

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

TRABAJO DE DIPLOMA

Título: Determinación de Fe^{2+} y Fe total en muestras de
agua fluvial de la Empresa Electroquímica de Sagua
UEB Cloro – Sosa

Autor: Valdemar Barbas Marcos

Tutores: MSc Surey Ramírez González

MSc Juan Alberto Ribalta Quesada

Santa Clara

2018

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.

Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

Quiero dedicar la confección de este Trabajo de Diploma:

A mis padres María Antonia S.B. Marcos y Domingos Marcos. A ustedes, mi razón de ser les dedico este trabajo.

Quiero agradecer la confección de este Trabajo de Diploma:

A los tutores Surey Ramírez González y Juan Alberto Ribalta Quesada, por su dedicación y apoyo en el desarrollo de la tesis, por su sabiduría y paciencia y por sobre todas las cosas, por la disposición de atenderme en cualquier momento, sin tener en cuenta el día, la hora ni el lugar. En fin, gracias por confiar en mí.

A mis padres y hermanos por ser ellos mi motor impulsor, por su apoyo incondicional, por preocuparse y porque de una u otra manera contribuyeron al desarrollo de este trabajo.

A mi novia, por dedicarme todo su tiempo, su amor y su espacio, para que yo pudiera terminar satisfactoriamente la tesis. Por ser mi luz, mi guía y mi todo. Lisneyi, gracias por ser así de especial conmigo. Y gracias también por estar para mí. TE AMO.

A mi suegra Darkis, por regalarme un poco de su valioso tiempo, por su entrega, su preocupación y disposición de ayudarme en todo lo que me hacía falta.

A mi gran amiga Rosa Amalia, por todos sus consejos, por su incondicionalidad, por ser compañera y AMIGA, por todo el apoyo profesional y cotidiano. En fin, gracias por estar siempre que lo necesitaba y gracias por confiar en mí.

A mis amigos y mi familia en general y a todos los demás que de una u otra forma pusieron un granito de arena, tanto en este trabajo, como en mi superación profesional.

RESUMEN

En el presente trabajo se verificó la cuantificación de Fe^{2+} por el método de la o-fenantrolina mediante espectrofotometría UV-Vis. Para lo anterior se determinaron los límites de cuantificación y detección, se realizó un análisis de regresión y de precisión. Este último se realizó mediante la repetibilidad y la precisión intermedia. Como criterio de variabilidad de la precisión intermedia se empleó solamente los analistas. También se llevó a cabo un estudio de sesgos proporcional y constante para determinar la posible influencia de la matriz de muestra en los resultados analíticos. Se comprobó que los límites de cuantificación y detección son inferiores al valor mínimo de la concentración empleada en el análisis de regresión. Además se verificó que el método es lineal en el rango de concentración empleada y que cumple con los criterios estudiados de repetibilidad y precisión intermedia. Se demostró mediante la evaluación de sesgo proporcional que la relación molar Fe^{2+} /especies interferentes influyen en los resultados analíticos, los cuales deben por lo tanto ser rectificadas por el recobrado de consenso. También se comprobó, mediante el estudio de sesgo constante, que la cantidad de muestra no influye en los resultados analíticos. Finalmente se determinaron los contenidos de Fe^{2+} , Fe^{3+} y Fe total en el agua del río Sagua La Grande empleada en la Empresa Electroquímica de Sagua la Grande, siendo estos valores iguales a $0,09 \pm 0,01$ mg/L, $0,08 \pm 0,03$ mg/L y $0,17 \pm 0,02$ mg/L respectivamente.

Palabras claves:

Verificación, hierro, agua fluvial.

ABSTRACT

The present project verifies the quantification of Fe^{2+} using the method of o-phenantroline through spectrophotometry UV-Vis. For the above-mentioned the limits of quantification and detection were determined, a regression and precision analysis was carried out. The previous was carried out through repetition and intermediate precision. As criteria of variability of intermediate precision, only analysts were used. A study of proportional biases and constants was also carried out to determine the possible influence of the sample matrix in the analytic results. It was proven that the limits of quantification and detection are inferior to the minimum value of the concentration used in the regression analysis. It was also verified that the method is linear in the range of concentration used and that it complies with the criteria of repetition and intermediate precision studied. It was demonstrated through the evaluation of proportional bias that the molar relationship Fe^{2+} /inherent species influences in the analytic results, which should therefore be rectified by the recovering of consent. It was also proven through the study of constant bias that the quantity of sample does not influence in the analytic results. Finally, the contents of Fe^{2+} , Fe^{3+} and Fe total in the water of the Sagua La Grande river used. At the Electrochemical Company of Sagua La Grande were determined, these values being respectively equal to $0,09 \pm 0,01$ mg/L, $0,08 \pm 0,03$ mg/L and $0,17 \pm 0,02$ mg/L.

