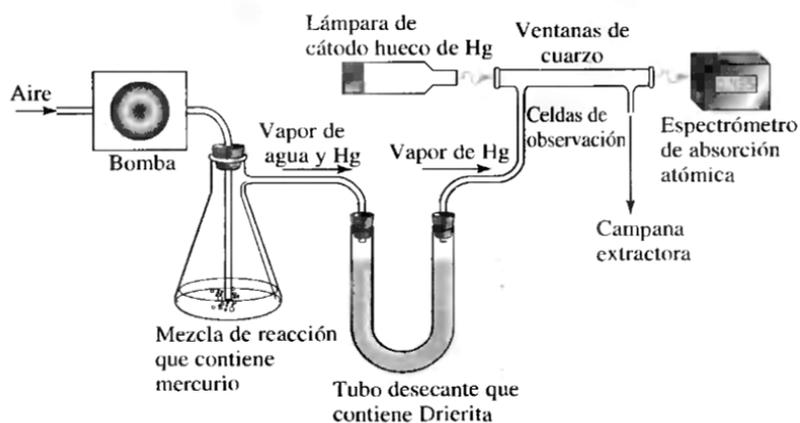


Gráfico 2.4 Esquema del proceso de determinación de mercurio por generación de vapor frío

Fuente: Skoog *et al*, 2005

### 2.1.4.3 Métodos de Cuantificación

La cuantificación se basa en la ley de Lambert-Beer, que expresa lo siguiente: cuando un haz de luz de una longitud específica pasa a través de una sustancia, cierta cantidad de radiación es absorbida por la sustancia y otra porción se transmite a través de ésta. La cantidad de energía absorbida, depende de la concentración de sustancia y del trayecto óptico que recorre el haz de luz. La transmitancia (T) de la solución, es la fracción de radiación incidente transmitida por la solución, que se representa en la ecuación 2.1 (Harris, 2007).

$$T = I / I^{\circ} \quad (2.1)$$

En donde:

T = transmitancia

I = radiación transmitida

$I^{\circ}$  = radiación incidente

La absorbancia es el logaritmo negativo de la transmitancia, que se exhibe en la ecuación 2.2:

$$ABS = - \log T \quad (2.2)$$

En la ecuación 2.3 se demuestra que la absorbancia, es directamente proporcional a la longitud de la trayectoria de la radiación ( $b$ ) y concentración de la sustancia absorbente ( $c$ ). Donde ( $a$ ) es una constante de proporcionalidad, cuyo nombre está dado por las unidades en que esta constante esté expresada. Si sus unidades son litro  $\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$  se llama coeficiente de absorción, y si son litro  $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  se llama absortividad molar (Harris, 2007).

$$ABS = a*b*c \quad (2.3)$$

La cuantificación se puede llevar a cabo mediante una serie de métodos entre los que se puede citar la construcción de curvas de calibración y el método de adiciones. El análisis mediante curvas de calibración se hace elaborando una gráfica de la absorbancia versus la concentración, midiendo la absorbancia de varios patrones de distintas concentraciones, con lo cual se obtiene una línea recta que pasa por el origen. La pendiente de esta recta estará dada por el coeficiente de absorción ( $a$ ) y el trayecto óptico ( $b$ ), por lo tanto a medida que aumenta la concentración ( $c$ ), aumenta la absorbancia de la muestra (Harvey, 2002).

#### **2.1.4.4 Interferencias Analíticas**

En ciertas determinaciones se pueden presentar problemas en el análisis, estos pueden ser resueltos en dependencia de la experiencia y conocimientos que tenga el analista, sobre la metodología a utilizar. En espectrofotometría existen ciertas interferencias analíticas las cuales pueden producir errores en la cuantificación, pero pueden ser corregidas según su origen. Las interferencias pueden ser de varios tipos: espectrales, químicas, por ionización y de matriz (Harvey, 2002).

Las interferencias se producen cuando otro átomo distinto al analito absorbe una longitud de onda con una diferencia de 1nm. Estas interferencias están íntimamente relacionadas con el poder de resolución del monocromador, y puede ser minimizada por modulación de la amplitud de la fuente de radiación (Haswell, 1991).

Estas son más comunes que las interferencias espectrales, pueden ser minimizadas si se escogen las condiciones de trabajo adecuadas (Harvey, 2002). Existen algunos compuestos que son difíciles de disociar, esto significa que no se los puede atomizar con facilidad. El uso de llamas de distintas temperaturas o el uso de agentes liberadores como el EDTA, son formas de corregir estas interferencias (Haswell, 1991).

Las interferencias por ionización se presentan en llamas muy calientes. A temperaturas elevadas de la flama y del horno, los átomos con bajos potenciales de ionización son

efectivamente ionizados. Cualquier ionización reduce la población de los átomos libres tanto en el estado basal como en el estado excitado, disminuyendo entonces la sensibilidad de la determinación (Skoog & West, 2001). Este problema se resuelve rápidamente añadiendo un exceso (aproximadamente de 100 veces) de un elemento más fácilmente ionizable, como K, Cs o Sr, para inhibir la ionización tanto en las soluciones de la muestra como en las de calibración. También puede ser eliminada al controlar las condiciones de análisis, como la temperatura de llama y flujo de los gases (Haswell, 1991).

Finalmente, las interferencias de matriz, se registran, debido a que cada matriz líquida de una muestra tiene distinta composición, por lo tanto, la tensión superficial y la viscosidad serán diferentes, estas características pueden afectar el proceso de nebulización y posteriormente la cuantificación del analito (Harvey, 2002). El principal problema, es que la velocidad de aspiración de la muestra difiera a la velocidad de aspiración del estándar. Si estas características no se controlan de modo que no cambien durante el análisis, la cantidad de átomos en la llama en un momento dado puede variar y dar lecturas incorrectas. Para evitar este tipo de interferencia hay que tener una composición igual entre las muestras y los patrones, de modo que estos ingresen y se nebulicen de la misma forma (Haswell, 1991).

### **2.1.5 Proceso de Validación de Métodos Analíticos**

La validación de métodos, es una de las medidas universalmente reconocidas como parte necesaria de todo sistema completo de garantía de calidad en la química analítica. Es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva que revele el cumplimiento de requisitos para una utilización o aplicación específica de un método de análisis previsto. En el pasado, ISO, IUPAC y AOAC INTERNATIONAL han cooperado para elaborar protocolos o directivas comunes sobre la realización e interpretación de estudios de la eficiencia de métodos analíticos, sobre ensayos de aptitud, sobre control interno de calidad en laboratorios de química analítica, y sobre el uso de datos de recuperación en las mediciones analíticas. La IUPAC, se ha encargado ahora de elaborar protocolos para establecer directrices de validación de métodos de análisis en un solo laboratorio. Dichas directrices ofrecen recomendaciones mínimas sobre los procedimientos que deben seguirse para garantizar una validación adecuada de los métodos analíticos (Castellucci, 2005).

La validación es necesaria porque proporciona un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados lo cual permite un conocimiento profundo de sus características de funcionamiento. Los métodos analíticos deben ser validados para cumplir con las exigencias legales requeridas por organismos de acreditación (FDA, 2000).

La validación se aplica a un protocolo definido para determinar un analito específico y el rango de concentraciones en un tipo de material de prueba particular utilizado para un propósito específico. En general, la validación debe comprobar que el método se comporte de forma adecuada para la finalidad perseguida en todo el conjunto de concentraciones del analito y de materiales de referencia a los que se aplica. Por consiguiente, estas características y los criterios de adecuación al propósito, deben especificarse en su totalidad antes de realizarse la validación (Castellucci, 2005).

#### **2.1.5.1 Requerimientos para la Validación de Métodos**

La autora coincide con el criterio que para validar un método analítico se requiere de ciertas normas, que incluyen buena organización funcional, el suficiente número de analistas capacitados, instalaciones adecuadamente abastecidas con equipos y aparatos apropiados, calificados y en buen estado de funcionamiento para el desarrollo de los procesos analíticos, métodos escritos disponibles, actualizados y certificados, procedimientos adecuados para toma de muestras, utilización de reactivos correctos y soluciones valoradas idóneas, así como material auxiliar pertinente y en perfectas condiciones de uso, utilización de patrones y muestras de referencia, verificación y supervisión de los resultados obtenidos de cada análisis y que los registros de dichos análisis efectuados sean auditables, proporcionar una correcta información y comunicación de los resultados obtenidos, higiene limpieza y seguridad, control y seguimiento de calidad mediante inspecciones y auditorías internas con personal de la propia sección de trabajo (Norma INEN ISO/IEC 17025, 2005).

El laboratorio, debe utilizar los métodos de ensayo o de calibración que satisfagan las necesidades del cliente y que sean apropiados para los ensayos o calibraciones que se realizan. Es necesario elaborar un procedimiento que especifique las acciones a realizarse, y todo lo relativo al ensayo, condiciones ambientales, equipo pertinente, reactivos, manipulación, preparación de estándares, material de referencia, muestras de análisis y cálculos (Norma INEN ISO/IEC 17025, 2005).

La normalización de métodos es una actividad previa a la validación, para obtener un conocimiento general del método de ensayo; se aplican los pasos para poner el método en funcionamiento de forma razonable y consistente, si no se logran satisfacer los criterios en esta etapa, se puede corregir y hacer ajustes (FDA, 2000).

Los parámetros de validación deben ser entendidos antes de la ejecución de la misma; si el método es oficial o ya tiene parámetros estadísticos, debe ser verificado en condiciones de laboratorio. En la Tabla 2.3, se enuncian las medidas que un método analítico debe seguir para poder ser validado.

Tabla N°2.3 Parámetros de Validación de un Método Analítico

PARÁMETRO	DEFINICIÓN
<b>Selectividad / Especificidad</b>	Capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente un analito sin interferencias.
<b>Linealidad</b>	<p>Función de respuesta instrumental conocida como recta de calibrado:</p> $y = a+bx$ <p>Donde "y" es la linealidad</p> <p>Que es la proporcionalidad entre concentración de analito y el sistema de respuesta.</p>
<b>Sensibilidad</b>	Considerada como la pendiente de la curva, es la capacidad de un método analítico de registrar ligeras variaciones de la concentración.
<b>Precisión</b>	<p>Repetibilidad: Precisión de un análisis donde la única fuente de variación es el análisis de muestras repetidas.</p> <p>Reproducibilidad: Precisión obtenida cuando se comparan los resultados de distintas muestras, análisis o métodos.</p>
<b>Límite de Cuantificación</b>	Es la más baja concentración del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión, repetibilidad y exactitud exigida por la norma o cliente.
<b>Límite de Detección</b>	<p>Mínima concentración de analito que puede detectarse pero no necesariamente cuantificarse.</p> <p>Es determinado comparando los valores obtenidos con los valores definidos como teóricos.</p>
<b>Exactitud</b>	$\% \text{ Recuperación} = \frac{X_{\text{obtenido}}}{X_{\text{teórico}}} * 100$
<b>Intervalo o Rango de Trabajo</b>	Está comprendido entre el límite de cuantificación y el valor del mayor patrón usado.
<b>Incertidumbre</b>	Gama de valores posibles que es razonable esperar de una medida o resultado; abarca todos los errores, tanto sistemáticos como aleatorios.

Fuente: Harvey, 2002 y Winefordner, 2003.

### 2.1.5.2 Estimación de los Criterios de Aceptación

Los requisitos pueden ser establecidos por la demanda que ha originado la necesidad analítica de determinar límites de cuantificación, exactitud y precisión. Si no se dispone de requisitos regulados, la fuente de información es bibliográfica o por la experiencia adquirida durante la normalización del método (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2002).

La obtención de la función de respuesta instrumental, puede realizarse con seis niveles de concentración (5 patrones más un blanco), cinco veces en condiciones de repetibilidad. Para la determinación de la exactitud (recuperación) de materiales de referencia, mediante tres

niveles, con cinco repeticiones. El procesamiento de las muestras se realiza en condiciones de repetibilidad y aplicando el método completo. En el tratamiento estadístico se realiza el análisis de varianza simple de los resultados obtenidos para el cálculo de la precisión por niveles, además de los límites de detección y cuantificación, el intervalo de trabajo y la incertidumbre asociada a cada nivel (Norma INEN ISO/IEC 17025, 2005).

#### **2.1.5.3 Exigencias para la Elaboración de Informes de Resultados**

Mediante un informe de ensayo validado que resuma los parámetros determinados, se deben recopilar las características del método. Todos los datos obtenidos de la realización deben ser perfectamente auditables en los diarios de laboratorio u hojas de trabajo. Los informes técnicos emitidos deben incluir las referencias de la calibración y cualificación de los instrumentos utilizados, y los resultados de la verificación de los parámetros de idoneidad, antes de iniciar el estudio de la validación.

En tal sentido, se debe describir el procedimiento del método utilizado, además, se entregan los resultados de cada parámetro incluyendo esquemas, copias originales de espectros, curvas de calibración, etc. Un certificado de validación deberá ser firmado por las personas responsables, e incluye un resumen del protocolo y de los resultados obtenidos o bien anexarse al final del informe. Finalmente, los documentos referentes a la validación se deben archivar adecuadamente durante todo el tiempo de vigencia del método analítico validado (Harvey, 2002; Norma INEN ISO/IEC 17025, 2005).

#### **2.1.5.4 Alcance de los Estudios de Validación**

El alcance de la validación de un método nuevo, modificado o desconocido depende del estatus del método y de la competencia del laboratorio encargado de llevarla a cabo (Castellucci, 2005). Mediante un ensayo colectivo, el laboratorio debe comprobar si es capaz de alcanzar su rendimiento publicado o si es capaz de cumplir los requisitos de las tareas analíticas.

El laboratorio debe realizar estudios de la fidelidad, del sesgo (incluidos estudios de variación de la matriz) y posiblemente estudios de la linealidad, aunque puede omitir algunas pruebas, como por ejemplo la de robustez (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2002). En el laboratorio, es necesario utilizar un método validado, pero con una nueva matriz, en un ensayo colectivo que debe ser comprobado. Se contrasta el mismo rango de validación con la aplicación de un método empírico. Es decir, la cantidad estimada es simplemente el resultado hallado tras aplicar el procedimiento. Esto difiere de las mediciones que valoran cantidades independientes del método, como la concentración de un analito particular en una muestra, en las que el sesgo del método es convencionalmente cero y la variación de la matriz es irrelevante (Winefordner, 2003).

### 2.1.5.5 Aseguramiento de la Calidad de los Resultados de Ensayo y de Calibración

Los documentos emitidos son una parte esencial de la validación ya que intervienen en todo el proceso. Consiste en un plan práctico diseñado para el desarrollo de la validación tanto en la parte experimental como en los cálculos de la misma. En la Tabla 2.4, se presenta el esquema de un protocolo de validación (Winefordner, 2003; Norma INEN ISO/IEC 17025, 2005):

Tabla N°2.4 Fases de Validación de Métodos Analíticos

ITEMS	DEFINICIÓN
<b>Objetivo</b>	Exposición clara de la finalidad de la validación y propuesta de fechas de inicio y final.
<b>Responsables</b>	Personas que llevarán a cabo la validación y quienes aprobarán.
<b>Factores críticos</b>	Se identificarán los factores de mayor influencia sobre las características de funcionamiento del método analítico.
<b>Parámetros a estudiar</b>	Se seleccionan en función de las características de la muestra, tipo de método analítico y rango de concentración del analito.
<b>Muestras</b>	Se realizará de acuerdo con los procedimientos escritos que indican también los sistemas de rotulación y tratamiento previo de las muestras.
<b>Equipos</b>	Se han de identificar los aparatos a utilizar en el proceso de validación, y comprobar que están convenientemente cualificados, incluyendo estos datos en el informe de validación.
<b>Métodos analíticos</b>	Existirán métodos escritos provisionalmente describiendo el procedimiento para la determinación de parámetros a evaluar, con indicación de reactivos, patrones, materiales, técnicas y cálculos.
<b>Límites de aceptación</b>	Se establecerán a priori para cada uno de los parámetros, basándose en las necesidades o finalidad del método y en la información recogida durante la fase de desarrollo del procedimiento analítico.

Fuente: FDA, 2000.

## 2.2 Fundamentación Filosófica

Esta investigación, se basa en un paradigma positivista que tiene como escenario de exploración el laboratorio mediante un diseño pre-estructurado y esquematizado; su lógica de análisis rige lo confirmatorio, reduccionista, evidencial, inferencia e hipotético-deductivo mediante el análisis de resultados. Además, la realidad es única y fragmentable en partes que se pueden manipular independientemente, y la relación sujeto-objeto es independiente. Para este enfoque la realidad es una muestra exterior, ajena, objetiva que debe ser estudiada y por tanto conocida (Reichart & Cook, 1986).

### **2.3 Fundamentación Legal**

La Legislación Ambiental y de Seguridad, vigente en el Ecuador establece varias disposiciones en cuanto al manejo de productos peligrosos, al igual que regula los límites máximos permisibles en vertidos y emisiones. Cada organismo a cargo de la aplicación de un determinado cuerpo legal mantiene un sistema de gestión para el control de las disposiciones establecidas. El mercurio y sus compuestos al ser categorizados como peligrosos intervienen en varios aspectos regulados por las leyes establecidas.

En la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua del TULAS se establece los límites máximos permisibles de concentración de mercurio establecidos, los cuales proporcionan criterios para evaluar el nivel de contaminación de un compuesto específico, en el agua según el uso que se pretenda. El Anexo 1, se confirman los niveles de incidencia aptos en agua sobre todo del mercurio.

En el Reglamento Ambiental Minero, se establecen medidas de prevención y control de la contaminación para los procesos en los que interviene el mercurio, estipuladas en el Art. 61.- Amalgamación y Art. 71.- Uso de mercurio.

El Reglamento General Sustitutivo de La Ley de Minería en gran parte de su contexto, implanta los aspectos para la prevención, control y mitigación de la contaminación con mercurio, los cuales se encuentran implícitos en diferentes artículos en los capítulos 4 y 6.

En el Convenio de Basilea, en los Artículos 1 y 4, y en el Anexo I se dispone el análisis sobre el establecimiento de instalaciones adecuadas para la eliminación racional de residuos aplicables a la contaminación con mercurio. En este sentido, varios municipios cumplen con la recolección selectiva de pilas y lámparas fluorescentes, la disposición final se realiza en vertederos de seguridad previo a una encapsulación. Sin embargo, existen otros municipios que efectúan la recolección de residuos en forma selectiva (Orgánicos e Inorgánicos) como: Municipio de Cuenca, Loja, Zamora, Otavalo, Espejo (El Ángel), Antonio Ante, Sucúa, Atuntaqui, y algunos de ellos tienen proyecciones para hacer la separación de residuos peligrosos.

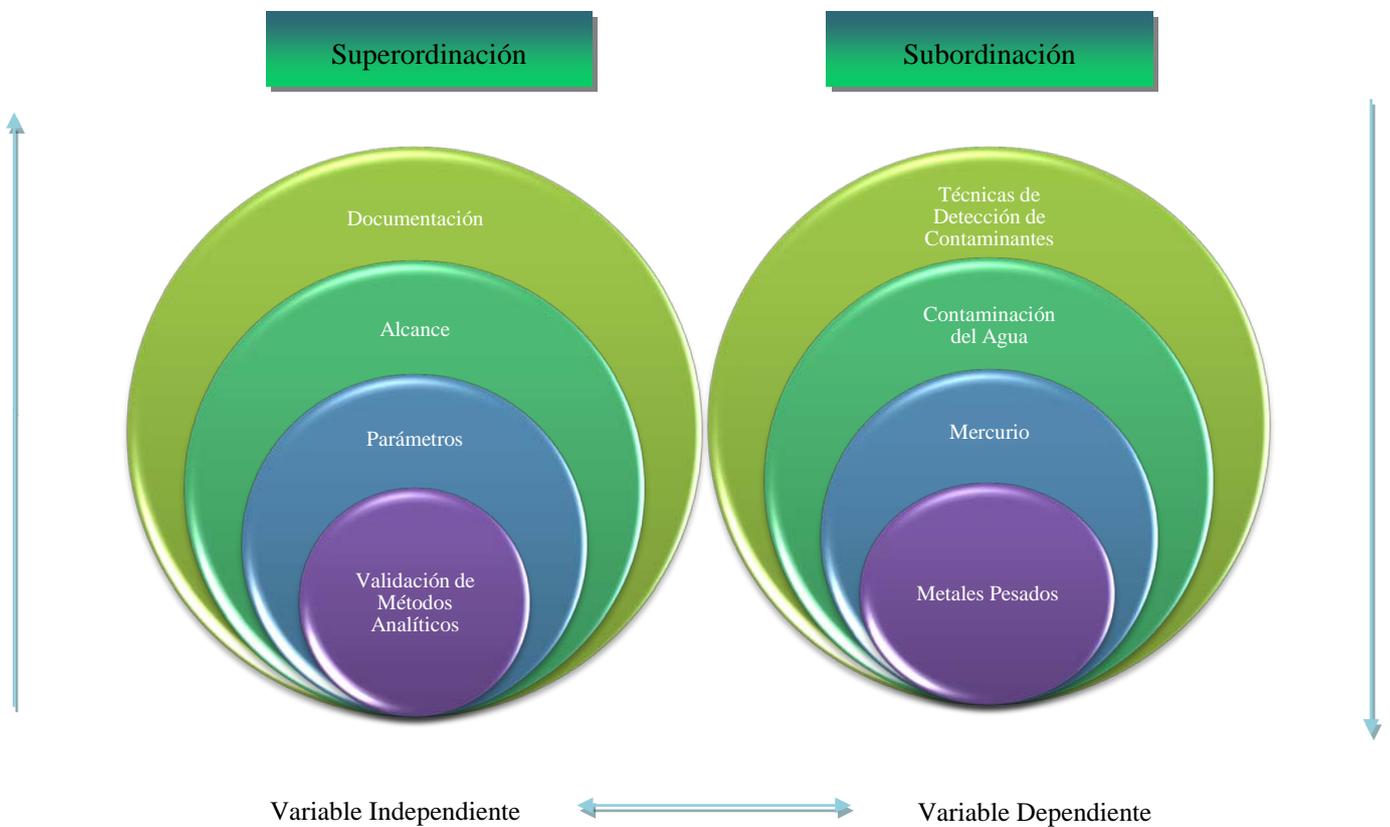
En la Ordenanza Metropolitana 213, se estipula en los capítulos I y V que el único gestor autorizado para la gestión de pilas y fluorescentes con mercurio es la empresa HAZWAT, en donde se hace el encapsulamiento y disposición en un vertedero de seguridad. Existe otro proyecto liderado por SWISS-CONTACT, en el que se hace la destrucción de los tubos fluorescentes, con un equipo especializado en donde el gas se retiene en unos filtros que tienen un período de vida dependiendo de la cantidad de tubos destruidos, aproximadamente 1500

unidades. Una vez que los filtros terminan con el tiempo de vida útil se los dispone encapsulados en vertedero de seguridad.

En tal sentido, la Norma Técnica de Residuos Peligrosos; mantiene definido el límite de la concentración de mercurio en un residuo sólido para no considerarlo como peligroso mediante la prueba de lixiviación. Los compuestos de mercurio se catalogan como compuestos bioacumulantes y persistentes, definiéndose la carga límite tolerable para estos compuestos. Las normas técnicas establecen los límites máximos permisibles de concentración de mercurio en el agua residual (UNITAR, 2010).

## 2.4 Categorías Fundamentales

### 2.4.1 Gráfico de Inclusión



Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

## **2.5 Hipótesis**

### **2.5.1 Hipótesis Nula**

Los tratamientos resultantes producto de la correlación de los factores de estudio no presentan buenas condiciones del uso del equipo además de características no lineales obtenidas de las respuestas experimentales.

### **2.5.2 Hipótesis Alternativa**

Los tratamientos resultantes producto de la correlación de los factores de estudio presentan las mejores condiciones del uso del equipo además de características lineales obtenidas de las respuestas experimentales.

## **2.6 Señalamiento de Variables**

### **2.6.1 Variable Independiente**

Validación de métodos analíticos.

### **2.6.2 Variable Dependiente**

Determinación de mercurio.

## **CAPÍTULO III**

### **3. METODOLOGÍA**

El presente trabajo investigativo ha sido predominantemente cuantitativo puesto que requirió realizar la validación del método analítico para la determinación de mercurio por espectroscopía de absorción atómica con técnica de vapor frío en muestras de agua residual, natural y de consumo.

#### **3.1 Modalidad Básica de la Investigación**

Se han establecido modalidades de investigación experimental y bibliográfica.

##### **3.1.1 Experimental**

La aplicación de métodos de análisis estadísticos para el mejor acondicionamiento del equipo y para el desarrollo de la validación de mercurio, permitió principalmente comprobar el nivel de concentración de este analito en distintos tipos de matriz en aras de interpretar los valores de absorbancia proporcionados mediante la implementación de la técnica de generación de vapor frío mediante espectroscopía de absorción atómica.

#### **3.2 Tipo de la Investigación**

##### **3.2.1 Exploratoria**

Se analizaron los distintos tipos de matriz de investigación, y las mejores concentraciones de analito que establecieron una relación lineal en condiciones instrumentales capaces de optimizar el análisis siendo comparados con material de referencia certificado.

##### **3.2.2 Descriptiva**

Se determinó la concentración de mercurio en una misma matriz de estudio, con distintas muestras de análisis como agua residual, agua natural y agua de consumo, una vez obtenida la curva de calibración establecida con estándares en concentraciones fijadas, y su posterior comparación con los datos obtenidos del tratamiento del material de referencia se obtuvieron valores de concentración de mercurio en las muestras de análisis con la utilización de adición de estándar en cada una de ellas mediante el empleo de un método específico de análisis para mercurio con técnica de generación de vapor frío en espectroscopía de absorción atómica, lo cual permitió el desarrollo de la validación con la finalidad de emitir datos confiables acerca de los niveles de incidencia de mercurio en este tipo de matriz.

### **3.2.3 Asociación de Variables**

La determinación del grado de concentración del mercurio con muestras patrón y el estudio con material de referencia han permitido evaluar el método analítico empleado, y con ello la validación del mismo obteniéndose de esta manera resultados de calidad.

## **3.3 Método y Técnica de Investigación**

### **3.3.1 Alcance de Condiciones Óptimas para el Equipo de Generación-Vapor Frío**

Las especificaciones que fueron empleadas para la obtención de las mejores condiciones del rendimiento del equipo de generación de vapor frío, fueron tomadas del Manual de Manejo SHIMADZU GHV-1 y de la sección 3114B sobre la determinación de metales mediante métodos normalizados del APHA. Se estableció en base a estas fuentes bibliográficas algunos factores de estudio como, el agente reductor utilizado y el nivel de presión del gas de arrastre, para lo cual, se prepararon cuatro diferentes concentraciones del agente reductor ( $\text{NaBH}_4$ ) 0.2%, 0.3%, 0.4% y 0.5% que fueron codificadas en las tablas de resultados como a1, a2, a3, a4 respectivamente (la preparación de estos reactivos se encuentra en el Anexo 2), y se aplicó tres diferentes presiones del gas de arrastre (Ar) de 32.7psi, 46.4psi y 57.6psi y que fueron codificadas en las tablas de resultados como b1, b2, b3 respectivamente (APHA, 2005; SHIMADZU CORPORATION, 2005).

#### **3.3.1.1 Ensamble del Equipo de Generación de Vapor Frío**

Se realizó el procedimiento de conexión de mangueras, las cuales fueron enganchadas en las ranuras de la placa del sujetador del tubo, haciéndolas correr a lo largo del rotor, se las enganchó a las ranuras del costado superior de la placa, para luego sostenerlas con la grapa ubicada junto al rotor en el lado derecho del panel frontal, las mangueras pasaron a través del agujero superior izquierdo de dicho panel para conectarse a los tubos de aspiración, se colocó en el costado izquierdo las botellas de los reactivos tanto de la solución de  $\text{NaBH}_4$  como la solución de HCl, se verificó que la perilla de control de velocidad del rotor se encontrara aproximadamente en 35 revoluciones.

Por otro lado, el separador gas/líquido ubicado en la cara izquierda del equipo, se conectó a la celda de cuarzo por medio de un tubo de caucho, donde, uno de sus extremos embonó en la abertura superior del separador gas/líquido, y el otro extremo se sujetó en el pico inferior de la celda de cuarzo, la misma que estaba fijada a un soporte conectado sobre el mechero del equipo de absorción atómica.

### **3.3.1.2 Funcionamiento del Equipo de Absorción Atómica con Generador de Vapor Frío**

Para su acondicionamiento, el equipo de absorción atómica se encendió quince minutos antes de la primera lectura, durante este tiempo se siguieron los pasos para la puesta a punto del equipo, en tal sentido, se colocó y acopló la lámpara de mercurio de cátodo hueco en el primer cañón de la bandeja de 8 lámparas con la que consta el equipo, se encendió el interruptor del mismo para que cada dispositivo reconozca las nuevas indicaciones, se escogió el elemento de la lista de metales de análisis, correspondiente al mercurio ubicado en la posición número 22, se ajustó la longitud de onda ( $\lambda$ ) en 253.7nm, y la intensidad de energía de la lámpara de cátodo hueco fue de 4nm, se alineó la celda de cuarzo al trayecto luminoso con la ayuda de las perillas ubicadas en la base del mechero.

Posteriormente, se encendió la lámpara de deuterio al presionar el interruptor colocado junto al botón de encendido, estas condiciones fueron almacenadas por el equipo, lo que permitió observar en la pantalla del amplificador el inicio de la lectura y se comprobó que el procesamiento de la señal estuvo dado en tiempo real al observarse diferencia de absorbancias al momento de interferir en el trayecto luminoso, con este proceso se verificó que las condiciones y alineamiento fueron las adecuadas.

A continuación, se encendió el interruptor del generador de vapor frío y se controló que el flujo de circulación de líquidos fuera continuo, para ello, en un recipiente con agua destilada se colocó los tres tubos de aspiración y se determinó que durante 15 minutos la corriente de agua fue estable, tanto en los tubos de aspiración como en el serpentín de reacción. Finalmente, se colocó los tubos de aspiración en los frascos correspondientes para la muestra y los reactivos ( $\text{NaBH}_4$  y  $\text{HCl}$ ) lo que dio inicio a la lectura del blanco, estándares, muestras y material de referencia.

Finalizadas las lecturas de análisis, se apagó el interruptor del generador de vapor frío, se desconectaron todas las mangueras de absorción para evitar el excesivo estiramiento de las mismas, y se cerró la válvula del tanque de argón (Ar). Subsiguientemente, se procedió a apagar la lámpara de deuterio, se colocó en cero la intensidad de la lámpara de cátodo hueco y se apagó el interruptor del equipo de absorción atómica.

### **3.3.2 Método Analítico Empleado para la Determinación de Mercurio**

El método analítico empleado para la determinación de mercurio fue en base a métodos normalizados recopilados del EPA en el Método 7470A y en el APHA en la sección 3112B. Los pasos a seguir en los métodos anteriormente mencionados fueron los siguientes (EPA, 1994; APHA, 2005):

### **3.3.2.1 Estandarización a Partir de la Solución Patrón**

Se elaboraron siete muestras estándar preparadas a partir de la solución patrón de mercurio con una concentración de 1000 mg/L, de la cual se tomó 0,5mL de la solución patrón con la ayuda de una pipeta volumétrica y se aforó con agua acidificada ( $\text{HNO}_3$  1.5%) en un balón volumétrico de 50mL, se presentó entonces una concentración de 10mg/L. Para la segunda dilución, se partió de la solución anteriormente preparada (10mg/L) y se tomó 5ml, los cuales son aforados con agua acidificada en un balón de 50mL, obteniéndose una concentración de 1mg/L. Esta última dilución sirvió como base para la preparación de los estándares de calibración, de concentraciones de 0.02mg/L, 0.03mg/L, 0.04mg/L, 0.05mg/L y 0.06mg/L, para lo cual se tomaron 1mL, 1.5mL, 2mL, 2.5mL y 3mL respectivamente, aforándolos a cada uno con agua acidificada en balones volumétricos de 50mL. Lo anteriormente mencionado se resume en la Tabla 1 del Anexo 4, y se representa en el esquema de preparación de estándares de calibración en el Gráfico 1 del Anexo 5.

A su vez, se tomaron 5mL del estándar de 1mg/L preparado anteriormente, y se colocó en un balón volumétrico de 50mL aforándolo con agua acidificada ( $\text{HNO}_3$  1.5%) para obtener una solución estándar de 0.1mg/L, a partir de esta solución se tomó 5mL, 7.5mL, 10mL, 12.5mL y 15mL para preparar soluciones de 0.001mg/L, 0.0015mg/L, 0.002mg/L, 0.0025mg/L y 0.003mg/L respectivamente, cada volumen tomado se colocó en balones volumétricos de 500mL y se aforan con agua acidificada ( $\text{HNO}_3$  1.5%).

### **3.3.2.2 Proceso de concentración al vacío de soluciones a analizar**

La técnica de concentración al vacío por arrastre con vapor fue utilizada como una prueba adicional en el pre-tratamiento de las muestras a ser analizadas, principalmente en los estándares de calibración, para generar una validación que se encuentre dentro de los rangos estipulados por el TULAS, en tal sentido, se generó un factor de concentración de 0,05 para comparar las absorbancias de las soluciones resultantes del proceso de concentración con las soluciones elaboradas.

Para la concentración de los estándares de calibración, se utilizaron las soluciones preparadas anteriormente en concentraciones de 0.001mg/L, 0.0015mg/L, 0.002mg/L, 0.0025mg/L y 0.003mg/L, se agitó vigorosamente cada una de ellas y se trasvasó su contenido (500mL) en un matraz de fondo redondo, que se conectó a un sistema de condensación, a su vez el matraz fue colocado sobre un baño María precalentado a 25°C, se activó el sistema de concentración al abrir el flujo de agua de refrigeración, se reguló la presión de la bomba de vacío a 70 psi, y se ajustó a 45 revoluciones el rotor del equipo, el proceso duró

aproximadamente 45 minutos y se obtuvo 25mL de la solución concentrada que fueron aforados en un balón volumétrico previamente rotulado.

### **3.3.2.3 Proceso de preparación del material de referencia**

Los materiales de referencia empleados presentaron concentraciones determinadas en rangos comprendidos entre 0,0144mg/L y 1mg/L, cada ampolla contenía 20mL de solución y debían ser agitados antes de ser usados. Para la preparación de dichas soluciones se alistaron dos balones aforados de 1000mL limpios y secos cada uno rotulado con la concentración del material de referencia que contendrían, se extrajo con la ayuda de una pipeta volumétrica 10mL de cada uno de las ampollas, se vertió en cada balón marcado con el respectivo material de referencia el contenido de cada pipeta volumétrica, se aforó con agua acidificada ( $\text{HNO}_3$  1.5%) y se agitó fuertemente. Los dos materiales de referencia fueron concentrados a 0,28mg/L y se realizó una dilución de 5 para el material de referencia de 0,014mg/L, y una dilución de 25 para el material de referencia de 1mg/L.

### **3.3.2.4 Proceso de digestión de las soluciones a analizar**

Las muestras de análisis, los estándares de calibración, el material de referencia y el blanco, fueron digeridos del mismo modo para evitar errores de determinación y comprobar el comportamiento real de las soluciones antes mencionadas. En el Anexo 2, se expone la preparación de los reactivos referidos en esta sección.

Para la digestión del blanco, se homogenizó la solución preparada de agua acidificada ( $\text{HNO}_3$  1.5%) agitándola vigorosamente, se tomaron 25mL de la solución con la ayuda de una probeta graduada y se trasvasó a un frasco autoclavable de 100mL, se le rotuló para identificar posteriormente su contenido, ulteriormente se añadió 2.5mL de la solución de  $\text{HNO}_3$  al 30%, 2.5mL de la solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 30% con la ayuda de una micropipeta calibrada de 1 a 5mL, y 2 gotas de  $\text{KMnO}_4$  al 5% con la ayuda de una pipeta Pasteur, se esperó durante 30 segundos para desarrollar la determinación de mercurio.

Para la digestión de los estándares de calibración de 0.02mg/L, 0.03mg/L, 0.04mg/L, 0.05mg/L y 0.06mg/L, se homogenizó la solución agitándola vigorosamente, se tomaron 25mL de la misma con la ayuda de una probeta graduada, y se le trasvasó a un frasco autoclavable de 100mL, se le rotuló para identificar posteriormente su contenido. En el caso de los estándares de 0.001mg/L, 0.0015mg/L, 0.002mg/L, 0.0025mg/L y 0.003mg/L, se agitó vigorosamente cada balón volumétrico (25mL) y se trasvasó su contenido directamente a un frasco autoclavable de 100mL, se le rotuló para identificar posteriormente su contenido. Inmediatamente, se añadió a cada uno de los frascos autoclavables 2.5mL de la solución de  $\text{HNO}_3$  al 30%, 2.5mL de la solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 30% con la ayuda de una micropipeta calibrada de 1 a 5mL, y 2 gotas de

$\text{KMnO}_4$  al 5% con la ayuda de una pipeta Pasteur, se esperó durante 30 segundos para desarrollar la determinación de mercurio.

Para la digestión de los materiales de referencia, se homogenizó la solución agitándola vigorosamente, se tomaron 25mL de la misma con la ayuda de una probeta graduada y se le trasvasó a un frasco autoclavable de 100mL, se le rotuló para identificar posteriormente su contenido, subsiguientemente se añadió 2.5mL de la solución de  $\text{HNO}_3$  al 30%, 2.5mL de la solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 30% con la ayuda de una micropipeta calibrada de 1 a 5mL, y 2 gotas de  $\text{KMnO}_4$  al 5% con la ayuda de una pipeta Pasteur, se esperó durante 30 segundos para desarrollar la determinación de mercurio.

Para la digestión de las muestras de análisis de agua natural, agua residual y agua de consumo, se procedió de la misma manera, homogenizando cada una de las muestras, agitándolas vigorosamente, se tomaron 25mL de cada una de las muestras de análisis con la ayuda de una probeta graduada y se le trasvasó en frascos autoclavables de 100mL, se le rotuló para identificar posteriormente su contenido.

Así mismo, para la adición de estándares en este tipo de matriz, se tomaron tres balones volumétricos de 500mL, se colocó 5mL de la solución estándar de 0,1mg/L (preparada anteriormente para la elaboración de los estándares de calibración), y se aforó con agua acidificada para posteriormente pasar por el proceso de concentración hasta que se obtuvo 25mL de la solución, se homogenizó cada una de las soluciones obtenidas, agitándose vigorosamente y se procedió a verter cada una de ellas en frascos autoclavables de 100mL rotulados para su posterior identificación.