Key words:

Verification, iron, fluvial water

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	9
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
1.1. Electrólisis de salmueras empleando membranas de intercambio iónico	12
1.2. Descripción general del proceso de tratamiento del agua fluvial.....	15
1.3. Métodos analíticos utilizados para la determinación de hierro	16
1.4. Estabilidad de las entidades de coordinación de la o-fenantrolina con elementos de transición 19	
1.5. Fundamento del método de espectrofotometría Ultravioleta-Visible.....	20
1.6. Verificación de los métodos analíticos.....	21
1.7. Criterios de verificación aplicados al método implementado	23
1.7.1. Determinación de errores burdos	23
1.7.2. Análisis de regresión.....	25
1.7.3. Significación estadística de la regresión	26
1.7.4. Análisis de la pendiente y del intercepto	27
1.7.5. Prueba de falta de ajuste	29
1.7.6. Sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación.....	31
1.7.7. Exactitud	33
1.7.8. Sesgo	35
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
2.1. Equipos, reactivos y preparación de las disoluciones	39
2.2. Verificación del método de cuantificación de Fe^{2+} por el método de la o-fenantrolina	40
2.3. Determinación de Fe^{2+} y Fe total en muestras de agua fluvial	42
CAPÍTULO III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	44
3.1. Verificación del método de cuantificación de Fe^{2+} mediante espectrofotometría UV- Visible...44	
3.1.1. Linealidad	45
3.1.2. Límite de detección y límite de cuantificación.....	49
3.1.3. Análisis de la precisión para cuantificar los contenidos de Fe^{2+}	49
3.1.4. Sesgo.....	50
3.2. Determinación de las concentraciones de Fe^{2+} y Fe total	53
CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES.....	56

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	63

INTRODUCCIÓN

La industria es la actividad económica que emplea y transforma los recursos naturales en materias primas y fuentes de energía para fabricar productos semielaborados que se emplearán para fabricar otros productos, o productos elaborados listos para el consumo. En el mundo, las industrias fundamentales son la metalurgia, la industria de la construcción, la industria mecánica, la industria alimentaria y la industria química.

Actualmente la industria química es un importante sector industrial presente en la mayoría de los países, la cual dinamiza el crecimiento económico, genera empleos y ofrece diversidad de productos básicos producidos en grandes cantidades, los cuales son utilizados en varios sectores importantes como la agricultura, la medicina, entre otros. En Cuba esta rama de la economía, luego de décadas de recesión, comienza a recuperarse, especialmente luego de aprobados los Lineamientos de la Política Económica y Social del Partido y la Revolución, donde en su actualización para el período 2016 – 2021 el lineamiento 182 plantea que hay que “prestar atención prioritaria al impacto ambiental asociado al desarrollo industrial existente y proyectado, en particular, en las ramas de la química (...) incluyendo el fortalecimiento de los sistemas de control y monitoreo”. Por su parte el lineamiento 189 se refiere a “desarrollar las producciones químicas, priorizando la industria transformativa del plástico, las producciones de cloro, sal, fertilizantes y neumáticos...” (Partido Comunista de Cuba, 2017).

En la región central del país se destaca la Empresa Electroquímica de Sagua UEBCloro-Sosa ubicada en el municipio villaclareño Sagua la Grande. Esta constituye la única de su tipo en el país, con una línea de producción que comprende dicloro líquido, dihidrógeno gaseoso y disoluciones acuosas de hidróxido de sodio,

hipoclorito de sodio y ácido clorhídrico. El empleo de estas producciones está presente en la potabilización del agua, la perforación y extracción de petróleo, en la elaboración de jabones y detergentes, desinfectantes y otros artículos de alta demanda en el mercado nacional. Su actual desarrollo tecnológico se basa en la reconversión de la tecnología de celda de mercurio a celda de membrana de intercambio iónico (en lo adelante celda de membrana), la cual debe lograr una elevada eficiencia energética y mucho menor impacto ambiental, estando en correspondencia con las políticas del país para esta rama de la economía (Ney Cruz Hernández, 2017).

En las celdas de electrólisis con membrana debe tenerse presente que la dureza del agua afecta su rendimiento y la vida útil de la misma. Si el agua de aporte al compartimento del cátodo no se encuentra totalmente descalcificada, teniendo en cuenta las especies químicas que se encuentran en el agua fluvial (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , Fe^{2+} , Fe_{total} , Al^{3+} , SiO_2 , Mn^{2+} y Co^{2+}) en presencia de iones hidroxilo reaccionarán rápidamente y precipitarán como hidróxidos sobre el electrodo en la membrana e impedirán el paso de iones. Para poder garantizar una larga vida útil de los electrodos y de la membrana, es imprescindible que el contenido de iones del agua de aporte al compartimento del cátodo y de la salmuera (NaCl), de aporte al ánodo, sea prácticamente nula (Schmittinger et al., 2012).

La tecnología instalada en dicha empresa requiere la caracterización periódica y completa del agua fluvial, incluyendo la determinación de Fe^{2+} por el método de la o-fenantrolina. Para corroborar la veracidad de los resultados obtenidos esta empresa solicita al Centro de Estudios de Química Aplicada (CEQA), perteneciente a la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, y vinculada estrechamente con la

Empresa Electroquímica de Sagua UEB Cloro-Sosa, la realización de ensayos de comparación de las determinaciones realizadas. Dentro de estos se encuentra la cuantificación de los contenidos de Fe^{2+} en el agua fluvial procedente del río Sagua la Grande y empleada en los diferentes procesos de dicha empresa. Sin embargo, estatécnica no está implementada dentro de los servicios científico – técnicos y de caracterización químico – física de aguas que se realizan en el CEQA.

El desarrollo de este método analítico necesita de un estudio de verificación, el cual demuestre la adecuación de su funcionamiento al propósito deseado, proporcione un alto grado de confianza y seguridad en la calidad de los resultados obtenidos y compruebe estadísticamente que el método puede ser aplicado a un amplio número de muestras y matrices siendo pertinente con relación al costo y tiempo requeridos en el análisis (Huber, 2007).

Por lo tanto, para lograr lo anterior se definen los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar la calidad del agua fluvial empleada en la Empresa Electroquímica de Sagua UEB Cloro – Sosa en función de sus contenidos de Fe^{2+} , Fe^{3+} y Fe_{total} disueltos.

Objetivos específicos

- Evaluar mediante una verificación el desempeño del método de cuantificación de los contenidos de Fe^{2+} disuelto en agua fluvial del río Sagua la Grande mediante espectrometría ultravioleta visible con el empleo de la o-fenantrolina.

- Determinar los contenidos de Fe^{2+} , Fe^{3+} y Fe_{total} disueltos en muestras de agua fluvial del río Sagua la Grande y empleada en la Electroquímica de Sagua UEB Cloro-Sosa.

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Electrólisis de salmueras empleando membranas de intercambio iónico

A principio del año de 1970 se inició el desarrollo de las primeras membranas de intercambio iónico, introduciendo una nueva técnica para producir Cl_2 conocido como técnica de celdas de membrana. La primera planta industrial con celdas de membrana se instaló en Japón en 1975 y se llevó a gran escala a mediados de los años ochenta. Este hecho ocurrió debido a las descargas de aguas contaminadas con metilmercurio en la bahía de Minamata en la década de los 50, por lo que fueron modificadas las regulaciones ambientales causadas por la existencia de dicha enfermedad (Schmittinger et al., 2012).

Desde el año 1990 la técnica de celdas de membrana se considera la técnica más avanzada para la producción de Cl_2 gaseoso e NaOH en disolución. Las celdas de membrana actualmente están equipadas con ánodos de titanio recubiertos con una capa de $\text{RuO}_2/\text{TiO}_2$ y cátodos basados en níquel con una superficie modificada por una capa catalítica basada en níquel de alta superficie dopados con metales del grupo de platino (Paidar, Fateev y Bouzek, 2016).

La industria cloro-álcali es la base de aproximadamente el 55% de la industria química en los 27 países de la Unión Europea y en los países de la Asociación Europea de Libre Comercio. Estos países, Canadá, Estados Unidos y China (incluyendo Taipéi de China) concentran el 75 % de las capacidades mundiales de

producción de Cl_2 . Esta industria produce Cl_2 y disoluciones acuosas de NaOH o de KOH mediante la electrólisis de una solución salina (Brinkmann et al., 2014).

Las principales técnicas aplicadas en el mundo para la producción de Cl_2 son las celdas de mercurio, las de diafragma y las de membrana, en esta última se utiliza una salmuera como materia prima para la producción de Cl_2 y H_2 de altas purzas (Paidar, Fateev y Bouzek, 2016). Sin embargo, en el período de 1997 a 2012 el empleo de las celdas de membrana se quintuplicó con respecto a las otras dos tecnologías, debido fundamentalmente a que las celdas de membrana tienen la ventaja de producir una solución de NaOH más pura, consumen menos electricidad que el resto de los procesos y son más compatibles con el medioambiente, pues no utilizan materiales tóxicos como el mercurio y el amianto (Brinkmann et al., 2014).

Mediante el empleo de membranas de intercambio iónico para la producción de Cl_2 a partir de una salmuera, se producen compuestos con diversas aplicaciones en diferentes ramas de la economía. El Cl_2 es ampliamente utilizado en la obtención de isocianatos y oxigenatos (30,3 %), disolventes (2,9 %), epicloridrina (5,2 %), clorometanos (4,6%), PVC (33,3 %), desinfectantes, tratamiento de agua y pigmentos de pinturas (14,3 %) y otras sustancias orgánicas, tales como detergentes, pinturas, lubricantes, herbicidas e insecticidas (9,3 %). Por su parte la producción de NaOH en disolución es proporcional a la de Cl_2 . Lo mismo sucede con el KOH en disolución y con el H_2 .