Ulteriormente, se añadió tanto para las muestras de análisis como aquellas con adición de estándar 2.5mL de la solución de  $\text{HNO}_3$  al 30%, 2.5mL de la solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 30% con la ayuda de una micropipeta calibrada de 1 a 5mL y 2 gotas de  $\text{KMnO}_4$  al 5% con la ayuda de una pipeta Pasteur, se esperó durante 30 segundos para desarrollar la determinación de mercurio.

### **3.3.2.5 Análisis de las Soluciones obtenidas**

Las soluciones digeridas fueron sometidas al proceso de lectura, donde se ubicó en primer lugar el blanco, colocándose el tubo de aspiración en el interior del frasco autoclavable para confirmar que la absorbancia fue de cero, al observar en la pantalla del equipo de absorción atómica que no existió la formación de picos de lectura, mostrándose después de 25 segundos de absorbida la muestras por el equipo de generación de vapor frío, se retiró el tubo de aspiración para ser limpiado con papel toalla, evitándose de esta manera que la solución pueda haberse contaminado después de varias lecturas.

Posteriormente, se trató con el mismo procedimiento mecánico a las soluciones estándar de calibración, empezando por la de menor concentración (0.02mg/L) y su equivalente después del proceso de concentración (0.001mg/L), para lo cual se introdujo el tubo de aspiración, se observó la formación de picos de lectura que se estabilizaron a los 25 segundos de ingresada la solución al equipo de generación, lo que originó una altura específica que fue registrada por el equipo para generar un valor determinado de absorbancia. Inmediatamente, se limpió y se volvió a colocar el tubo de aspiración en el blanco, obteniéndose un descenso del pico de lectura que llegó a cero. Se repitió el proceso con cada una de las soluciones estándar, con los materiales de referencia, con las muestras de agua y las muestras con adición de estándar.

### **3.3.3 Validación del Método Analítico**

La validación del método se realizó según establece la Norma Internacional ISO/IEC 17025, basado en el procedimiento interno del laboratorio (ISO/IEC 17025, 2005). A continuación se describe la determinación de cada parámetro de validación:

#### **3.3.3.1 Determinación de la Linealidad**

La detección de la linealidad del método se realizó mediante la curva de calibración de mercurio; elaborándose a partir de un estándar madre (1000mg/L) del cual, se obtuvieron siete estándares por medio de diluciones con concentraciones determinadas de 10mg/L, 1mg/L, 0.02mg/L, 0.03mg/L, 0.04mg/L, 0.05mg/L y 0,06mg/L, para lo cual se utilizó la ecuación 3.1.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (3.1)$$

Se realizó las lecturas del blanco y los estándares de calibración, obteniéndose valores de absorbancia de cada uno de ellos por quintuplicado cada día durante tres días, los resultados de absorbancia se promediaron para poder construir la recta de calibración, la cual se expresó mediante la ecuación 3.2.

$$y = bx + a \quad (3.2)$$

Donde:

y = variable dependiente

x = variable independiente

a = constantes de la ordenada

b = contante de la abscisa

Para obtener la concentración de las soluciones de análisis (mg/L) a partir de las absorbancias conseguidas, se determinó el cálculo con ayuda de la ecuación 3.3:

$$\frac{mg}{L} = \frac{(ABS-a)}{m} * Fc * Fd \quad (3.3)$$

Donde:

mg/L = concentración de la muestra de análisis

ABS = valor de absorbancia

a = constantes

m = pendiente de la recta

Fc = factor de concentración

Fd = factor de dilución

Con las cifras obtenidas se representó la curva de calibración, lográndose reportar y calcular los siguientes datos:

ECUACIÓN DE LA RECTA:

$$y = bx + a \quad (3.2)$$

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN MÍNIMO DE:

$$R^2 = 0,9950$$

LÍMITES DE CONFIANZA DE LA PENDIENTE:

$$LC_b = b \pm tS_b \quad (3.4)$$

LÍMITES DE CONFIANZA DE LA ORDENADA AL ORIGEN:

$$LC_a = a \pm tS_a \quad (3.5)$$

### 3.3.3.1 Determinación de la Sensibilidad

Se determinó la sensibilidad de calibrado y la sensibilidad analítica:

SENSIBILIDAD DE CALIBRADO:

Es la pendiente de la recta; b

#### SENSIBILIDAD ANALÍTICA:

Se determinó mediante la ecuación 3.6:

$$\gamma = \frac{m}{S_s} \quad (3.6)$$

Donde:

$\gamma$  = sensibilidad analítica

m = pendiente de la recta

Ss = desviación estándar de la sensibilidad

#### 3.3.3.2 Determinación del límite de detección y del límite de cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación fueron determinados mediante las ecuaciones 3.7 y 3.8 respectivamente.

LÍMITE DE DETECCIÓN:

$$LOD = \frac{S_{y/x}}{b_1} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{X^2}{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}} \quad (3.7)$$

Donde:

$LOD$  = Límite de Detección

$S_{y/x}$  = es la desviación estándar de la recta de calibrado

$b_1$  = es la pendiente de la recta de calibrado

m = pendiente de la recta

N = es el número de patrones de calibrado

$x_i$  = es cada una de las concentraciones de los patrones de calibrado

$\bar{x}$  = es la media de las concentraciones de los patrones de calibrado

### LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN:

$$LOQ = \frac{Sy/x}{k} * m * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{X^2}{\sum_{i=1}^N (Xi - \bar{X})^2}} \quad (3.8)$$

Donde:

LOQ = Límite de Cuantificación

Sy/x = Desviación estándar de los residuales de la recta de calibrado

k = Constante 10

m = pendiente de la recta

N = Número de patrones de calibrado

xi = Concentraciones de los patrones de calibrado

x = Media de las concentraciones de los patrones de calibrado

### 3.3.3.3 Precisión

Se determinó mediante la repetibilidad y reproducibilidad.

#### REPETIBILIDAD:

Se calculó utilizando las siguientes ecuaciones:

$$Sr = \sqrt{DCM_w} \quad (3.9)$$

$$V_2 = k - 1 \quad (3.10)$$

$$SDC_w = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^p p (\bar{X}_{ij} - \bar{x}_i)^2 \quad (3.11)$$

$$DCM_w = \frac{SDC_w}{n-k} \quad (3.12)$$

$$V_1 = k - 1 \quad (3.13)$$

$$SDC_B = \sum_{i=1}^k p (\bar{X}_i - \bar{X})^2 \quad (3.14)$$

$$DCM_B = \frac{SDC_B}{k-1} \quad (3.15)$$

Donde:

$V_1$  y  $V_2$  = grados de libertad

$k$  = grupos muestrales

$n$  = número total de elementos

$p$  = tamaños de muestra

$SDC_w$  = desviación estándar de diferencias cuadráticas

$DCM_w$  = diferencias cuadráticas medias

$SDC_B$  = desviación estándar de diferencias cuadráticas

$DCM_B$  = diferencias cuadráticas medias

#### REPRODUCIBILIDAD:

Se calculó utilizando los datos de las ecuaciones 3.16 y 3.17:

$$SRD = \sqrt{\frac{SDCT}{N-1}} \quad (3.16)$$

$$SDCT = SDC_B + SDC_w \quad (3.17)$$

Donde:

$SRD$  = desviación estándar de la reproducibilidad de diferencias cuadráticas

$N$  = número total de elementos

$SDC_w$  = desviación estándar de diferencias cuadráticas

$SDC_B$  = desviación estándar de diferencias cuadráticas

$SDCT$  = desviación estándar de diferencias cuadráticas totales

#### 3.3.3.4 Cálculo de ANOVA

Para el tratamiento estadístico se realizó un análisis de varianzas, mediante la prueba de  $F$  o del valor estimado de  $F$ , para lo cual se utilizó la ecuación 3.18:

$$F = \frac{DCM_B}{DCM_w} \quad (3.18)$$

Donde:

F = análisis de varianzas

DCM<sub>B</sub> = diferencias cuadráticas medias

DCM<sub>w</sub> = diferencias cuadráticas medias

Los valores obtenidos se compararon con el valor de F tabulado que es igual a 3.89, en un nivel de confianza del 95%.

### 3.3.3.5 Determinación de la Exactitud

Se fijó al utilizar material de referencia certificado, mediante la ecuación 3.19:

$$\%Recuperación = \frac{\times Obtenido}{\times Teórico} * 100\% \quad (3.19)$$

A su vez, se realizó la prueba *t student*, utilizándose las siguientes fórmulas:

$$t_{exp} = \frac{|r\%R|\sqrt{n}}{Cv} \quad (3.20)$$

$$Cv = \frac{s}{X} \quad (3.21)$$

Donde:

t<sub>exp</sub> = valores de t experimentales

n = número total de elementos

Cv = coeficiente de variación

s = desviación estándar

X = promedio del porcentaje de recuperación

Los valores obtenidos se comparan con el valor de "t" tabulado que es igual a 2.78, en un nivel de confianza del 95%.

### 3.3.3.6 Determinación de la Incertidumbre

Corresponde a la incertidumbre de calibración del equipo y la incertidumbre del método.

## INCERTIDUMBRE DE CALIBRACIÓN DEL EQUIPO

$$\mu C_{ST} = C_{STi} \sqrt{\left(\frac{\mu_{STMadre}}{C_{STMadre}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Vpipeta}}{V_{pipeta}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Vbalon}}{V_{balon}}\right)^2} \quad (3.22)$$

$$\mu C_{ST} = C_{STi} \sqrt{\left(\frac{\mu_{Peso}}{P}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Vbalon}}{V_{balon}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Pureza}}{V_{Pureza}}\right)^2} \quad (3.23)$$

$$\mu C = k \sqrt{\mu_{estandar}^2 + \mu_{resoluci\ on\ del\ equipo}^2} \quad (3.24)$$

En donde:

$\mu_{ST\ MADRE}$  = incertidumbre de la solución *stock*

$C_{SY\ MADRE}$  = concentración de la solución *stock*

$\mu_{V_{PIPETA}}$  = incertidumbre de la pipeta

$V_{PIPETA}$  = volumen de la pipeta

$\mu_{V_{BALON}}$  = incertidumbre del balón

$C_{ST}$  = concentración del estándar

$\mu_{PESO}$  = incertidumbre de la balanza

$P$  = peso del estándar en mg

$\mu_{PUREZA}$  = incertidumbre de la pureza del estándar

$\mu_{C_{ST}}$  = incertidumbre del estándar

$\mu^2_{ESTANDAR}$  = incertidumbre del estándar

$\mu^2_{RESOLUCION\ DEL\ EQUIPO}$  = incertidumbre de la resolución del equipo

$K$  = nivel de confianza

$\mu C$  = incertidumbre combinada

## INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

$$\mu_{METODO} = k \sqrt{\mu_{estandar}^2 + \mu_{resoluci\ on\ del\ equipo}^2 + \mu_{precisi\ on}^2} \quad (3.25)$$

En donde:

$\mu^2_{\text{CALIBRACIÓN DEL EQUIPO}}$  = incertidumbre de la calibración del equipo

$\mu^2_{\text{PRECISIÓN}}$  = incertidumbre de la precisión

$\mu^2_{\text{RESOLUCION DEL EQUIPO}}$  = incertidumbre de la resolución del equipo

K = nivel de confianza

$\mu_{\text{METODO}}$  = incertidumbre del método

### 3.4 Población y Muestra

#### 3.4.1 Diseño Experimental

##### 3.4.1.1 Condiciones de Operación del equipo de Generación de Vapor Frío

Tabla N° 3.1 Factores y niveles de estudio para las mejores condiciones de operación del equipo de generación de vapor frío para la determinación de concentraciones de mercurio.

Factores	Niveles
a. Agente Reductor ( $\text{NaBH}_4$ )	a1: 0,2%
	a2: 0,3%
	a3: 0,4%
	a4: 0,5%
b. Nivel de Presión de Argón	b1: 32.7 psi
	b2: 46.4 psi
	b3: 57.6 psi

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N° 3.2 Obtención de los tratamientos resultantes de la correlación de los factores de estudio para las mejores condiciones de operación del equipo de generación de vapor frío para la determinación de concentraciones de mercurio.

Tratamientos		Factores de Estudio	
N°	Codificación	Agente Reductor (NaBH <sub>4</sub> )	Nivel de Presión de Argón
1	a1b1	0,2%	32,7 psi
2	a1b2	0,2%	46,4 psi
3	a1b3	0,2%	57,6 psi
4	a2b1	0,3%	32,7 psi
5	a2b2	0,3%	46,4 psi
6	a2b3	0,3%	57,6 psi
7	a3b1	0,4%	32,7 psi
8	a3b2	0,4%	46,4 psi
9	a3b3	0,4%	57,6 psi
10	a4b1	0,5%	32,7 psi
11	a4b2	0,5%	46,4 psi
12	a4b3	0,5%	57,6 psi

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Una vez conocidos el diseño experimental empleado se procedió a la operacionalización de variables, en aras de comprender mejor los resultados finales de la investigación, de las cuales se desprenden indicadores de medición.

### 3.5 Operacionalización de Variables

#### 3.5.1 Variable Dependiente:

Tabla N°3.3 Variable Dependiente

LO ABSTRACTO		LO OPERATIVO		
Conceptualización	Categorías	Indicadores	Ítem Básico	Técnicas – Instrumentos
Determinación de mercurio (Hg) en muestras de agua natural, residual y de consumo.	Cuantificación de Mercurio.	Pruebas, análisis y comparaciones a realizarse sobre la valoración de Hg en matrices de agua natural, residual y de consumo.	¿Será apropiado realizar una comparación de la concentración de Hg en muestras de agua residual, natural y de consumo?	Diseño Experimental

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

#### 3.5.2 Variable Independiente:

Tabla N°3.4 Variable Independiente

LO ABSTRACTO		LO OPERATIVO		
Conceptualización	Dimensiones	Indicadores	Ítem Básico	Técnicas - Instrumentos
Validación de métodos analíticos.	Utilización de espectrofotometría de absorción atómica por generación de vapor frío.	Obtención de resultados seguros y confiables de cada parámetro de validación establecido para mercurio, según las exigencias de la normativa.	¿Se justificará la inversión realizada para lograr el objetivo planteado? ¿Se logrará obtener un método analítico adecuado para la validación de Hg?	Diseño Experimental

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

### **3.6 Recolección de Información**

El diseño experimental se basó en conseguir datos reales de la función de respuesta instrumental y del método analítico empleado en las condiciones que indica cada uno de los tratamientos propuestos, por lo cual, se estableció un diseño experimental AxB. Para el estudio de las condiciones de operación del equipo de generación de vapor frío, se expusieron 12 tratamientos de estudio con 1 respuesta experimental, obteniéndose como resultado 13 pruebas de investigación. El análisis experimental se realizó mediante el programa estadístico STATGRAPHICS. Además, se comprobó la exactitud, repetibilidad y reproducibilidad del proceso de validación mediante el uso de soluciones estándar, material de referencia certificado y muestras de agua natural, residual y de consumo, en las mismas condiciones de análisis. Todo el proceso experimental fue realizado por un solo analista para la determinación de mercurio por la técnica de generación de vapor frío.

### **3.7 Procesamiento y Análisis**

El procesamiento de la información se logró en la fase experimental de la investigación, corroborándose los resultados a través de un estudio estadístico mediante el empleo de hojas de cálculo, diseñadas con ecuaciones matemáticas establecidas para cada uno de los parámetros de validación, así como para la transformación de las lecturas de concentración generadas en absorbancias por el equipo.

El análisis de la información se basaron en la interpretación de los resultados obtenidos del estudio estadístico para la validación del método, sustentado mediante las exigencias de la normativa y los requerimientos que establece el laboratorio, comprobándose de esta manera la hipótesis para establecer conclusiones y recomendaciones sobre la investigación desarrollada.

## **CAPÍTULO IV**

### **4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

#### **4.1 Análisis de los Resultados**

Una vez concluido el desarrollo técnico se pudo obtener los siguientes resultados experimentales:

##### **4.1.1 Condiciones de Operación del Generador de Vapor Frío**

La Tabla N°2 del Anexo 4, reportó valores de absorbancia obtenidos al someter una solución estándar de mercurio de 0.02mg/L en condiciones específicas según cada tratamiento propuesto, en donde, al combinar los niveles de concentración del agente reductor ( $\text{NaBH}_4$ ) con los distintos niveles de flujo de presión del gas de arrastre (Ar), se obtuvieron cinco repeticiones de los doce tratamiento.

En aras de evaluar los tratamientos del uno al siete, se expone que las lecturas de absorbancia no son los valores más altos establecidos a simple vista. Sin embargo, se pudo apreciar que cada uno de ellos presentó repetibilidad, lo cual permitió comprobar que a bajas concentraciones del agente reductor la presión no influye para optimizar la recuperación de mercurio. Por otro lado, a partir de los tratamientos del diez al doce, se demostró que las lecturas de absorbancia obtenidas presentaron un descenso pese a que la concentración del agente reductor fue mayor, pues los niveles del flujo de presión del gas no influyeron para que exista manifestación del analito.

Posteriormente, se notó una particularidad entre los tratamientos ocho y nueve. El tratamiento ocho presentó un valor alto de absorbancia con presencia de repetibilidad, mientras que el tratamiento nueve presentó valores altos y bajos de absorbancia notándose que no existe repetibilidad.

En la Tabla N°3 del Anexo 4, se reportó el cálculo promedio de los resultados obtenidos con los cuales se esquematizó el rendimiento de cada uno de los tratamientos de estudio presentados en el Gráfico 2 del Anexo 5. Y en la Tabla N°4 del Anexo 4 se reportó los porcentajes de recuperación presentados de la experimentación en el equipo de generación de vapor frío.

Por otro lado, se realizó el análisis estadístico utilizando el programa STATGRAPHICS del cual se obtuvieron resultados del análisis de ANOVA reportado en la Tabla N°5 del Anexo 4 donde se establecieron las fuentes de varianza con cada uno de los factores de estudio, el análisis de las réplicas de estudio, y de sus interacciones, ulterior a este análisis se realizó el contraste de los

rangos de absorbancia tanto para el Factor A como para el Factor B, los cuales se reportaron en las Tabla N° 6 y 7 respectivamente del Anexo 4, además en los Gráficos 3 y 4 del Anexo 5 se mostró el comportamiento tanto del Factor A como del Factor B respectivamente. Además se reportó en la Tabla N° 8 del Anexo 4 los resultados de la prueba de Tukey que se realizó a la interacción AB estableciendo la media de los resultados iniciales de las absorbancias obtenidas.

Los Gráficos 5 y 6 del Anexo 5 expusieron las medias de cada uno de los factores junto con los resultados de la prueba de porcentajes de intervalo de Tukey realizados a un nivel del 95%. Finalmente, el Gráfico 7 del Anexo 5 exhibió los comportamientos de las interacciones de los factores de estudio.