La obtención industrial de estos productos comprende una serie de operaciones, típicamente estructuradas. En la técnica de celdas de membrana, el ánodo y el cátodo están separados por una membrana de intercambio catiónico perfluorada selectiva a

los iones Na^+ y a una pequeña fracción de H_2O . La solución de salmuera fluye a través del compartimiento anódico, donde los iones Cl^- son oxidados a Cl_2 . Los iones Na^+ , junto con aproximadamente 3,5 a 4,5 moles de H_2O por mol de iones Na^+ , migran a través de la membrana al compartimiento del cátodo, la cual contiene una solución de NaOH . El H_2O se electroliza en el cátodo liberando el gas H_2 y formándose iones OH^- . Los iones Na^+ e OH^- reaccionan para producir NaOH , el cual típicamente se mantiene a $32 \pm 1\%$ en masa en la celda mediante la dilución de una parte del producto con agua desmineralizada y su posterior reciclado a la entrada del cátodo (Schmittinger et al., 2012).

El principal inconveniente de las celdas de membrana de intercambio iónico es que la salmuera requiere de un procedimiento de purificación exhaustivo para evitar una rápida disminución de la vida de los ánodos y las membranas (Brinkmann et al., 2014).

La introducción de la tecnología de membrana en la industria cloro-álcali ha provocado un aumento dramático en las exigencias sobre la pureza de la salmuera y el agua empleada en su preparación. Los rendimientos a largo plazo de las celdas de membranas de intercambio iónico dependen de las impurezas que estén en la salmuera que entra en el ánodo y el agua del aporte al cátodo, si esta se mantiene dentro de los límites recomendados aumenta la vida útil de la membrana, ya que cuanto mayor es la impureza menor será el rendimiento de la membrana. Una fuente importante de disminución del rendimiento es la acumulación de material sólido en la membrana. Los niveles de impurezas específicos dependen del diseño de la membrana, del diseño de la celda, de las condiciones de operaciones, de la naturaleza

de la impureza en sí y de la presencia de otras impurezas. El requisito previo para una larga vida de la membrana es mantener bajos niveles de iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Al^{3+} , Fe^{2+} y otros en el agua con la cual se prepara la salmuera y se alimentan los electrolizadores. Los iones Fe^{3+} provienen de la sal empleada en la fabricación de la salmuera, además de las tuberías, de los materiales de los tanques y de los agentes empleados para evitar las incrustaciones en el sistema. La concentración de Fe^{3+} no debe exceder de 0,1 ppm, debido que a mayores concentraciones pueden afectar el desempeño de la membrana por su deposición sobre el cátodo, precipitación como óxido hidratado en el ánodo o en la membrana (dependiendo del pH de la salmuera) y en casos extremos, existe crecimiento dendrítico desde el cátodo hacia el ánodo. Los efectos negativos que este ion puede provocar se controlan con la precipitación con NaOH (Brinkmann et al., 2014; Schmittinger et al., 2012).

1.2. Descripción general del proceso de tratamiento del agua fluvial

Los procedimientos para el tratamiento del agua fluvial y para la obtención del agua desmineralizada en la Empresa Electroquímica de Sagua UEB Cloro-Sosa es el establecido por la empresa Chriwa Wasseraufbereitungstechnik GmbH (Chriwa Wasseraufbereitungstechnik GmbH, 2016a; Chriwa Wasseraufbereitungstechnik GmbH, 2016b). La Empresa Electroquímica de Sagua UEB Cloro-Sosa utiliza el agua fluvial que proviene del río Sagua la Grande, la cual es almacenada en un tanque elevado. De esta fluye por gravedad por una tubería hacia la unidad de agua cruda donde es tratada en un proceso de floculación y sedimentación para eliminar los materiales no disueltos y coloidales. Antes de la cámara de mezcla rápida se dosifica FeCl_3 para desestabilizar los componentes del agua y convertirlos en sólidos

sedimentables. A continuación, se dosifica NaOH para ajustar el pH. Las partículas finas son aglomeradas y precipitadas añadiendo, de ser necesario, una solución de polielectrolito, los flóculos formados son eliminados en un sedimentador, mientras que el agua clarificada fluye hacia la cámara de agua clara. Desde allí el agua es enviada hacia los filtros de arena para eliminar posibles sólidos remanentes del sedimentador.

El agua filtrada es almacenada y suministrada por bombas hacia la unidad de agua desmineralizada, a las torres de enfriamiento y a la red de agua de servicio.

La planta de desmineralización suministra agua desmineralizada para las unidades de proceso y para las calderas de vapor. El agua desmineralizada se prepara a partir del agua de río pretratada y se desmineraliza por medio de resinas de intercambio iónico.

1.3. Métodos analíticos utilizados para la determinación de hierro

La tecnología de celda de membrana instalada en la Empresa Electroquímica de SaguaUEB Cloro – Sosa necesita de una caracterización asidua y completa del agua fluvial, incluyendo la determinación de Fe^{2+} , con el objetivo de lograr una buena práctica operativa. La necesidad del análisis y especiación del hierro es crucial para conocer de manera certera los niveles de este elemento en las aguas que se emplean en esta empresa.

Dentro de las metodologías existentes para la determinación de Fe^{2+} y Fe^{3+} se encuentran la espectrofotometría de absorción atómica. Esta es una metodología sencilla que requiere instrumentación relativamente económica, muy versátil y con un excelente poder de detección, pero no permite la especiación ya que determina el contenido de hierro total.

Otro método empleado para la determinación de Fe^{2+} es por valoración con el ácido etilendiaminotetraacético (H_4EDTA). En este procedimiento se determinan las concentraciones de Fe^{3+} por la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} empleando un $\text{pH} = 1$ o menor, posteriormente se valora la muestra con una solución estándar de H_4EDTA en presencia de ácido salicílico como indicador.

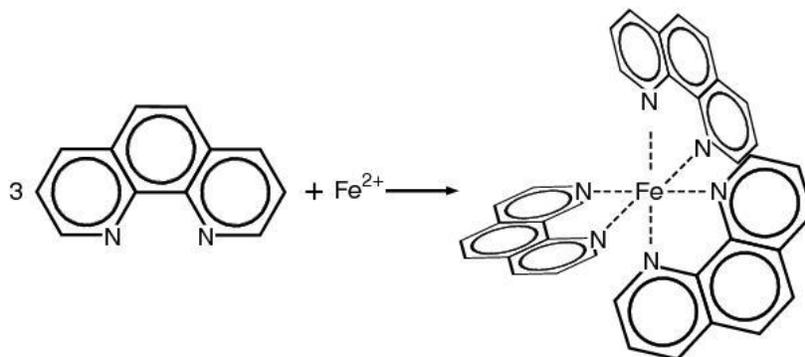
Además de los procedimientos anteriores se puede determinar el contenido de hierro en forma de Fe_2O_3 mediante el método gravimétrico. Esta determinación se basa en precipitar todo el hierro en forma de óxido hidratado. Como reactivo precipitante se emplea una disolución diluida de NH_3 y como medio de filtración se emplea papel de filtro. Como líquido de lavado se emplea una disolución acuosa de NH_4NO_3 . La calcinación se realiza a temperaturas comprendidas entre 800 y 1000°C , obteniendo Fe_2O_3 como producto (Harvey, 2000).

Otra de las formas de cuantificar el Fe^{2+} es por volumetría haciendo uso de agentes oxidantes fuertes como son el dicromato de potasio y el permanganato de potasio (Harvey, 2000).

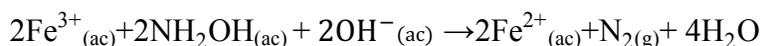
Finalmente, otra de las metodologías existentes es el método de la 1,10-fenantrolina (o-fenantrolina). Este método se basa en la reacción de ion Fe^{2+} con la o-fenantrolina para formar una entidad de coordinación de color rojo – naranja, la cual presenta su absorbancia máxima de luz a una longitud de onda de 510 nm , siendo este compuesto de coordinación un quelato de tres moléculas de o-fenantrolina por cada átomo de Fe^{2+} .

La o-fenantrolina (Ph) es una base débil y en disolución ácida la principal especie es el ion fenantrolinio, PhH^+ (Lahiri y Aditya, 1964).

La reacción de formación de las entidades de coordinación se describe según la ecuación:



Según el procedimiento establecido en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, previo al acomplejamiento del Fe^{2+} con la o-fenantrolina, las muestras a analizar deben ser tratadas con un reductor para asegurar que todo el Fe^{3+} se encuentre como ion Fe^{2+} . Para ello se puede emplear un exceso de clorhidrato de hidroxilamina en disolución (Lazić et al., 2010; Eaton, 2005):



La formación cuantitativa de la entidad de coordinación se observa en el intervalo de pH entre 2 y 9 (Anghel et al., 2011; Lazić et al., 2010). La solución coloreada obedece a la ley de Bouguer–Lambert–Beery la concentración es determinada espectrofotométricamente o por comparación visual.

Se recomienda un pH próximo a 4 para evitar la precipitación de diversas sales de Fe^{2+} y Fe^{3+} . Una vez formada, la entidad de coordinación es estable durante largos períodos de tiempo y se debe esperar diez minutos para que se desarrolle la

máximaintensidad de color antes de realizar la medición de la absorbancia. La lectura de laabsorbancia se realiza en el intervalo de 500 a 520 nm(Eaton, 2005).