## **4.1.2 Validación del Método Analítico**

### **4.1.2.1 Determinación de la linealidad**

En el Anexo 4, la Tabla N° 9, presentó los valores de absorbancia producto de las lecturas realizadas durante sus réplicas. La Tabla N° 10 detalló el estudio realizado con las soluciones estándar de calibración, se reportó los valores de las lecturas de absorbancia (ABS) y se identificó que tanto las soluciones elaboradas directamente como aquellas que pasaron por el proceso de concentración no difiere con la concentración final del analito de estudio, lo cual fue corroborado matemáticamente con el uso de la ecuación 4.1 al calcular la concentración expresadas en mg/L.

$$\frac{mg}{L} = \frac{(ABS - a)}{m} * Fd \quad (4.1)$$

El Gráfico 8 del Anexo 5 representó la curva de calibración obtenida de los valores promedios reportados en el Anexo 4, el gráfico consta de los puntos de determinación de la recta: la representación gráfica de la recta de regresión lineal, la ecuación de la regresión, y el coeficiente de correlación, para lo que se efectuó un análisis estadístico mediante la detección de la linealidad que estableció una curva de calibración con una ecuación de recta de regresión de:

$$y = 7,6337x + 0,0058$$

En el Anexo 4, la Tabla N°11 expuso el promedio de las concentraciones y las absorbancias y en la Tabla N°12 se presentó los porcentajes de recuperación de cada uno de los estándares de calibración junto con sus promedios, lo cual establece que el estándar de 0.02mg/L o su equivalente de 0.001mg/L presenta un porcentaje de recuperación del 102.7%, el estándar de 0.03mg/L o su equivalente de 0.0015mg/L, demuestra un porcentaje de recuperación del 102.9%, el de 0.04mg/L o su equivalente de 0.002mg/L, indica un porcentaje

de recuperación del 99.6%, el de 0.05mg/L o su equivalente de 0.0025mg/L, muestra un porcentaje de recuperación del 102.6%, y el estándar de 0.06mg/L o su equivalente de 0.003mg/L, señala un porcentaje de recuperación del 97.3%.

Finalmente, se empleó materia de referencia en rangos comprendidos entre 0,0144mg/L y 1mg/L, los dos materiales de referencia fueron concentrados a 0,28mg/L y se realizaron diluciones de 5 para el material de referencia de 0,014mg/L, y de 500 en el caso del material de referencia de 1mg/L.

#### **4.1.2.2 Determinación del Límite de Confianza**

A partir del análisis de linealidad, se calcularon los límites de confianza del método analítico y se fijaron los valores máximos y mínimos del mismo, los cuales se encuentran registrados en la Sección 1 del Anexo 4, donde, el límite de confianza para la pendiente fue de  $LCb=7.6337 \pm 0.4224$ , y para la ordenada fue de  $LCa=0.0058 \pm 0.0164$ ; los cálculos realizados fueron representados en el Gráfico 9 del Anexo 5.

#### **4.1.2.3 Determinación de la sensibilidad**

En la Sección 2 del Anexo 4, se describen los resultados obtenidos tras el cálculo de la sensibilidad de los materiales de calibración dada por el valor de la pendiente, que corresponde a 7.63 y el cálculo de la sensibilidad analítica que se determinan a partir del empleo de la ecuación determinada en la metodología lo que proporciona un valor de 0,001 mg/L

#### **4.1.2.4 Determinación del límite de detección y del límite de cuantificación**

En base a las ecuaciones registradas en el capítulo tres (límite de detección, ecuación 8 y límite de cuantificación, ecuación 9) se calculó en la Sección 3 del Anexo 4, el valor del límite de detección que fue de 0,0025 mg/L, el cual se consideró como la mínima cantidad de analito detectada en la muestra. De la misma manera, se pudo especificar que el valor del límite de cuantificación teórico fue de 0,01404 mg/L.

#### **4.1.2.5 Precisión**

En la Tabla N° 15 del Anexo 4, se describieron los resultados obtenidos de precisión en base al cálculo de ANOVA, donde, se obtuvo el valor de F de cada concentración utilizada, tanto de los estándares de calibración como de los materiales de referencia empleados. Los valores obtenidos se compararon con el valor de F tabulado correspondiente a 3.89, en un nivel de confianza del 95%.

Se realizaron los cálculos estadísticos para la determinación de la reproducibilidad y la repetibilidad, los cuales se muestran en las Tablas N° 16, 17,18 y 19 del Anexo 4; útiles para interpretar adecuadamente el valor de F calculado.

La Tabla N° 16, representa la reproducibilidad experimentada en los estándares de calibración y en los materiales de referencia utilizados, para obtener porcentajes de reproducibilidad comprendidos entre 1.0 y 3.7%. La Tabla N° 17, comprueba el cálculo del valor promedio de los diferentes niveles de concentración experimentales del analito de estudio tanto en los estándares de calibración como en los materiales de referencia. Finalmente, en las Tablas N° 18 y 19, se representan los valores de repetibilidad obtenidos en los tres días de estudio y en relación con estos días, basándose de igual forma en los estándares de calibración y en los materiales de referencia, lo que permitió evidenciar porcentajes de repetibilidad similares a los obtenidos en la Tabla N° 16.

#### **4.1.2.6 Exactitud**

Las Tablas N° 20 y N° 21 del Anexo 4, se reportaron los resultados obtenidos de exactitud del método validado. Los valores obtenidos se compararon con el valor de "t" tabulado correspondiente a 2.78, en un nivel de confianza del 95%, los valores calculados de "t" experimental se encontraron entre 0.0 y 1.02, con porcentajes de recuperación entre 98.15 y 102.65%.

#### **4.1.2.7 Incertidumbre**

En la Tabla N° 22 del Anexo 4, se describen los resultados que se obtuvieron del porcentaje de incertidumbre del método analítico validado. Además, en los Gráficos 10 y 11 del Anexo 5 se exponen las fuentes de mayor incertidumbre que pudieron ser estudiadas de las concentraciones de los estándares de calibración, tanto de los elaborados directamente entre 0.02mg/L y 0.06mg/L, como en los elaborados mediante técnica de concentración entre 0.001mg/L y 0.003mg/L y de los materiales de referencia.

#### **4.1.3 Determinación de los Rangos de trabajo**

Mediante los porcentajes de incertidumbre, se determinó el rango de trabajo de mercurio para el cálculo en mg/L obtenidos a través de la ecuación 3. En la Tabla N° 23 del Anexo 4, se describen los resultados obtenidos.

#### **4.1.4 Estudio de las Matrices de Análisis con Adición de Estándar**

Los datos resultantes del estudio de los tratamientos propuestos para determinar la precisión del método analítico empleado en muestras de agua de consumo, agua natural y agua

residual se reportaron en la Tabla N° 24 del Anexo 4. Específicamente el estudio obtenido de la matriz de agua residual se presenta en la Tabla N° 25, del agua natural se demuestra en la Tabla N° 26, y del agua de consumo se reporta en la Tabla N° 27.

## **4.2 Interpretación de Datos**

### **4.2.1 Condiciones de Operación del Generador de Vapor Frío**

Tras el análisis de los datos experimentales obtenidos se pudo evidenciar que las mejores condiciones en las que se operó el equipo de generación de vapor frío fue con en el tratamiento propuesto a3b2, el cual corresponde a la combinación de una solución de  $\text{NaBH}_4$  con una concentración del 0.40% como agente reductor, y un nivel de flujo de presión del gas de arrastre (Ar) de 46.4psi, lo cual registró el mayor valor de absorbancias reportadas con un promedio de 0.162ABS, que expresado en ppm corresponde a una concentración de 0.018mg/L, y un porcentaje de recuperación promedio del 105.0% (Anexo 4), se realizó un análisis estadístico con lo cual se corroboró que estas variables al momento de combinarlas de manera adecuada permiten optimizar las condiciones de operación del equipo de generación de hidruros para la obtención de lecturas con concentraciones reales conforme los estudios realizados por SHIMADZU CORPORATION.

El estudio con el programa estadístico STATGRAPHICS, permitió reconocer que los valores obtenidos en el desarrollo del análisis de ANOVA presentaron gran diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%., para lo cual se realizó el estudio de la prueba de Tukey, lo que confirma que el mejor tratamiento en el Factor A es de 0.40% del agente reductor mientras que el Factor B presentó dos tratamientos con mayores posibilidades de ser las mejores respuestas obtenidas. Sin embargo, ha sido necesario analizar el comportamiento de cada uno de los factores debido a que cada uno presenta valores elevados pero uno solo permite la mayor recuperación del analito de estudio, lo cual tiene buen comportamiento al momento de evaluar recuperación y repetibilidad confirmando que en el Factor B es de 46.4 psi.

### **4.2.2 Validación del Método Analítico**

#### **4.2.2.1 Procesos de Elaboración de Soluciones Estándar**

Según la norma técnica ambiental que se encuentra bajo el amparo de la Ley y el Reglamento de Gestión Ambiental, se han dispuesto los límites permisibles de mercurio, métodos para determinar la presencia de contaminantes en el agua y los criterios de calidad de las aguas para sus distintos usos, con los cuales se ha trabajado en el transcurso de esta investigación, lo que permitió proponer procesos analíticos directos y simulados para elaborar estándares de calibración con concentraciones de mercurio que relacionados entre sí nos permita obtener lecturas de absorbancia similares, tal es el caso de los procesos de la elaboración de

soluciones estándar que fueron preparadas directamente en concentraciones de 0.02mg/L, 0.03 mg/L, 0.04 mg/L, 0.05 mg/L y 0.06 mg/L y que poseen una relación directa con los estándares elaborados en concentraciones de 0.001mg/L, 0.0015mg/L, 0.0020mg/L, 0.025mg/L, 0.030mg/L luego de realizar el proceso de concentración en los que bajo su experimentación y los niveles de lecturas de absorbancia se comprobó que son las adecuadas para bajar la concentración del analito de estudio y así obtener un rango de trabajo aceptable en el laboratorio conforme las especificaciones establecidas por el TULAS.

#### **4.2.2.2 Determinación de la linealidad**

La obtención de la curva de calibración y el análisis de la ecuación de la recta de regresión (Anexo 5) facultó la descripción del ajuste del modelo lineal y la relación estadísticamente significativa dada entre la absorbancia y la concentración de las soluciones del analito de estudio que pudo ser confirmado con el coeficiente de correlación de 0.9984, lo que significa una garantía de calidad para los resultados emitidos por el laboratorio de ensayos. Este criterio está sustentado en el coeficiente de correlación en laboratorios de análisis, al establecer que no debe ser menor que 0.995 (Norma INEN ISO/IEC 17025. 2005).

Finalmente, se empleó materia de referencia en rangos comprendidos entre 0,0144mg/L y 1mg/L, con el fin de comprobar que los valores obtenidos están dentro de los límites aceptables certificados. Esto demostró, que el método analítico seleccionado y utilizado fue útil en el desarrollo de la validación. Los materiales de referencia se concentraron a 0,28mg/L y se realizó una dilución de 5 para el material de referencia de 0,014mg/L, y en el del material de referencia de 1mg/L se realizó una dilución de 500, con lo cual se determina que los procedimientos establecidos permiten una recuperación de la concentración del analito de estudio en cada uno de los materiales de referencia confirmándose la exactitud de la técnica empleada.

#### **4.2.2.3 Determinación del Límite de Confianza**

El término “confianza” implica que es posible afirmar con un cierto grado de probabilidad (por lo general del 95%), que el intervalo de confianza si incluye al valor verdadero, por ello ha sido importante estudiar los límites que presentó tanto la ordenada como la pendiente en el análisis de linealidad, para confirmar así la aceptación de los valores obtenidos de la experimentación, de este modo se corroboró que los valores extremos con los que trabaja la investigación se encuentran entre  $7.6337 \pm 0.4224 < \mu < 0.0058 \pm 0.0164$ , lo cual contempla la inexistencia de errores sistemáticos (Miller & Miller, 2002).

#### **4.2.2.4 Determinación de la sensibilidad**

La sensibilidad de un método analítico es capaz de discernir pequeñas variaciones en la concentración del analito. Por lo tanto, tras el procedimiento utilizado se estipuló que la pendiente de la recta de calibración corresponde a 7.63 lo que representa la medida de la sensibilidad denominada sensibilidad de calibrado y considerada constante en todo el intervalo de linealidad. Por otro lado, la sensibilidad analítica o capacidad discriminante que presentó la investigación fue de 0.001 mg/L, y es calificada como la menor diferencia de concentraciones que puede ponerse de manifiesto correspondiente a un umbral de probabilidad de 0.05.

#### **4.2.2.5 Determinación del límite de detección y del límite de cuantificación**

Se puede especificar el límite de detección de un analito, como aquella concentración que proporciona una señal instrumental significativamente diferente de la señal de una muestra en blanco, o señal de fondo. Por otro lado, el límite de cuantificación o determinación, es considerada como la concentración más baja para mediciones cuantitativamente precisas (Skoog *et al*, 2005).

En la práctica, se ha utilizado los valores de la recta de calibrado para el cálculo de estos límites, en donde 0,0025 mg/L se considera como la cantidad mínima de analito que ha sido detectado en las muestras de análisis, del mismo modo, se puede especificar que el valor del límite de cuantificación teórico fue de 0,01404 mg/L en relación al límite de cuantificación experimental correspondiente a 0,02 mg/L o su equivalente luego del proceso de concentración de 0.001mg/L, que fue corroborado posteriormente con el cálculo de la incertidumbre. Estos valores, son considerados como la mínima cantidad de analito presente en la muestra que ha podido ser cuantificada, bajos las condiciones experimentales descritas, con una adecuada predicción y exactitud.

#### **4.2.2.6 Precisión**

La precisión se refiere a la dispersión del conjunto de valores obtenidos de mediciones repetidas de una magnitud, es decir, es lo cerca que los valores medidos están unos de otros. Junto con la medición de varianza es posible determinar el grado de variabilidad que sintetiza una muestra de análisis. En teoría de probabilidad y estadística, la varianza es un estimador de la divergencia de una variable en este caso la concentración del analito de su valor esperado (Miller & Miller, 2002).

En el tratamiento estadístico se realizó un análisis de varianzas, mediante la prueba de F o del valor estimado de F; los valores obtenidos fueron comparados con el valor de F tabulado perteneciente a 3.89, en un nivel de confianza del 95%; dando como resultado que los valores de

F calculados de los estándares y del material de referencia son menores al valor de F tabulado, lo que representa que existe un estimado de precisión admisible. Este resultado indica, que las varianzas no presentan diferencias significativas, y que los resultados de repetibilidad y reproducibilidad se encuentran dentro de los valores aceptados del valor estimado de F Tabulado.

#### **4.2.2.7 Exactitud**

La exactitud, se refiere a cuán cerca del valor real se encuentra el valor medido. En términos estadísticos, la exactitud está relacionada con el sesgo de una estimación. Cuanto menor es el sesgo más exacta es una estimación. Cuando expresamos la exactitud de un resultado se expresa mediante el error absoluto que es la diferencia entre el valor experimental y el valor verdadero (Miller & Miller, 2002).

La exactitud experimental también es la considerada la mínima variación de magnitud que puede apreciar un instrumento. Por lo tanto, se determinó la misma, mediante el porcentaje de recuperación de cada estándar de calibración y de los materiales de referencia empleados, que debe estar en un rango entre el 85 – 115%. Los valores obtenidos fueron comparados con el valor de “t” tabulado correspondiente a 2.78, en un nivel de confianza del 95%; lo cual trajo como resultado que los valores de “t” calculados de los estándares y del material de referencia sean menores al valor de t tabulado. Este análisis indica que no se presentan diferencias significativa entre la recuperación media y 100%, por lo que los valores de exactitud son aceptados (Skoog *et al*, 2005).

#### **4.2.2.8 Incertidumbre**

La Norma INEN ISO/IEC 17025 (2005), en la división de “Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”, pone especial énfasis en la necesidad de estimar la incertidumbre del ensayo, así como en el cálculo de las incertidumbres asociadas con calibraciones internas. La incertidumbre de una medición es una estimación de la parte del resultado completo que caracteriza el intervalo de valores dentro del cual se encuentra el valor verdadero de las cantidades medida.

Los valores de porcentaje de incertidumbre obtenidos para cada concentración analizada se encontraron dentro del alcance establecido por el laboratorio que es del 15% de incertidumbre. Los datos experimentales de incertidumbre obtenidos se hallaron entre el 4.06% y el 14.54%, por lo tanto, los porcentajes de incertidumbre alcanzados son aceptados. Además fue posible verificar que las fuentes de incertidumbre son directamente proporcionales; al estar relacionadas entre el porcentaje de incertidumbre y la concentración del analito de estudio.

#### **4.2.3 Determinación de los Rangos de trabajo**

Debido a que el porcentaje de incertidumbre tanto en la concentración de 0.02mg/L como en su equivalente de 0.001mg/L, es del 10.5% se estimó que el rango de trabajo abarca todas las concentraciones de mercurio, que están entre 0.001mg/L a 1mg/L que son los límites requeridos en el laboratorio y establecidos por las leyes ecuatorianas.

#### **4.2.4 Estudio de las Matrices de Análisis con Adición de Estándar**

Se realizó el análisis de las matrices de estudio con diferentes tipos de agua: agua residual, natural y de consumo; las muestras fueron proporcionadas por el laboratorio con la codificación respectiva de las mismas. En la matriz se determinó que tanto el agua natural como el agua de consumo no presentaron cambios de absorbancia al ser comparados con el blanco en la lectura inicial, al momento de realizar las lecturas de absorbancia se pudo corroborar que la concentración del analito obtenido fue de 0,001mg/L, que corresponde al valor de la adición de estándar.

Por otro lado, el análisis de matriz de agua residual demostró que la lectura inicial de la muestra únicamente presentó valores de absorbancia en un promedio de 0.112ABS, lo que representó una concentración de 0,001mg/L. Después de adicionar el estándar a la muestra de agua residual se reportó valores promedio de absorbancia de 0.239ABS; equivalente a una concentración de 0,002mg/L; lo que permitió comprobar que el agua residual sometida al análisis presentó una concentración de 0,001mg/L de mercurio total, en tal sentido, se pudo concluir que existió una recuperación aproximada del 100% de la concentración adicionada, además que la muestra de agua residual no presentó interferencias al momento de ser analizada, por consiguiente, se consiguió que el tratamiento de digestión cumpliera con los requisitos para lo cual fue diseñado, además se verificó que el efecto matriz no ocasionara interferencias en el método.

Finalmente, al validar este método analítico se logró un procedimiento específico para el análisis de aguas naturales, residuales y de consumo con el fin de proporcionar reportes confiables de los niveles de mercurio que se pueden presentar en este tipo de matriz instituyéndose de este modo, evidencia documentada de un alto grado de confianza, que permita mitigar el uso excesivo de mercurio en determinadas zonas del país.

#### **4.3 Verificación de Hipótesis**

Tras el análisis estadístico es posible aceptar la **hipótesis alternativa**, lo cual establece que los tratamientos resultantes producto de la correlación de los factores de estudio presentan las mejores condiciones para el uso del equipo, además de poseer características lineales

aceptables obtenidas de las respuestas experimentales al momento de ser relacionadas con los valores tabulados a un nivel de confianza del 95%.

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

En la investigación se corrobora que el equipo de generación de vapor frío obtuvo las mejores condiciones de funcionamiento a 46.4psi de flujo de presión de Argón y una concentración del 0.04% de borohidruro de sodio, lográndose un porcentaje de recuperación del 105.0%, valor que está dentro de los rangos establecidos por la norma INEN ISO/IEC 17025 que es de entre el 85% al 115%.

La utilización de un procedimiento de concentración de muestras analizada dentro del método, corroboró tanto la precisión como la exactitud del mismo, así como el cumplimiento de la linealidad en el método analítico empleado en el intervalo de concentraciones utilizadas para su determinación por su elevado valor de coeficiente de correlación que fue de 0.9984, cumpliendo con los fines de validación que debe ser de  $\geq 0.95$ , con lo cual se asegura que el uso del proceso de concentración no afecta la calidad de los resultados.

El proceso de concentración empleado comprobó que a mayor presión que se somete la solución, se necesita menor temperatura, demostrándose una relación inversamente proporcional, lo cual preserva la concentración de la muestra en estas condiciones con el fin de no generar vapores de mercurio que puedan salir del sistema de concentración, y se pierdan en la atmosfera.