Como interferencias en este método se encuentran los iones CN^- , NO_2^- y PO_4^{3-} (especialmente los polifosfatos), Cr^{3+} , Zn^{2+} en concentración 10 veces superior a la del Fe^{2+} presente en la muestra, en el caso del Co^{2+} y Cu^{2+} en concentración superior a 5 mg/L y Ni^{2+} en concentración mayor a 2 mg/L. El Bi^{3+} , el Cd^{2+} , el Hg^{2+} , el catión Mo^{3+} y la Ag^+ precipitan con la o-fenantrolina. La ebullición inicial en medio ácido convierte los polifosfatos en ortofosfatos y elimina los cianuros y nitritos que de lo contrario interferirían(Eaton, 2005).

1.4. Estabilidad de las entidades de coordinaciónde la o-fenantrolina con elementos de transición

Las entidades de coordinaciónformadas porla o-fenantrolina con Fe^{2+} , Cu^+ , Ru^{2+} y Os^{2+} son intensamente coloreadas. Se cree que el origen del color es un proceso de transferencia de carga con el ligando. Las entidades de coordinaciónde metales con estados de oxidación excepcionalmente bajos son intensamente coloreadas. Se cree que la unión de este ligando a iones de metales de transición implica cierta interacción entre los electrones en orbitales d del metal con los orbitales desocupados π^* del ligando. Esto en gran medida aumenta para la entidad de coordinación formada con Fe^{2+} la cual resulta ser de inusualmente alta estabilidad. Se considera que la extensión de la interacción $d\pi-\pi^*$ es mayor en las entidades de coordinación en las que el estado de oxidación del metal es inusualmente bajo(McBryde, 1978). No obstante, el cambio de configuración electrónica que ocurre cuando la tercera

molécula de la o-fenantrolina se enlaza al ion Fe^{2+} (lo cual se explica según la Teoría del Campo de los Ligandos) es la causa directa de la alta estabilidad de esta entidad de coordinación (Irving y Mellor, 1962).

El color intenso de algunas de estas entidades de coordinación, junto con sus estabilidades características, ha dado lugar a una serie de aplicaciones en química analítica como reactivos colorimétricos para un número limitado de metales, como indicadores redox, entre otras (McBryde, 1978).

1.5. Fundamento del método de espectrofotometría Ultravioleta-Visible

La espectrofotometría ultravioleta-visible es una técnica de absorción molecular y fue uno de los primeros métodos físicos que se aplicaron al análisis cuantitativo y a la determinación de estructuras moleculares.

Tanto la radiación ultravioleta como la visible se caracterizan porque al ser absorbidas por la materia provocan la excitación de los electrones más energéticos a niveles de energía superiores. Los electrones que contribuyen a los enlaces, fuertemente atraídos por los núcleos de los átomos enlazados, requieren mayor energía (λ más cortas), mientras que los no compartidos se excitan con más baja energía.

Las radiaciones electromagnéticas correspondientes a las regiones ultravioleta y visible aportan la energía suficiente para que tengan lugar transiciones electrónicas entre orbitales $\sigma \rightarrow \sigma^*$; $n \rightarrow \sigma^*$; $\pi \rightarrow \pi^*$; $n \rightarrow \pi^*$, transferencia de cargas y, por último, de campos de ligandos.

Por otra parte, la intensidad de absorción en cada una de estas transiciones depende de la absorptividad molar, ϵ , que está en función del tamaño de la especie absorbente y de la probabilidad de transición.

El espectrofotómetro es un equipo empleado en la medición de la radiación electromagnética ultravioleta y visible absorbida por parte de una especie. Este dispone de un monocromador para hacer una selección más exacta y continua de la longitud de onda, lo que permite hacer un barrido en una zona amplia de longitudes de onda, asimismo, el sistema de detección está constituido por un fototubo o fotomultiplicador de mayor sensibilidad. Los componentes básicos de un espectrofotómetro son la fuente de energía radiante, el monocromador para aislar una banda estrecha de longitudes de onda y un detector que mide la energía radiante transmitida a través de la muestra. El espectrofotómetro se completa con un recipiente transparente para colocar las muestras, un sistema óptico de orientación de la radiación asociado al monocromador y un sistema de lectura que traduce la respuesta del detector.

El proceso analítico consiste primeramente en la elección de la longitud de onda que corresponde al máximo de absorción selectivo por parte de la muestra (Sommer, 1989).

1.6. Verificación de los métodos analíticos

Validar un método es básicamente el proceso para definir un requisito analítico y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas. La validación de métodos es un requisito importante en la práctica de los análisis químicos, proporciona un alto grado de confianza y seguridad en el método

analítico y en la calidad de los resultados, lo que se traduce en una disminución del número de fallos y repeticiones, con el consiguiente ahorro de los gastos asociados, permite un conocimiento profundo de las características de funcionamiento del método analítico y hace posible el cumplimiento de las exigencias legales. Además establece pruebas documentales que aportan un alto grado de seguridad, de que un proceso planificado se efectúa en conformidad con los resultados previstos (Morillas P. P. et al., 2016).

La norma DIN EN ISO 9000:2005 "Quality management systems – Fundamentals and vocabulary (ISO 9000:2005); Trilingual version EN ISO 9000:2005" define verificación como "confirmación, a través de la aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos especificados".

Un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. Por ejemplo, en el laboratorio deben validarse:

- métodos no normalizados
- métodos diseñados/desarrollados por el laboratorio
- métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación
- ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados

La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para cumplir con los requisitos en relación con la aplicación. También debe validarse cuando es necesario demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos por dos métodos, por ejemplo, un método recientemente desarrollado y un método normalizado existente.

Para los métodos normalizados, tales como los publicados, por ejemplo, ISO o ASTM, no es necesario validar el método utilizado por el laboratorio. Sin embargo, el laboratorio necesita verificar el desempeño del método.

También es necesaria la verificación cuando hay cambios importantes, como el uso de un equipo nuevo (pero similar), traslado de equipos, etc.

Un laboratorio puede adoptar un procedimiento validado que, por ejemplo, ha sido publicado como una norma, o adquirir un sistema de medidas completo y emplearlo para una aplicación específica a partir de un desarrollo comercial. En ambos casos el trabajo de validación básica se ha realizado, pero el laboratorio debe confirmar su capacidad para aplicar el método, esto es lo que se conoce como verificación.

1.7. Criterios de verificación aplicados al método implementado

1.7.1. Determinación de errores burdos

Los químicos analistas y realmente todos los investigadores involucrados en estudios cuantitativos, conocen que es usualmente necesario hacer mediciones replicadas para caracterizar las variaciones al azar que inevitablemente ocurren. También se conoce que cuando tales replicados se llevan a cabo, es común hallar que uno o más de los resultados parecen no ser similar al resto. El tratamiento adecuado de tales valores sospechosos es un área de gran importancia (Analytical Methods Committee AMCTB No 39, 2009).

Un error burdo se puede definir como una observación en un conjunto de datos que parece ser inconsistente de ese conjunto de datos. Una de las estrategias para minimizar el efecto de los errores burdos es tratar de identificarlos y distinguirlos de cualquier variación casual, permitiendo al analista inspeccionar los datos sospechosos

y si es necesario, corregir o remover los valores erróneos (Ellison, Barwick y Farrant, 2009).

Existen varias pruebas para comprobar la presencia o no de errores burdos, siendo las más comúnmente empleadas, y además recomendadas por las normas ISO y por la IUPAC, la prueba de Dixon, la de Grubbs y la de Cochran (Ellison, Barwick y Farrant, 2009; Analytical Methods Committee, AMCTB No. 69, 2015; International Organization for Standardization, 1994; Horwitz, 1995). Para mediciones replicadas las mejores pruebas reconocidas son la de Dixon y la de Grubbs (Analytical Methods Committee AMCTB No 39, 2009).

Tres pruebas para detectar errores burdos en una distribución normal fueron desarrolladas y extendidas por F. E. Grubbs (Ellison, Barwick y Farrant, 2009). Todos usan estadísticas basadas en las desviaciones estándar. La primera de estas es una prueba para un solo valor errático. La segunda prueba es para un par de valores erróneos a extremos opuestos del conjunto de datos y la tercera busca valores erráticos sobre el mismo extremo de conjunto de datos (Ellison, Barwick y Farrant, 2009; Analytical Methods Committee, AMCTB No. 69, 2015).

En este trabajo se emplea la primera prueba de Grubbs. Para esta se calculan dos estadígrafos: G'_{\min} y G'_{\max} .

$$G'_{\min} = \frac{X_{\text{prom}} - X_1}{S}$$

$$G'_{\max} = \frac{X_n - X_{\text{prom}}}{S}$$

Donde:

X_{prom} : es el valor promedio de los valores replicados

X_1 : es el valor mínimo de los valores replicados

X_n : es el valor máximo de los valores replicados

S: es la desviación estándar de los valores replicados

Si G'_{\min} y/o G'_{\max} exceden el valor crítico para un determinado nivel de confianza (usualmente 95 %) los valores probados se consideran errores burdos.

1.7.2. Análisis de regresión

La función respuesta curva de calibración de un método analítico es, dentro del rango, una relación monótonica entre la señal analítica (respuesta) y la concentración del analito. La función respuesta puede ser lineal, pero modelos no – lineales son también observados. La función respuesta se obtiene usando estándares de calibración preparados en ausencia de la muestra matriz y relacionando la respuesta con la concentración (González y Herrador, 2007).

Existen varias definiciones en relación con la linealidad. Sin embargo, la definición de linealidad se puede resumir como la capacidad del método para obtener resultados de ensayos que son directamente proporcionales a la concentración del analito en un rango dado (Sanagi et al., 2010).