La investigación muestra resultados obtenidos del límite de detección que corresponde a 0,0025 mg/L y un límite de cuantificación de 0,01404 mg/L. El valor real de cuantificación que dio el equipo que fue de 0,001mg/L, con un porcentaje de incertidumbre que se encuentra dentro del rango establecido en el laboratorio que es el 15%.

El desarrollo del método analítico empleado es considerado útil para la determinación de mercurio en muestras de agua natural, residual y de consumo, ya que mediante tratamientos estadísticos se pudo comprobar que es reproducible en el cálculo la repetibilidad por varios días, se obtuvieron resultados que al ser evaluados por la prueba de F (comparación de varianzas), no presentan diferencias significativas.

El análisis de la incertidumbre es un indicador importante en la calidad de la medición, pues permitió evaluar las incertidumbres de todos los procesos realizados durante la validación como: repetibilidad, reproducibilidad, preparación de estándares, material de referencia y el material volumétrico utilizado proporcionando resultados confiables.

Los resultados corroboraron que tanto en las muestras de análisis como en el material de referencia los valores reportados presentaron un nivel de incertidumbre no mayor al 15%, en un nivel de confianza del 95%, lo que determinó el rango de trabajo para Mercurio que van de 0,001mg/L a 1mg/L, proporcionándose un servicio a la comunidad a partir del cumplimiento de los límites máximos permisibles estipulados por el TULAS, y confirmándose la validez del método empleado al haber obtenido valores certificados por el material de referencia.

El porcentaje de recuperación esperado de acuerdo con la experimentación realizada se encontró entre 85 y el 115%, con un error relativo de  $\pm 15\%$  en cada uno de los tratamientos realizados dentro del rango establecido, ninguno es mayor a 110% o menor de 90% en cada una de las concentraciones, por lo tanto se establece que el método empleado es exacto.

La preparación diaria experimental de las soluciones estándar de calibración determinó la repetibilidad y reproducibilidad del método analítico de estudio relacionándose el tiempo con la concentración del mercurio, lo que corrobora que los estándares de calibración se degradan con facilidad confirmando que éste es volátil a temperatura variable desde el punto de vista ambiental.

## **5.2 Recomendaciones**

Es preciso controlar que el equipo de generación de vapor frío se encuentre correctamente instalado en aras de verificar el flujo del gas de arrastre a través de la manguera que conecta a la celda de cuarzo antes de iniciar las lecturas. De esta manera, se logra examinar los tubos de succión de las botellas de reactivos, debido a que si se producen burbujas en los mismos, la lectura de la absorbancia disminuye; por ello, conviene ultrasonar los reactivos (HCl y NaBH<sub>4</sub>) durante 20 minutos antes de ser utilizados en el equipo.

Es necesario lograr una correcta cuantificación del analito evitando la presencia de interferencias o compuestos que degraden las muestras de análisis, empleándose condiciones instrumentales y material volumétrico adecuados y limpios.

Se debe utilizar un método de análisis en el laboratorio cuyas características de rendimiento hayan sido evaluadas mediante un ensayo colectivo, de conformidad con un protocolo internacional para generar datos analíticos. En este sentido, la validación precisa que el laboratorio seleccione las características adecuadas a evaluar, como por ejemplo: aplicabilidad, selectividad, calibrado, exactitud, fidelidad, rango, límite de cuantificación, límite de detección, sensibilidad y robustez teniendo en cuenta previamente los requisitos del cliente al elegir dichas características a determinar.

Es necesario realizar un control de la eficiencia tanto del mantenimiento de calibración de equipo, como del desarrollo del método analítico para evitar errores sistemáticos. La verificación debe realizarse con un estándar de cualquier concentración de preferencia con el nivel bajo de la curva de calibración, comprobándose tras su lectura que la absorbancia y concentración corresponden a la del estándar de calibración utilizado.

## **CAPÍTULO VI**

### **6. PROPUESTA**

#### **6.1 Datos Informativos**

**Título:**

Cuantificación de los niveles de mercurio contenido en lámparas fluorescentes obsoletas previo a su eliminación mediante la técnica de generación de vapor frío por medio de espectroscopía de absorción atómica.

**Unidad Ejecutora:**

Universidad Técnica de Ambato.

Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Carrera de Ingeniería Bioquímica.

**Beneficiario:**

Estudiantes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Carrera de Ingeniería Bioquímica

**Director del Proyecto:**

Dr. Roman Rodríguez Ph.D.

**Personal Operativo:**

Egda. Cristina F. Alarcón Q.

**Tiempo de Duración:**

10 meses.

**Lugar de Ejecución:**

Laboratorio de Servicios Analíticos HAVOC Cia. Ltda.

**Costo:**

\$ 13 511.00

## **6.2 Antecedentes de la Propuesta**

El mercurio, es un elemento no radiactivo y tóxico sobre la tierra por su estado físico ya que es el único elemento metálico líquido a temperatura ambiente. Sus propiedades físicas y químicas lo convierten en un metal atractivo para aplicaciones científicas e industriales (Sánchez, 2005). El mercurio se presenta en forma inorgánica y orgánica en el ecosistema, los cuales difieren significativamente en sus grados de toxicidad, siendo su forma orgánica una de las formas más perjudiciales para el hombre (Valiente, 2005).

Estudios recientes, sugieren que las fuentes antropogénicas, producto de la actividad del hombre, contribuyen a la liberación de la mayor parte del mercurio, y su incremento atmosférico desde el inicio de la era industrial. Aproximadamente, un tercio de las emisiones totales del mercurio global actual circulan en un ciclo cerrado entre los océanos y la atmósfera (Manuhan, 2002).

Las lámparas fluorescentes, contienen mercurio en forma de gas para producir radiación que al contacto con un polvo fluorescente lo convierte en luz visible. Según el toxicólogo David Ray, de la Universidad de Nottingham, citado por la BBC, expone que los tubos fluorescentes convencionales contienen entre 15 y 25 mg de mercurio, mientras que las lámparas de bajo consumo contienen entre 6 y 8 mg de mercurio. Con la optimización de la tecnología de las lámparas, han surgido modelos con muy baja cantidad de mercurio. En este sentido, la Asociación Nacional de Fabricantes Eléctricos Norteamericana (NEMA), estipula un contenido máximo de 5 mg por lámpara, aunque no todos los fabricantes (Sylvania-Colombia, Iluminación Promolux Internacional, Pantalamp, C.A-Venezuela y Toshiba) cumplen con este estándar. Con la reducción del contenido de mercurio, distintas agencias de la salud recomiendan, en caso de rotura, salir de la habitación por 15 minutos.

Las lámparas CFL (compact fluorescent lamp) deben reciclarse por un procedimiento específico ya que la bombilla es inocua mientras se mantenga intacta. El problema llega cuando se rompe la misma, algo que puede ocurrir comúnmente, si el usuario la desecha, liberándose de esta manera el vapor de mercurio, el cual es capaz de viajar muy rápido y a grandes distancias. También puede caer al agua y ser ingerido por los peces que luego sirven de alimento al ser humano (Bagheri y Gholami, 2001).

## **6.3 Justificación**

Las lámparas fluorescentes tenían algunos inconvenientes y limitaciones, heredados de la tecnología del tubo fluorescente clásico. La tecnología de fabricación ha mejorado ostensiblemente a las mismas gracias a la electrónica, y a la enorme mejora de los compuestos luminiscentes, emitiendo hoy día el doble de luz que un tubo clásico rectilíneo usando la mitad

de la energía. No obstante, algunas características de estas luminarias son objeto de controversia, especialmente tras el inicio de la prohibición de las bombillas incandescentes convencionales. De hecho, puede que se requiera regular la recolección y disposición final adecuada de las luminarias de bajo consumo con mercurio al final de su vida útil.

El mercurio proveniente de las lámparas fluorescentes es un residuo que no puede estar en contacto con los residuos sólidos urbanos por sus características tóxicas. Los comercios y negocios deben seguir las normativas y regulaciones sobre residuos especiales o peligrosos para el manejo adecuado de este tipo de luminarias con mercurio, cuando recolecten las lámparas y tubos fluorescentes que hayan terminado su vida útil.

La información acerca de la concentración de mercurio en este tipo de desechos es de gran interés en la actualidad, ya que desde siempre ha sido conocido como un elemento tóxico que presenta daños asociados con su ingestión e inhalación. En este sentido, no se ha detectado función vital en organismos vivientes, y sus propiedades tóxicas han ido en ascenso acelerado desde el siglo anterior dado su uso indiscriminado. Tomando en cuenta la capacidad de la espectroscopía de absorción atómica de actuar como detector selectivo y específico para la detección de mercurio y el acoplamiento de un generador de flujo continuo con técnica de vapor frío (FC-GVF-EAA), es posible desarrollar un sistema de monitoreo de la concentración de mercurio en lámparas fluorescentes de desecho.

## **6.4 Objetivos**

### **6.4.1 General**

Cuantificar los niveles de mercurio contenido en lámparas fluorescentes obsoletas previo a su eliminación mediante la técnica de generación de vapor frío por medio de espectroscopía de absorción atómica.

### **6.4.2 Específicos**

- Seleccionar un método adecuado de extracción de mercurio proveniente de lámparas fluorescentes obsoletas.
- Determinar la concentración de mercurio en lámparas fluorescentes compactas y lámparas fluorescentes convencionales antes de ser eliminadas.
- Contrastar los resultados obtenidos de los dos factores de estudio, lámparas fluorescentes compactas y lámparas fluorescentes, por medio de análisis estadístico.
- Identificar el tipo de lámpara que emite mayor contaminación de mercurio al ambiente.

## 6.5 Análisis de Factibilidad

El estudio que se debe desarrollar es de tipo investigativo, tecnológico, y social con el cual se puede implementar un método confiable para obtener concentraciones de mercurio provenientes del tratamiento de lámparas fluorescentes de desecho, y su impacto en la sociedad.

El análisis de factibilidad es de carácter técnico-social, pues permite valorar la concentración de mercurio mediante el uso de espectroscopía de absorción atómica con técnica de generación de vapor frío, lo cual constituye un aporte importante a la comunidad. De esta manera, se conoce la concentración de mercurio procedente de lámparas fluorescentes mediante la utilización de métodos adecuados, confiables y económicos en aras de obtener información oportuna en la toma de decisiones, y que repercuta favorablemente al desarrollo de un plan de control de este tipo de desechos y concientice a la comunidad e incentive al desarrollo sostenible del país.

En la Tabla N° 6.1, se detalla los costos de extracción y determinación de mercurio en lámparas fluorescentes de desecho.

Tabla N° 6.1 Recursos Económicos Estimados para la Propuesta Planteada

RUBROS	Aportado por:		
	UTA	Graduando	HAVOC
Personal	800.00		2800.00
Equipos de Análisis			6000.00
Materia Prima		300.00	200.00
Reactivos			2361.00
Insumos de Oficina		400.00	
Transporte		100.00	
Impresión		50.00	
Encuadernado		100.00	
Imprevistos		400.00	
SUMAN (USD):	800.00	1350.00	11361.00
TOTAL (USD):		13511.00	

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

## **6.6 Fundamentación**

Los beneficios ambientales y el ahorro energético que suponen las lámparas fluorescentes o bombilla de bajo consumo son innegables, pero al finalizar su vida útil, estas bombillas deben reciclarse adecuadamente debido a lo especial de su composición sabiendo que el mercurio es un metal pesado y muy tóxico para la salud y el medio ambiente.

Mientras la bombilla permanezca intacta no existe ningún riesgo, puesto que el mercurio permanece confinado en su interior. El problema se presenta cuando se rompe o se desecha la bombilla de forma inadecuada. Al romperse la bombilla, el vapor de mercurio se libera y se dispersa por el ambiente, donde ejerce su efecto tóxico. Cantidades muy pequeñas de este metal entrañan un elevado riesgo para el medio ambiente y para la salud humana, pues se conoce que el mercurio realiza un proceso de bioacumulación transmitiéndose a través de las cadenas tróficas.

Para evitar problemas de contaminación por los desechos de mercurio a través de lámparas y bombillas fluorescentes finalizada su vida útil, deben ser recicladas adecuadamente. Para ello, deben ser recogidas de forma selectiva, evitando su rotura, y transportadas por un gestor autorizado para su correcto tratamiento en una planta de reciclaje. En el país no existe aún la consciencia de realizar el reciclaje de este tipo de desechos. Sin embargo, se pueden establecer centros de recolección de residuos, como por ejemplo: los puntos limpios municipales.

Sería de gran utilidad comprometer a empresas relacionadas con gestión ambiental para que puedan recoger de forma selectiva tanto lámparas como bombillas para poder llevárselas a una planta de tratamiento que opere de forma adecuada, separando los componentes que las integran para volver a tener una nueva vida. El vidrio se podría reciclar para fabricar envases destinados a usos no alimentarios, o como componente de asfaltos, cementos o cerámicas. El mercurio recuperado aportaría a la fabricación de electrodos para plantas desalinizadoras.

## 6.7 Metodología

En la Tabla N° 6.2 se detalla el plan de acción que se va de seguir.

Tabla N° 6.2 Modelo Operativo (Plan de acción)

Fases	Metas	Actividades	Responsable	Recursos	Presupuesto	Tiempo
Formulación de la propuesta	Determinación del contenido de mercurio en lámparas fluorescentes obsoletas	Revisión bibliográfica	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$800	2 meses
Desarrollo preliminar de la propuesta	Cronograma de la propuesta.	Obtención de Materia prima Extracción del analito de estudio. Fijación de la concentración de mercurio	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$ 3750	3meses
Implementación de la propuesta	Ejecución de la propuesta	Ensayo de la obtención y determinación de mercurio de muestras de lámparas de fluorescencia obsoletas.	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$ 1500	2meses
Evaluación de la propuesta	Comprobación del método de obtención.	Verificación de la funcionalidad del método empleado para la extracción de mercurio	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$ 1200	2 meses

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

## 6.8 Administración

La propuesta planteada estará coordinada por el Dr. Roman Rodríguez y la Egda. Cristina Alarcón, y se representa en la Tabla N° 6.3.

Tabla N° 6.3 Administración de la Propuesta

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsables
Cuantificar la concentración de mercurio contenido en lámparas fluorescentes obsoletas	Inexistencia de estudios realizados dentro del país que cuantifiquen la concentración de mercurio en lámparas fluorescentes obsoletas	Obtención de datos confiables que permitan establecer la concentración de mercurio en los diferentes tipos de lámparas fluorescentes.	Extracción de la cantidad de mercurio contenido en lámparas fluorescentes. Ejecución de análisis comparativos entre los tipos de lámparas fluorescentes encontrados.	Investigadores: Roman Rodríguez y Cristina Alarcón

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

## 6.9 Previsión de la Evaluación

La Tabla N° 6.4 muestra la previsión que se le dará a la propuesta al momento de ser evaluada.

Tabla N° 6.4 Previsión de la Evaluación de la Propuesta

Preguntas Básicas	Explicación
¿Quiénes solicitan evaluar?	Sector Científico.
¿Por qué evaluar?	Utilización de métodos analíticos confiables en la determinación de la concentración de mercurio en lámparas fluorescentes.
¿Para qué evaluar?	Determinación de niveles de contaminación provocados por la eliminación inadecuada de lámparas fluorescentes.
¿Qué evaluar?	Método analítico. Tecnología empleada. Muestras de análisis. Resultados obtenidos.

Tabla N° 6.4 (Continuación)

¿Quién evalúa?	Director del proyecto Tutor Calificadores
¿Cuándo evaluar?	Todo el tiempo desde las pruebas preliminares, hasta los análisis finales de comparación de resultados.
¿Cómo evaluar?	Mediante instrumentos de evaluación.
¿Con qué evaluar?	Experimentación y Normativas de Desecho de Residuos Tóxicos.

---

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

## MATERIALES DE REFERENCIAS

### BIBLIOGRAFÍA

1. ALEXANDER, Julio. 2005. Contaminación con mercurio. Fuente: [www.voltairenet.org](http://www.voltairenet.org)
2. AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. 2005. Proceedings: Workshop to Identify Promising Technologies for the Treatment of Produced Water Toxicity. Health and Environmental Sciences Departmental Report No. DR351. Parsons Engineering Science.
3. ANTUÑA, Ismael Pablo. 2007. Efectos Toxicológicos e Impacto Ambiental del Mercurio. Validaciones y Sistemas de control de calidad de ensayos químicos bajo sistema de calidad ISO 17025:2005. Rosario – Santa Fe – Argentina. 22pgs.
4. APHA. 2005. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, 21av Edición, editorial Díaz de Santos, Madrid - España, Método 3112 B y Método 3114 B.
5. BAIRD, C. 1999. Environmental Chemistry. 2nd Ed. W.H. Freeman & Company. 65pgs.
6. BAGHERI, H. & GHOLAMI, A. 2001. Determination of very low levels of dissolved mercury (II) and methylmercury in rivers waters by continuous flow with on-line UV decomposition and cold-vapor atomic fluorescence spectrometry after preconcentration on a silica gel-2-mercaptobenzimidazol sorbent. *Talanta*, 55(6): 1141-1150.
7. BEDOYA, Franky. 2009. Homologación de Métodos de Análisis Físicoquímico Empleados en Postobón S.A. Para Materias Primas Y Producto Terminado, y Validación del Método para la Determinación de Grados Brix. Universidad De Antioquia Facultad de Ingeniería Departamento de Ingeniería Química. 418pgs.
8. CARRASQUERO, Armando y ADAMS, Melitón. 2002. Comparación de métodos para el análisis de mercurio en suelos procedentes del callao, Estado de Bolívar, Venezuela. INCI v.27 n.4 Caracas. 87pp.
9. CASTELLUCCI, Federico. 2005. Recomendaciones armonizadas para la validación de métodos de análisis en un solo laboratorio. Resolución OENO 8/2005. Simposio sobre armonización de sistemas de garantía de calidad para laboratorios analíticos. OIV: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. France. 281pgs.
10. CASTRO ROCHA, E. 2000. Principios Básicos de Espectroscopía. Editorial UACH. México. 123-203pgs.
11. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. 2002. Guía de validación de métodos analíticos. México A. C. 34pgs
12. COLOMBO L.D., MANGIONE S.B. y FIGLIOGLIA A. 2008. Soil profile distribution of heavy metals in soil attended with sewage sludge for eight years. *Agr. Med. Inter. J. of Agric. Sci.* 128: 273-283pgs.

13. EPA. 1994, Method 7470A. Mercury in Liquid Waste (Manual Cold-Vapor Technique).6pgs.
14. EPA. 1997, Mercury Study Report to Congress. Office of Air Quality Planning & Standards and Office of Research and Development. Volume II: An Inventory of Anthropogenic Mercury Emissions in the United States.
15. ESPAÑOL, Santiago. 2011. Toxicología del Mercurio. Actuaciones Preventivas en Sanidad Laboral y Ambiental. Jornada Internacional por el Impacto Ambiental del Mercurio Utilizado por la Minería Aurífera artesanal en Iberoamérica. 66pgs.
16. FDA. 2000. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. /Center for Drug Evaluation and Research.
17. HANLON, James A. 2007. Analytical Methods for Mercury in National Pollutant Discharge Elimination System (NPDES) Permits. EPA (Unites Estates Environmental Protection Agency)
18. HARRIS, Daniel. 2007. Análisis Químico Cuantitativo. Editorial Reverté. Volumen 1. Edición N°3. 924pgs.
19. HARVEY, David. 2002. Química Analítica Moderna. Editorial McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid-España. 542pgs.
20. HASWELL, S.J., 1991. Atomic Absorption Spectrometry; Theory, Design and Applications. Elsevier, Amsterdam.
21. HOUSECRAFT, C.E. & SHARPE, A.G. 2006. Química Inorgánica 2ª Edición. Editorial Pearson Prentice Hall, 423pgs.
22. ISAT (Instituto Salud y Trabajo). 2001. Niveles de exposición ambiental, ocupacional y estado de salud de los niños de la comunidad minera artesanal de oro. Mollehuaca. Programa para la prevención y eliminación del Trabajo Infantil en la Minería Artesanal en Sudamérica. Arequipa, Perú.
23. KIELY, Gerard. 1999. Ingeniería ambiental. 1ra edición. McGraw Hill. Madrid. 488pgs.
24. LACERDA, L. D. y SALOMONS, W. 2005. El Mercurio en la Amazonía. Serie Tecnología Ambiental: 3. Río de Janeiro. 78pp.
25. LAUWERY, Robert. 2010. Control Biológico Herramientas y Enfoques. Enciclopedia de Salud Y Seguridad en el Trabajo. www.insht.es.
26. LENNTECH. 2009. Mercurio (Hg) Propiedades químicas y efectos sobre la salud y el medio ambiente. Holding B.V. www.lenntech.com
27. MAISONET, Mildred. 2002. Exposición Al Mercurio Por El Consumo De Pescado Contaminado: Cuadro De La Carga Corporal De Niños Y Mujeres En América Latina, N° 85

28. MANOSALVAS, Jessica F. 2005. Determinación de metales pesados en material particulado PM10 por espectrofotometría de absorción atómica. Disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Ecuador. 640pgs.
29. MANUHAN, Stanley E. 2002. Toxicological Chemistry. 2da edición. Lewis Publishers. 374pgs.
30. MAROTO, Alicia. 2002. Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. Universitat Rovira I Virgili. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. France.304pgs
31. MARRUGO, José Luis y CEBALLOS, Edineldo Lans. 2006. Impacto ambiental por contaminación con níquel, mercurio y cadmio en aguas, peces y sedimentos en la cuenca del río San Jorge, en el Departamento de Córdoba. Universidad de Córdoba. Centro de investigaciones – CIUC. Montería.
32. METCALF M. y EDDY R., Inc. 2006. Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, vertido y reutilización. McGraw-Hill.
33. MILLER James & MILLER Jane. 2002. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Editorial Prentice Hall. 296pgs.
34. MINISTERIO DEL AMBIENTE. 2008 Inventario Nacional De Emisiones De Mercurio Y Productos Que Contienen Mercurio Ecuador, 221pgs
35. NEBEL, Bernard J. 1999. Ciencias Ambientales. Ecología y desarrollo sostenible. 6ª. edición. Versión en español. Pearson Educación. México. 300-302pgs.
36. Norma INEN ISO/IEC 17025. 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Selección de Métodos. 37pgs.
37. NOVAS, Arelis Jaime; DÍAZ Padrón, Heliadora; GONZÁLEZ, Rita María. 2006. Evaluación del sistema de calidad implantado en el laboratorio de riesgos químicos del instituto nacional de salud de los trabajadores. Departamento de Riesgos Químicos, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba
38. OAE. 2010. Lista de Laboratorios de Ensayo Acreditados. Fuente: [www.oae.gob.ec](http://www.oae.gob.ec)
39. O'NEILL, P. 2005. Environmental Chemistry. Chapman & Hall. London. 635pp.
40. PNUMA, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente; 2005. Evaluación Mundial sobre el Mercurio, Programa Inter-organismos para la Gestión Racional de las sustancias Químicas. Ginebra Suiza. pdf
41. PROSKE, O.; ENSSLIN, F. y BLUMENTHAL, H. 1960. Análisis de Metales. Editorial Aguilar. Vol 2. 657pp.
42. REVELLE, Penelope y REVELLE, Charles. 1984. The environment issues and choices for society. 2da edición. Willard Grant Press. Boston.

43. ROUESSAC, Annick. y ROUESSAC, Francis. 2007. Chemical Analysis. Modern Instrumentation Methods and Techniques. Second Edition. University of Le Mans, France.
44. SANCHEZ, Luis Enrique. 2005. Control de la Contaminación de las Aguas. III Curso Internacional de Aspectos Geológicos de Protección Ambiental. Vol 1. UNESCO. 17pgs.
45. SAUCEDO, Bárbara; RODRÍGUEZ, Ana; ALVAREZ, Odalys; RABÍ, Leila; 2007, Determinación de Metales Pesados en un Suplemento Nutricional de Origen Natural con Propiedades Antioxidantes. Latin American Journal of Pharmacy. Lat. Am. J. Pharm. 26 (5): 760 pgs.
46. SEPÚLVEDA, Tania. y VELASCO, Juan. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. 1ra edición. Instituto Nacional de Ecología, México D.F. 467pgs.
47. SEPÚLVEDA, Luz Elena; AGUDELO, Luz Marina y ARENGAS Ángel Isdrúval. 2006. El mercurio, sus implicaciones en la salud y en el ambiente. Documental. 9pgs
48. SHIMADZU CORPORATION. 2005. Intruccion Manual Hidride Vapor Generator. HVG-1. 25pgs.
49. SKOOG, D. y WEST D. 2001. Análisis Instrumental, 8va. Edición, editorial Interamericana, México
50. SKOOG, Douglas A.; WEST, Donald M. y HOLLER, F, James. 2005. Fundamentos de Química analítica. Octava edición. International Thomson Editors, S.A. 1172pgs
51. TAPIA, F. y TOHARIA, M. 2005. Medio ambiente: ¿alerta verde?. Acento Editorial. Madrid. 389pgs.
52. TULAS. Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del Ministerio del Ambiente. 2003. Decreto Ejecutivo 3516. Publicado en el Registro Oficial N° E 2. Libro 5. De la calidad Ambiental y Anexos.
53. UNITAR. 2010. Actividades para la gestión del mercurio. Información en línea: [www.unitar.org/cwm/es/mercurio](http://www.unitar.org/cwm/es/mercurio)
54. VALIENTE, Liliana. 2005. Determinación del nivel de mercurio en aguas y soluciones ácidas. Instituto nacional de Tecnología Industrial (INTI) – Química, Laboratorio de Análisis de Trazas. [www.inti.gov.ar](http://www.inti.gov.ar)
55. WINEFORDNER, J. D. 2003. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Department of Chemistry and Environmental Science New Jersey Institute of Technology. Volumen 162. 472pgs.

**ANEXOS**

# **ANEXO 1**

**TULAS**

**Norma de Calidad Ambiental y de  
Descarga de Efluentes  
RECURSO AGUA**

Debido a lo largo de las tablas presentes en el Anexo 1 del TULAS concerniente a la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua, las tablas han sido recortadas para mostrar únicamente la información referente a los límites máximos permisibles de Mercurio.

*CONTINUACIÓN...*

TABLA 1. Límites máximos permisibles para aguas de consumo humano y uso doméstico, que únicamente requieren tratamiento convencional.

<b>Parámetros</b>	<b>Expresado Como</b>	<b>Unidad</b>	<b>Límite Máximo Permissible</b>
Materia flotante			<b>Ausencia</b>
Mercurio (total)	Hg	mg/l	0,001
Nitrato	N-Nitrato	mg/l	10,0

Fuente: TULAS, 2003

*CONTINUACIÓN...*

TABLA 2. Límites máximos permisibles para aguas de consumo humano y uso doméstico que únicamente requieran desinfección.

<b>Parámetros</b>	<b>Expresado Como</b>	<b>Unidad</b>	<b>Límite Máximo Permissible</b>
Materia Flotante			AUSENCIA
Mercurio (total)	Hg	mg/l	0,001
Níquel	Ni	mg/l	0,025

Fuente: TULAS, 2003

CONTINUACIÓN...

TABLA 6. Criterios de calidad admisibles para aguas de uso agrícola

<b>Parámetros</b>	<b>Expresado Como</b>	<b>Unidad</b>	<b>Límite Máximo Permissible</b>
Molibdeno	Mo	mg/l	0,01
Mercurio (total)	Hg	mg/l	0,001
Níquel	Ni	mg/l	0,2

Fuente: TULAS, 2003

CONTINUACIÓN...

TABLA 8. Criterios de calidad para aguas de uso pecuario

<b>Parámetros</b>	<b>Expresado Como</b>	<b>Unidad</b>	<b>Límite Máximo Permissible</b>
Molibdeno	Mo	mg/l	0,005
Mercurio (total)	Hg	mg/l	0,01
Nitratos + nitritos	N	mg/l	10,0

Fuente: TULAS, 2003

CONTINUACIÓN...

TABLA 11. Límites de descarga al sistema de alcantarillado público

<b>Parámetros</b>	<b>Expresado Como</b>	<b>Unidad</b>	<b>Límite Máximo Permissible</b>
Materia flotante	<i>VISIBLE</i>		AUSENCIA
Mercurio (total)	Hg	mg/l	0,01
Níquel	Ni	mg/l	2,0

Fuente: TULAS, 2003

# ANEXO 2

## Preparación de Reactivos

Solución de Boro hidruro de sodio (0,2% NaBH<sub>4</sub>)

- En un balón volumétrico de 500 ml
- Disolver con agua desionizada (0.054 µs/cm)
- 1,25 g de lentejas de hidróxido de sodio Merck
- Y 1,0 g de Borohidruro de sodio Panreac (Reag. USP) PA
- Ultrasonar la solución preparada de ser necesario para obtener una rápida disolución.
- Aforar el balón volumétrico con agua desionizada (0.054 µs/cm).

Solución de Boro hidruro de sodio (0,3% NaBH<sub>4</sub>)

- En un balón volumétrico de 500 ml
- Disolver con agua desionizada (0.054 µs/cm)
- 1,90 g de lentejas de hidróxido de sodio Merck
- Y 1,50 g de Borohidruro de sodio Panreac (Reag. USP) PA
- Ultrasonar la solución preparada de ser necesario para obtener una rápida disolución.
- Aforar el balón volumétrico con agua desionizada (0.054 µs/cm).

Solución de Boro hidruro de sodio (0,4% NaBH<sub>4</sub>)

- En un balón volumétrico de 500 ml
- Disolver con agua desionizada (0.054 µs/cm)
- 2,5 g de lentejas de hidróxido de sodio Merck
- Y 2,0 g de Borohidruro de sodio Panreac (Reag. USP) PA
- Ultrasonar la solución preparada de ser necesario para obtener una rápida disolución.
- Aforar el balón volumétrico con agua desionizada (0.054 µs/cm).

Solución de Boro hidruro de sodio (0,5% NaBH<sub>4</sub>)

- En un balón volumétrico de 500 ml
- Disolver con agua desionizada (0.054 µs/cm)
- 3,13 g de lentejas de hidróxido de sodio Merck
- Y 2,50 g de Borohidruro de sodio Panreac (Reag. USP) PA
- Ultrasonar la solución preparada de ser necesario para obtener una rápida disolución.
- Aforar el balón volumétrico con agua desionizada (0.054 µs/cm).

Solución de Ácido clorhídrico (5M HCl)

- 200 mL de ácido clorhídrico 37% Panreac (máx. 0,000 000 5% de Hg) PA-ACS-ISO.
- Aforar con agua desionizada en un balón volumétrico de 500 mL.

Solución de Ácido sulfúrico (30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

- En un balón volumétrico de 100 mL.
- Verter 31 mL de ácido sulfúrico 98% Panreac (máx. 0,000 000 5% de Hg) PA-ACS-ISO.
- Aforar con agua desionizada (0.054 µs/cm).

Solución de Ácido nítrico (30% HNO<sub>3</sub>)

- 44 mL de ácido nítrico 69% Panreac (máx. 0,000 000 5% de Hg) PA-ISO.
- Aforar con agua desionizada en un balón volumétrico de 100 mL.

Solución de Ácido nítrico (1.5% HNO<sub>3</sub>)

- 22 mL de ácido nítrico 69% Panreac (máx. 0,000 000 5% de Hg) PA-ISO.
- Colocar en un balón de 1000 mL
- Aforar con agua desionizada (0.054 µs/cm).

Solución de Permanganato de potasio (5% KMnO<sub>4</sub>)

- Pesar 0.25 g de permanganato de potasio Panreac (máx.0,000 005% de Hg) PA-ACS
- Diluir en un balón de 5 mL
- Aforar con agua desionizada (0.054 µs/cm).

# **ANEXO 3**

**Equipo Utilizados**

**SHIMADZU GHV-1**

**SHIMADZU AA680**

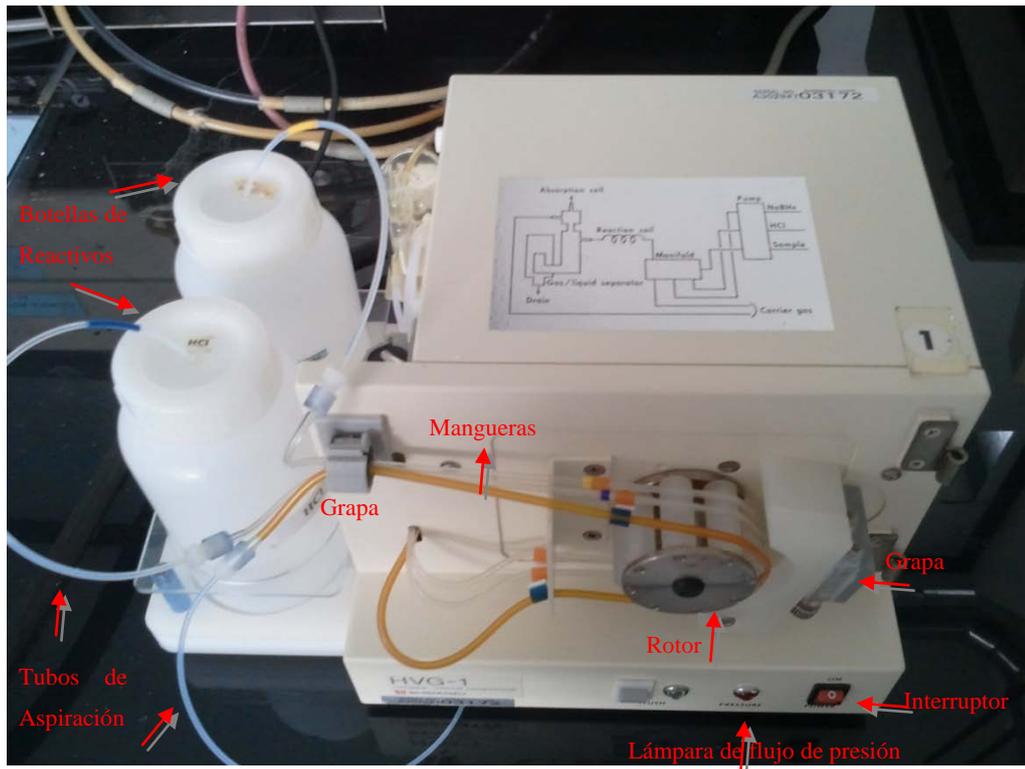


Imagen 1. Fotografía del Equipo SHIMADZU GHV-1



Imagen 2. Fotografía del Mechero y Celda de Cuarzo



Imagen 3. Fotografía de los Equipos SHIMADZU GHV-1 y SHIMADZU AA680

# **ANEXO 4**

**Tablas de Resultados**

**Y**

**Análisis Estadístico**

PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Tabla N° 1 Preparación de Estándares de Calibración

Volumen inicial	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Final
mL	Ppm	Ppm	mL
(V <sub>1</sub> )	(C <sub>1</sub> )	(C <sub>2</sub> )	(V <sub>2</sub> )
0.5	1000	10	50
5	10	1	50
1	1	0.02	50
1.5	1	0.03	50
2	1	0.04	50
2.5	1	0.05	50
3	1	0.06	50

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

CONDICIONES DE OPERACIÓN DEL EQUIPO DE GENERACIÓN DE VAPOR FRÍO

Tabla N° 2 Resultados Obtenidos de la Experimentación con el Equipo de Generación de Vapor Frío

Tratamientos		ABS					
N°	Codificación	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio
1	a1b1	0.004	0.001	0.003	0.006	0.005	0.004
2	a1b2	0.020	0.025	0.023	0.026	0.028	0.024
3	a1b3	0.047	0.043	0.048	0.040	0.046	0.045
4	a2b1	0.014	0.017	0.010	0.012	0.017	0.014
5	a2b2	0.088	0.089	0.087	0.088	0.085	0.087
6	a2b3	0.110	0.111	0.115	0.113	0.114	0.113
7	a3b1	0.129	0.125	0.127	0.129	0.128	0.128
8	a3b2	0.162	0.164	0.163	0.160	0.163	0.162
9	a3b3	0.110	0.174	0.148	0.195	0.165	0.158
10	a4b1	0.091	0.098	0.096	0.095	0.099	0.096
11	a4b2	0.031	0.030	0.038	0.033	0.039	0.034
12	a4b3	0.012	0.019	0.015	0.006	0.018	0.014

Elaborado por: Alarcón Quinapanta, 2011

Factor a: Agente Reductor (NaBH <sub>4</sub> )	Factor b: Nivel de Presión de Argón	Replicas
Nivel a1: 0,20%	Nivel b1: 32,70 psi	R1
Nivel a2: 0,30%	Nivel b2: 46,4 psi	R2
Nivel a3: 0,40%	Nivel b3: 57,6 psi	R3
Nivel a4: 0,50%		R4
		R5

Tabla N°3 Resultados Medios de la Experimentación con el Equipo de Generación de Vapor Frío

Tratamiento	ABS	mg/L
1	0.0038	0.000
2	0.0244	0.002
3	0.0448	0.004
4	0.0140	0.001
5	0.0874	0.009
6	0.1126	0.011
7	0.1276	0.013
8	0.1624	0.018
9	0.1146	0.011
10	0.0946	0.009
11	0.0342	0.003
12	0.014	0.001

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N° 4 Porcentajes de Recuperación - Equipo de Generación de Vapor Frío

Ítem	% DE RECUPERACIÓN					Promedio
	R1	R2	R3	R4	R5	
1	-1.9	-4.0	-2.6	-0.6	-1.3	-2.1
2	8.9	12.2	10.9	12.9	14.3	11.8
3	27.1	24.4	27.8	22.4	26.4	25.6
4	4.8	6.8	2.1	3.5	6.8	4.8
5	54.8	55.4	54.1	54.8	52.7	54.4
6	69.6	70.3	73.0	71.6	72.3	71.4
7	82.4	79.7	81.1	82.4	81.8	81.5
8	104.7	106.1	105.4	103.4	105.4	105.0
9	69.6	112.8	27.8	66.2	87.2	72.7
10	56.8	61.5	103.4	59.5	14.9	59.2
11	16.3	15.6	21.0	17.6	21.7	18.4
12	3.5	8.2	5.5	-0.6	7.5	4.8

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N° 5 Resultados del Cálculo de ANOVA de la Experimentación con el Equipo de Generación de Vapor Frío

Fuente de varianza	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	FC	F
A: Factor A	0.132646	3	0.0442153	496.30	0.0000
B: Factor B	0.00534323	2	0.00267162	29.99	0.0000
Replicas	0.000285208	1	0.000285208	3.20	0.0800
INTERACCIONES					
AB	0.0468828	6	0.00781379	87.71	0.0000
RESIDUOS	0.00418719	47	0.0000890892		
Total (Corregido)	0.189344	59			
P value $\leq 0.05$	0.000000053742		**	Estadísticamente significativo	
Fc>Ft	Tukey			Estadísticamente significativo	

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N° 6 Resultados del Contraste Múltiple de Rangos para Absorbancia según Factor A

Método: 95.0 porcentaje HSD de Tukey		
Factor A	Media	Grupos
1	0.0243333	a
4	0.048	b
2	0.0713333	c
3	0.149467	d

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N° 7 Resultados del Contraste Múltiple de Rangos para Absorbancia según Factor B

Método: 95.0 porcentaje HSD de Tukey		
Factor B	Media	Grupos
1	0.0603	a
2	0.0771	b
3	0.08245	b

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N° 8 Resultados de la Prueba de Tukey para la interaccion AB

Factor A	Factor B	Medias
a1	b1	0.0038
a1	b2	0.0244
a1	b3	0.0448
a2	b1	0.014
a2	b2	0.0874
a2	b3	0.1126
a3	b1	0.1276
a3	b2	0.1624
a3	b3	0.1584
a4	b1	0.0958
a4	b2	0.0342
a4	b3	0.014

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

## Validación del Método Analítico para la Determinación de Mercurio.

Tabla N° 9 Reporte de ABS obtenidas en la curva de Calibración

N°	Concentración Experimental	Réplicas					Promedio
		R1	R2	R3	R4	R5	
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	0.02	0.162	0.160	0.162	0.159	0.164	0.161
5	0.02	0.165	0.163	0.160	0.164	0.163	0.163
6	0.02	0.164	0.162	0.162	0.165	0.163	0.163
7	0.03	0.238	0.239	0.240	0.243	0.239	0.240
8	0.03	0.239	0.241	0.238	0.236	0.243	0.239
9	0.03	0.241	0.239	0.244	0.242	0.245	0.242
10	0.04	0.298	0.309	0.296	0.312	0.303	0.304
11	0.04	0.322	0.304	0.318	0.326	0.308	0.316
12	0.04	0.311	0.290	0.302	0.328	0.298	0.306
13	0.05	0.388	0.386	0.392	0.400	0.399	0.393
14	0.05	0.387	0.390	0.392	0.392	0.402	0.393
15	0.05	0.399	0.405	0.408	0.395	0.388	0.399
16	0.06	0.449	0.452	0.462	0.459	0.466	0.458
17	0.06	0.459	0.447	0.451	0.464	0.448	0.454
18	0.06	0.457	0.450	0.447	0.462	0.458	0.455

Elaborado por: Alarcón Cristina– Investigador

Tabla N° 10 Comprobación de la Concentración de los Estándares de Calibración

Concentración Experimental mg/L		ABS			Concentración Calculada mg/L		
0	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.02	0.02	0.162	0.165	0.164	0.020	0.021	0.021
0.02	0.02	0.160	0.163	0.162	0.020	0.021	0.020
0.02	0.02	0.162	0.160	0.162	0.020	0.020	0.020
0.001/Fc	0.02	0.159	0.164	0.165	0.020	0.021	0.021
0.001/Fc	0.02	0.164	0.163	0.163	0.021	0.021	0.021
0.03	0.03	0.238	0.239	0.241	0.030	0.031	0.031
0.03	0.03	0.239	0.241	0.239	0.031	0.031	0.031
0.03	0.03	0.240	0.238	0.244	0.031	0.030	0.031
0.0015/Fc	0.03	0.243	0.236	0.242	0.031	0.030	0.031
0.0015/Fc	0.03	0.239	0.243	0.245	0.031	0.031	0.031

Continuación

0.04	0.04	0.298	0.322	0.311	0.040	0.040	0.040
0.04	0.04	0.309	0.304	0.290	0.040	0.040	0.040
0.04	0.04	0.296	0.318	0.302	0.040	0.040	0.040
0.002/Fc	0.04	0.312	0.326	0.328	0.040	0.040	0.040
0.002/Fc	0.04	0.303	0.308	0.298	0.040	0.040	0.040
0.05	0.05	0.388	0.387	0.399	0.050	0.050	0.052
0.05	0.05	0.386	0.390	0.405	0.050	0.050	0.052
0.05	0.05	0.392	0.392	0.408	0.051	0.051	0.053
0.0025/Fc	0.05	0.400	0.392	0.395	0.052	0.051	0.051
0.0025/Fc	0.05	0.399	0.402	0.388	0.052	0.052	0.050
0.06	0.06	0.449	0.459	0.457	0.060	0.060	0.060
0.06	0.06	0.452	0.447	0.450	0.060	0.060	0.060
0.06	0.06	0.462	0.451	0.447	0.060	0.060	0.060
0.003/Fc	0.06	0.459	0.464	0.462	0.060	0.060	0.060
0.003/Fc	0.06	0.466	0.448	0.458	0.060	0.060	0.060

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Factor de concentración (Fc) = 0.05

Tabla N°11 Valores Promedios para la Determinación de la Curva de Calibración

Ítem	Concentración mg/L	ABS
1	0	0.000
2	0.02	0.163
3	0.03	0.240
4	0.04	0.308
5	0.05	0.395
6	0.06	0.455

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N°12 Porcentajes de Recuperación de las Soluciones Estándar del Analito de Estudio

Concentración Estándar mg/L		ABS	Concentración Experimental mg/L	% de Rec.	Prom X estima	X % rec.
0.00	0.00	0	-0.001	0.00	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
0.00	0.00	0	-0.001	0.00		
0.00	0.00	0	-0.001	0.00		
0.001	0.02	0.161	0.020	102.00	<b>0.021</b>	<b>102.7</b>
0.001	0.02	0.163	0.021	103.06		
0.001	0.02	0.163	0.021	103.19		
0.0015	0.03	0.2398	0.031	102.60	<b>0.031</b>	<b>102.9</b>
0.0015	0.03	0.2394	0.031	102.42		
0.0015	0.03	0.2422	0.031	103.66		
0.002	0.04	0.3036	0.039	98.07	<b>0.040</b>	<b>99.6</b>
0.002	0.04	0.3156	0.041	102.04		
0.002	0.04	0.3058	0.040	98.79		
0.0025	0.05	0.393	0.051	102.13	<b>0.051</b>	<b>102.6</b>
0.0025	0.05	0.3926	0.051	102.02		
0.0025	0.05	0.399	0.052	103.71		
0.003	0.06	0.4482	0.058	97.29	<b>0.058</b>	<b>97.3</b>
0.003	0.06	0.4462	0.058	96.84		
0.003	0.06	0.4506	0.059	97.82		

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

#### MATERIAL DE REFERENCIA

Tabla N° 13 Datos obtenidos del Estudio del Material de Referencia

TRACE METALS 1 QCI-034-1						
CONC. mg/L TRACE METALS 1 QCI-034-1	ABS			Concentración mg/L		
0.0144	0.073	0.068	0.069	0.0145	0.0134	0.0136
	0.070	0.071	0.069	0.0138	0.0141	0.0136
	0.071	0.069	0.072	0.0141	0.0136	0.0143
	0.069	0.072	0.068	0.0136	0.0143	0.0134
	0.069	0.070	0.071	0.0136	0.0138	0.0141

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N° 14 Datos obtenidos del Estudio del Material de Referencia

TRACE METALS 1  
PQ-25A

CONC. mg/L TRACE METALS 1 PQ-25 <sup>a</sup>	ABS			Concentración mg/L		
	0.31	0.316	0.309	1.00	1.02	0.99
	0.311	0.309	0.31	1.00	0.99	1.00
1	0.315	0.311	0.311	1.01	1.00	1.00
	0.316	0.315	0.316	1.02	1.01	1.02
	0.309	0.316	0.315	0.99	1.02	1.01

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

SECCIÓN 1.

Límites de confianza de la pendiente:

$$LC_b = b \pm tS_b \quad (5)$$

$$LC_b = 7,6337 \pm (2,78 * 0,1519)$$

$$LC_b = 7,6337 \pm 0,4224$$

Límites de confianza de la ordenada al origen:

$$LC_a = a \pm tS_a \quad (6)$$

$$LC_a = 0,0058 \pm (2,78 * 0,0059)$$

$$LC_a = 0,0058 \pm 0,0164$$

SECCIÓN 2.

SENSIBILIDAD DE CALIBRADO:

$$b = 7,6337$$

SENSIBILIDAD ANALÍTICA:

$$\gamma = \frac{S_s}{m} * Fc \quad (7)$$

$$\gamma = \frac{0,0216}{7,6337} * 0,05$$

$$\gamma = 0,0014$$

SECCIÓN 3.

LÍMITE DE DETECCIÓN:

$$LOD = \frac{S_{y/x}}{m} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{X^2}{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}} \quad (8)$$

$$LOQ = \frac{0,0216}{7,3884} * \sqrt{\frac{1}{5} + \frac{1}{6} + \frac{(0,03)^2}{0,0024}}$$

$$LOD = 0,0025$$

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN:

$$LOQ = \frac{S_{y/x}}{k} * m \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{X^2}{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}} \quad (9)$$

$$LOQ = \frac{0,0216}{10} * 7,3884 \sqrt{\frac{1}{5} + \frac{1}{6} + \frac{(0,03)^2}{0,0024}}$$

$$LOQ = 0,0140$$

PRECISIÓN

Tabla N° 15 Valores de F obtenidos

PRUEBA F					
CONCENTRACIONES		DCMB	DCMW	DCMB/DCMW	FTab
0	0	0	0	0.00	
0.02	0.001	8.3514E-08	5.1481E-08	1.62	
0.03	0.015	1.9677E-07	9.5526E-08	2.06	
0.04	0.020	3.5019E-06	1.9752E-06	1.77	3.89
0.05	0.025	1.1028E-06	7.7394E-07	1.42	
0.06	0.030	3.3291E-07	8.1054E-07	0.41	
0.0144	0.0144	3.7181E-09	7.3647E-08	0.05	
1	1	0	0.00010618	0.00	

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N° 16 Reproducibilidad

mg/L		SDCB	SDCW	SDCT	N-1	SDCT/N-1	SRD	% SRD
0	0	0.0000	0.0000	0.0000	14	0.0000	0.000	-
0.02	0.001	0.0000	0.0000	0.0000	14	0.0000	0.000	1.2
0.03	0.015	0.0000	0.0000	0.0000	14	0.0000	0.000	1.1
0.04	0.020	0.0000	0.0000	0.0000	14	0.0000	0.001	3.7
0.05	0.025	0.0000	0.0000	0.0000	14	0.0000	0.001	1.8
0.06	0.030	0.0000	0.0000	0.0000	14	0.0000	0.001	1.4
0.0144	0.0144	0.0000	0.0000	0.0000	14	0.0000	0.000	1.8
1	1	0.0000	0.0013	0.0013	14	0.0001	0.010	1.0

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N° 17 Medias por Niveles de Concentración

mg/L		Medias			MEDIA x NIVELES
0.00	0	0.000	0.000	0.000	0.000
0.02	0.001	0.020	0.021	0.021	0.021
0.03	0.015	0.031	0.031	0.031	0.031
0.04	0.020	0.039	0.041	0.039	0.040
0.05	0.025	0.051	0.051	0.052	0.051
0.06	0.030	0.059	0.059	0.059	0.059
0.0144	0.0144	0.014	0.014	0.014	0.014
1	1	1.003	1.007	1.003	1.005

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N° 18 Repetibilidad de los tres días

REPETIBILIDAD SDCW (Srd)									
mg/L		Medias de días			SDCW	N-K	DCMW	Sr	%
0	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	12.0000	0.000	0.000	-
0.02	0.001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	12.0000	0.000	0.000	1.1
0.03	0.015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	12.0000	0.000	0.000	1.0
0.04	0.020	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	12.0000	0.000	0.001	3.5
0.05	0.025	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	12.0000	0.000	0.001	1.8
0.06	0.030	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	12.0000	0.000	0.001	1.5
0.01	0.0144	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	12.0000	0.000	0.000	1.9
1	1	0.0004	0.0004	0.0004	0.0013	12.0000	0.000	0.010	1.0

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N° 19 Repetibilidad entre Días

ENTRE DÍAS SDCB SRD										
mg/L		Medias entre días			SDCB	K-1	DCMB	SR	%	
0	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.0000	0.0000	0.0000	-	
0.02	0.001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.0000	0.0000	0.0003	1.4	
0.03	0.015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.0000	0.0000	0.0004	1.5	
0.04	0.020	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.0000	0.0000	0.0019	4.7	
0.05	0.025	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.0000	0.0000	0.0011	2.1	
0.06	0.030	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.0000	0.0000	0.0006	1.0	
0.0144	0.0144	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.0000	0.0000	0.0001	0.4	
1	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.0000	0.0000	0.0000	0.0	

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

EXACTITUD

Tabla N° 20 Porcentaje de Recuperación-Exactitud

Conc. mg/L	Conc Exp.mg/L	% Recup	S	CV	<i>t Exp</i>	<i>t Tab</i>
0.0000	-0.0008	-	-	-	0.0000	
0.0200	0.0205	102.6524	1.1838	1.1532	1.0286	
0.0300	0.0307	102.4653	1.1055	1.0789	1.0219	
0.0400	0.0396	99.0749	3.7024	3.7370	0.1107	2.78
0.0500	0.0510	101.9313	1.8121	1.7778	0.4858	
0.0600	0.0589	98.1590	1.4360	1.4629	0.5628	
0.0144	0.0144	99.7602	1.7521	1.7563	-0.0611	
1.0000	1.0047	100.4722	0.9731	0.9685	0.2180	

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N° 21 Porcentaje de Recuperación-Exactitud

Conc. mg/L*Fc	Conc Exp.mg/L	% Recup	S	CV	<i>t Exp</i>	<i>t Tab</i>
0.0000	-0.0004	-	-	-	0.0000	
0.0010	0.00103	102.6524	1.1838	1.1532	1.0286	
0.0015	0.00154	102.4653	1.1055	1.0789	1.0219	
0.0020	0.00198	99.0749	3.7024	3.7370	0.1107	2.78
0.0025	0.00255	101.9313	1.8121	1.7778	0.4858	
0.0030	0.00295	98.1590	1.4360	1.4629	0.5628	
0.0144	0.0144	99.7602	1.7521	1.7563	-0.0611	
1.0000	1.0047	100.4722	0.9731	0.9685	0.2180	

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

## INCERTIDUMBRE

Tabla N° 22 Incertidumbre del Método

mg/L	$\mu$ patrón	$\mu$ Func. Resp.	S repet.	Correc. No realizada	$\mu$ Correc. no realizada	Suma cuadrados $\mu$	$\mu$	$\mu$ Relativa %
0.0000	0.0000	0	0.0010	0.000	0.001	0.000	0.002	-
0.0200	0.0010	0.000200001	0.0010	0.000	0.001	0.000	0.002	10.534
0.0300	0.0015	0.000200002	0.0010	0.000	0.001	0.000	0.002	7.490
0.0400	0.0020	0.000200004	0.0010	0.002	0.000	0.000	0.004	9.070
0.0500	0.0025	0.000200006	0.0010	0.001	0.001	0.001	0.003	5.817
0.0600	0.0030	0.000200008	0.0010	0.001	0.001	0.001	0.003	4.814
0.0144	0.0144	0.000200006	0.0010	0.000	0.000	0.000	0.002	4.057
1.0000	1.0000	0.020000023	0.0010	0.010	0.005	0.003	0.045	14.537

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

## RANGOS DE TRABAJO

Tabla N° 23 Rangos de Trabajo

mg/L	$\mu$	%	mg/L*Fc	M	%	FC
0.02	0.002	10.5	0.0010	0.000	10.5	
0.03	0.002	7.5	0.0015	0.000	7.5	
0.04	0.004	9.1	0.0020	0.000	9.1	
0.05	0.003	5.8	0.0025	0.000	5.8	0.05
0.06	0.003	4.8	0.0030	0.000	4.8	
0.0144	0.002	14.1	0.0144	0.000	14.1	
1	0.045	4.5	1.000	0.002	4.5	

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

## ESTUDIO DE LAS MATRICES DE ANÁLISIS CON ADICIÓN DE ESTÁNDAR

Tabla N° 24 Reporte de ABS obtenidas de la determinación de los niveles de mercurio en muestras de análisis

N°	Tratamientos Matriz+Estándar	ABS					Promedio
		R1	R2	R3	R4	R5	
1	Agua Residual	0.232	0.236	0.238	0.241	0.236	0.236
2	Agua Residual	0.240	0.239	0.245	0.244	0.237	0.241
3	Agua Residual	0.237	0.241	0.244	0.239	0.242	0.241
4	Agua Natural	0.104	0.116	0.102	0.114	0.11	0.109
5	Agua Natural	0.111	0.116	0.114	0.112	0.108	0.112
6	Agua Natural	0.114	0.116	0.109	0.112	0.116	0.113
7	Agua de Consumo	0.108	0.115	0.116	0.103	0.111	0.111
8	Agua de Consumo	0.114	0.117	0.109	0.115	0.103	0.112
9	Agua de Consumo	0.102	0.109	0.115	0.103	0.107	0.107

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N° 25 Reporte de Datos de Adición de Estándares en muestras de agua residual

Agua Residual	Abs				mg/L	
A110215	0.112	0.110	0.112	0.001	0.001	0.001
	0.116	0.116	0.111	0.001	0.001	0.001
	0.112	0.114	0.115	0.001	0.001	0.001
	0.114	0.112	0.113	0.001	0.001	0.001
	0.110	0.108	0.107	0.001	0.001	0.001
A 110215 + st 0,001 mg/L	0.232	0.240	0.237	0.002	0.002	0.002
	0.236	0.239	0.241	0.002	0.002	0.002
	0.238	0.245	0.244	0.002	0.002	0.002
	0.241	0.244	0.239	0.002	0.002	0.002
	0.236	0.237	0.242	0.002	0.002	0.002

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

Tabla N° 26 Reporte de Datos de Adición de Estándares en muestras de agua natural

Agua Natural	Abs				mg/L	
A1101137	-0.002	0.001	0.003	0.000	0.000	0.000
	-0.001	0.000	-0.001	0.000	0.000	0.000
	0.000	-0.002	0.001	0.000	0.000	0.000
	0.001	0.000	-0.001	0.000	0.000	0.000
	0.004	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
A 1101137 + st 0,001 mg/L	0.104	0.111	0.114	0.001	0.001	0.001
	0.116	0.116	0.116	0.001	0.001	0.001
	0.102	0.114	0.109	0.001	0.001	0.001
	0.114	0.112	0.112	0.001	0.001	0.001
	0.110	0.108	0.116	0.001	0.001	0.001

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

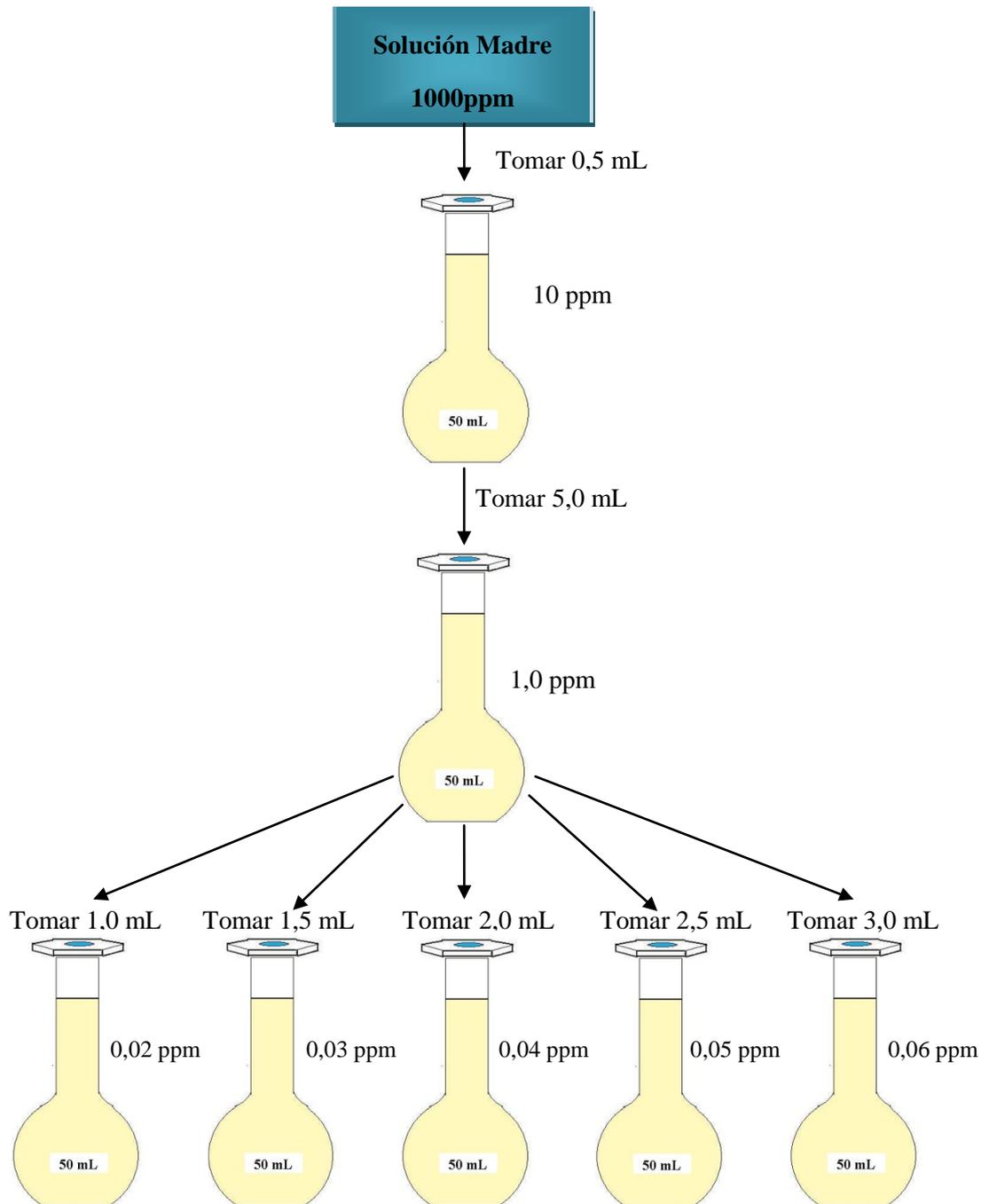
Tabla N° 27 Reporte de Datos de Adición de Estándares en muestras de agua de consumo

Agua de Consumo	Abs				mg/L	
A110203	-0.001	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000
	0.000	0.002	-0.001	0.000	0.000	0.000
	0.003	-0.002	0.001	0.000	0.000	0.000
	0.001	0.000	-0.002	0.000	0.000	0.000
	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
A 110203 + st 0,001mg/L	0.108	0.114	0.102	0.001	0.001	0.001
	0.115	0.117	0.109	0.001	0.001	0.001
	0.116	0.109	0.115	0.001	0.001	0.001
	0.103	0.115	0.103	0.001	0.001	0.001
	0.111	0.103	0.107	0.001	0.001	0.001

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

# ANEXO 5

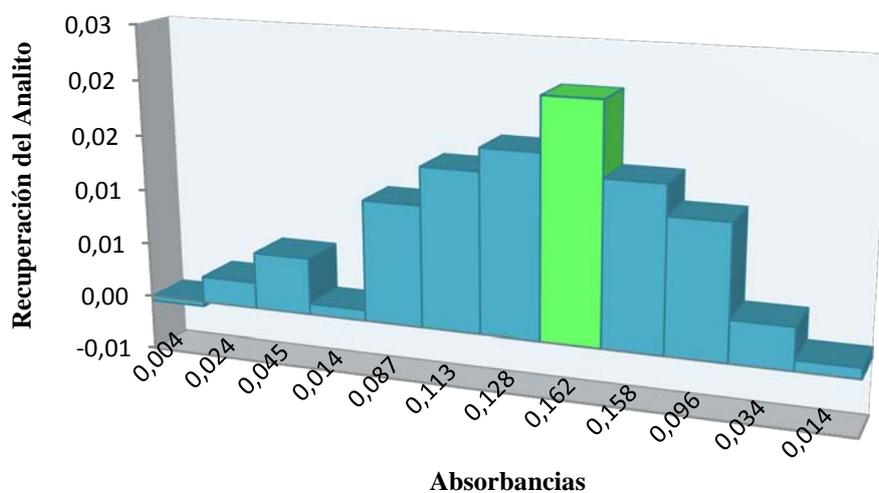
**Gráficos**



**Gráfico 1.** Esquema de la Preparación de Estándares de Calibración.

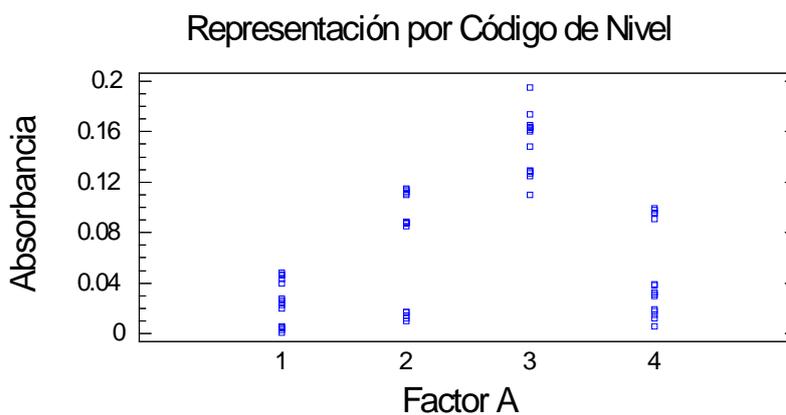
Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

### Condiciones Experimentales del Equipo GVF-AAS



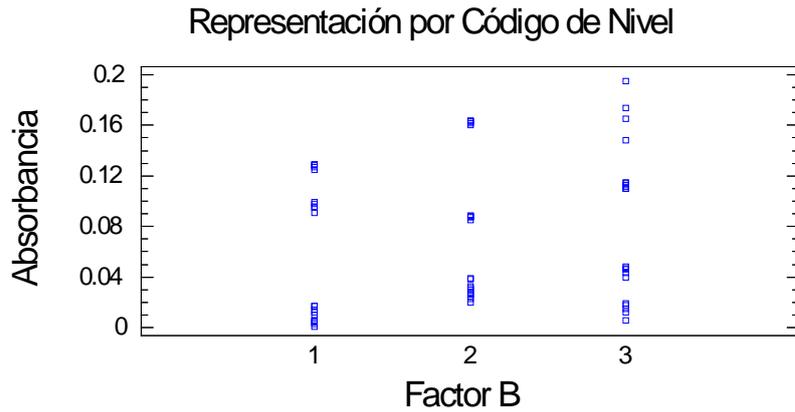
**Gráfico 2.** Condiciones de Operación del Equipo de Generación de Vapor Frío

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011



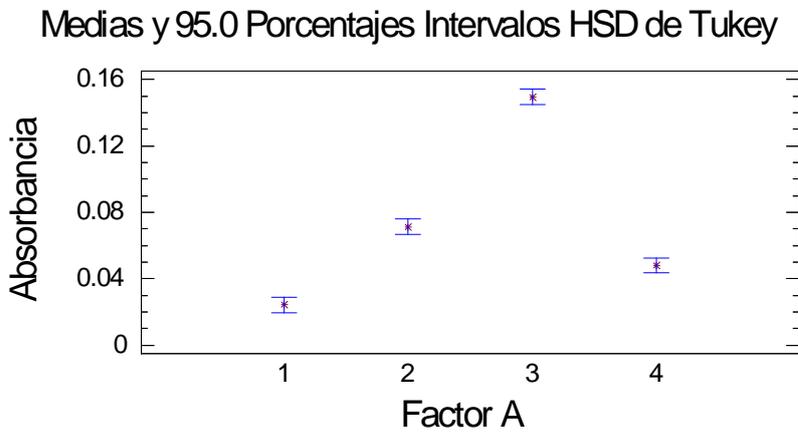
**Gráfico 3.** Representación grafica del Factor A en relación con los valores de absorbancia

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011



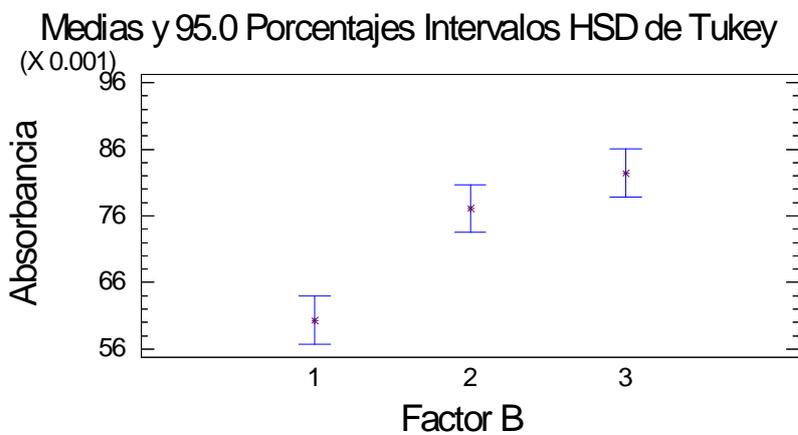
**Gráfico 4.** Representación grafica del Factor B en relación con los valores de absorbancia

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011



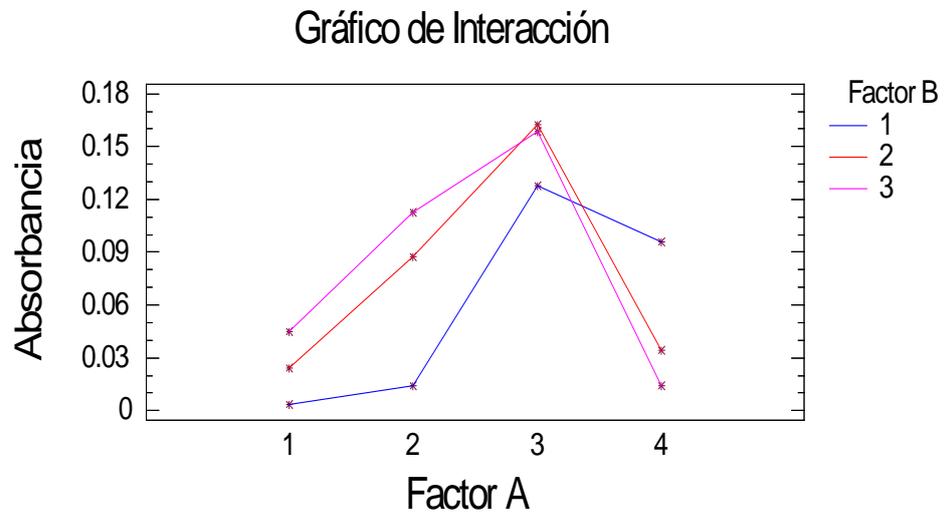
**Gráfico 5.** Representación del intervalo de la prueba de Tukey al 95% para el Factor A.

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011



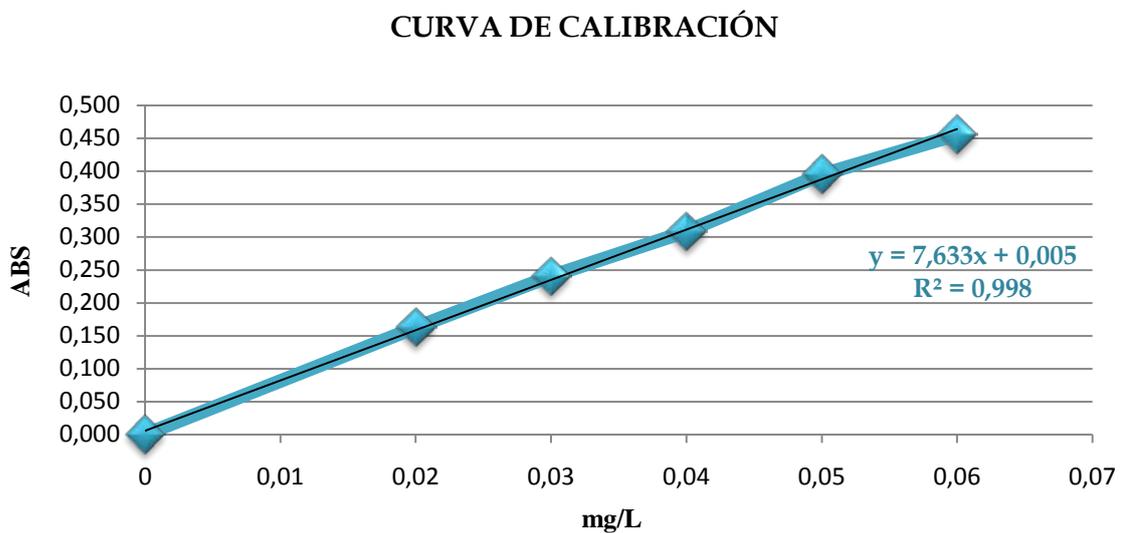
**Gráfico 6.** Representación del intervalo de la prueba de Tukey al 95% para el Factor B.

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011



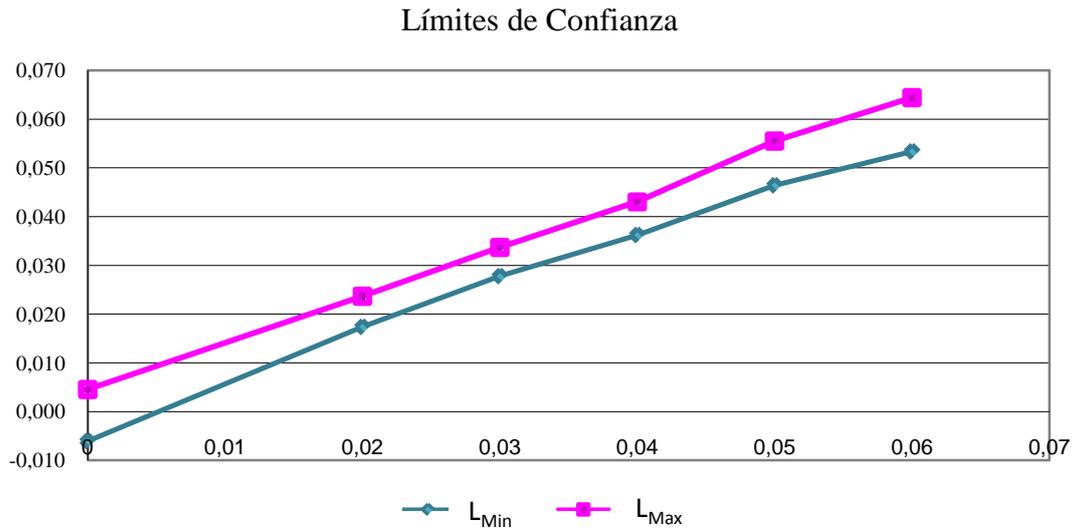
**Gráfico 7.** Comportamiento de la interacción de los Factores de estudio.

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011



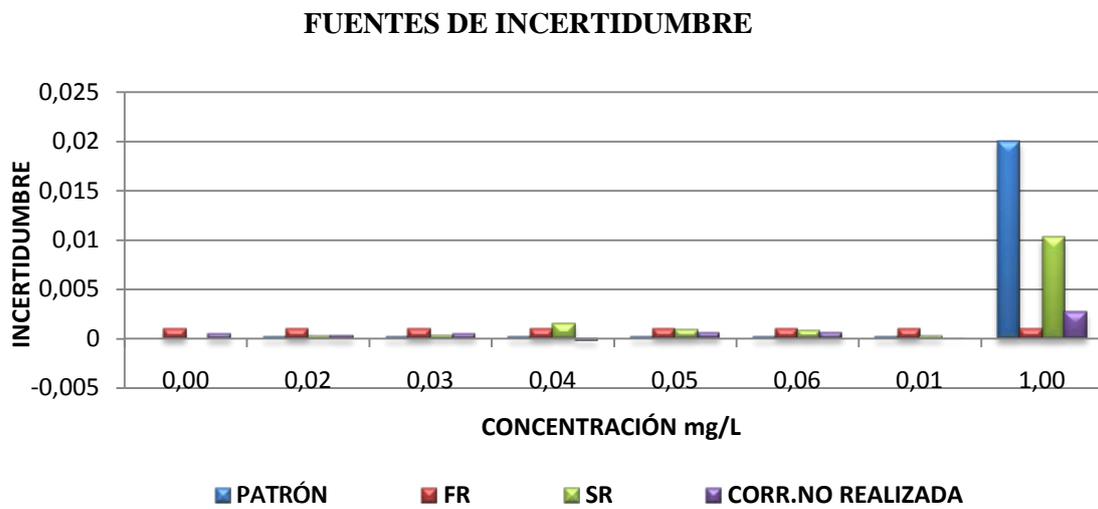
**Gráfico 8.** Curva de Calibración de Mercurio

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011



**Gráfico 9.** Determinación de los Límites de Confianza Máximos y Mínimos

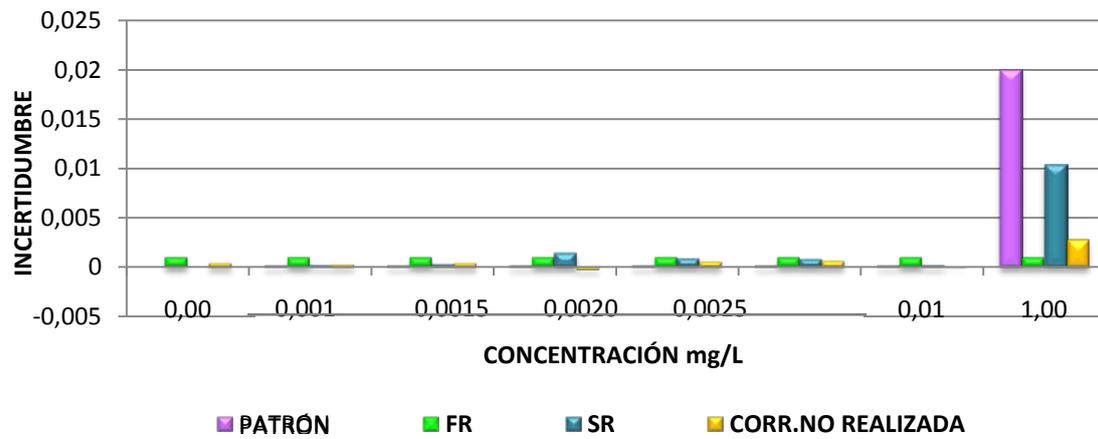
Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011



**Gráfico 10.** Determinación de las Fuentes de Incertidumbre en Estándares entre 0.02mg/L y 0.06mg/L y el Material de Referencia

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011

### FUENTES DE INCERTIDUMBRE



**Gráfico 11.** Determinación de las Fuentes de Incertidumbre en Estándares entre 0.001mg/L y 0.003mg/L y el Material de Referencia

Fuente: Elaborado por Alarcón Quinapanta, 2011