Diferentes funciones respuesta se pueden considerar durante la validación/verificación de un método. La selección depende del tipo de método. Muy probablemente la mayoría de los métodos físico-químicos emplean una línea recta (la cual pase por cero o no) (Hubert et al., 2007). El modelo más simple es el lineal, muy a menudo hallado en la metodología analítica, conduciendo a predicciones de las respuestas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_i$$

Donde:

Y_i : es el valor observado de la respuesta

X_i : es la concentración del analito

β_0 y β_1 : son el intercepto y la pendiente respectivamente

Para hallar los mejores valores estimados de los parámetros de regresión β_0 y β_1 se emplea el método de los mínimos cuadrados, en el cual se considera la siguiente expresión matemática: $Q = \sum_{i=1}^n (Y_i - \beta_0 - \beta_1 \cdot X_i)^2$. De acuerdo a este método los estimadores de β_0 y β_1 son aquellos valores de b_0 y b_1 , que minimizan el criterio Q para las observaciones dadas (Kutner et al., 2005). El método de los mínimos cuadrados asume que las observaciones Y para cada X son independientes, están normalmente distribuidos y que las distribuciones de Y tienen la misma varianza (σ^2) (Kutner et al., 2005; British Standard Institute, 1996; Miller y Miller, 2010; Massart et al., 1997).

1.7.3. Significación estadística de la regresión

Un método común para estimar cuán bien los puntos experimentales se ajustan a una línea recta es calcular el coeficiente de correlación producto – momento, comúnmente conocido como coeficiente de correlación. La expresión matemática para calcular este coeficiente se puede encontrar en cualquier parte (Miller y Miller, 2010; Kutner et al., 2005; Ellison, Barwick y Farrant, 2009) .

Los coeficientes de correlación son muy simples de calcular y muy fácilmente mal interpretados, ya que un valor cercano a 1 de este coeficiente no asegura un

comportamiento lineal (Analytical Methods Committee, 1988; Miller y Miller, 2010; Jurado et al., 2017; Sanagi et al., 2010).

A menudo es necesario emplear una prueba estadística para comprobar si el coeficiente de correlación es significativo, considerando el número de puntos empleados en el cálculo. El método más simple es calcular un valor de la t de Student usando la siguiente ecuación:

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Donde:

t: es la t de Student

n: es el número de puntos empleados para calcular el coeficiente de correlación

El valor calculado de la t de Student es comparado con el valor tabulado al nivel de confianza deseado (usualmente 95 %), usando una prueba de dos colas para n-2 grados de libertad (Miller y Miller, 2010).

1.7.4. Análisis de la pendiente y del intercepto

La línea recta obtenida por aplicación del método de los mínimos cuadrados contiene dos parámetros: *b* (pendiente de la línea recta obtenida por el método de los mínimos cuadrados y *a* (intercepto de la línea recta obtenida por el método de los mínimos cuadrados) (Miller y Miller, 2010; Kutner et al., 2005). Las expresiones matemáticas para calcular estos parámetros se pueden encontrar en diversas bibliografías (Ellison, Barwick y Farrant, 2009; Miller y Miller, 2010).

Usualmente los softwares comerciales que permiten hacer análisis de regresión dan comouno de sus resultados una tabla ANOVA para el intercepto y la pendiente. A partir de esta tabla se pueden utilizar los valores de los estadígrafos t de Student y el valor p relacionado para comparar si la pendiente y el intercepto son significativamente diferentes de cero. En un experimento de calibración la pendiente debe ser diferente de cero ya que es esencial que los valores de las respuestas y la concentración deben estar altamente correlacionados. Para un 95 % de confianza, el valor p debe ser muy pequeño ($\alpha < 0,05$) y el valor de la t de Student experimental debe ser mucho mayor que el valor crítico. Si el intercepto no es significativamente diferente de cero, el valor de la t Student experimental debe ser menor que el valor crítico y el valor p será mucho mayor que el valor de significación esperado (usualmente $\alpha = 0,05$). Además, la significación estadística del intercepto se puede determinar inspeccionando el intervalo de confianza del intercepto. Si este contiene el 0 entonces el intercepto no es significativamente diferente de cero (Ellison, Barwick y Farrant, 2009).

Los intervalos de confianza para los estimados de la pendiente y el intercepto se calculan a través de las siguientes ecuaciones matemáticas(Ellison, Barwick y Farrant, 2009; Miller y Miller, 2010):

$$b \pm t \cdot S_b$$

$$a \pm t \cdot S_a$$

Donde:

a y b: son el intercepto y la pendiente respectivamente

Sa y Sb: son las desviaciones estándar para los estimados del intercepto y la pendiente respectivamente

t: es el valor de la t de Student de dos colas al nivel de significación requerido (típicamente $\alpha = 0,05$) y con n-2 grados de libertad, siendo n el número de observaciones

1.7.5. Prueba de falta de ajuste

A partir de la construcción de una curva de regresión ajustada o de calibración se puede verificar si la calibración cumple con los parámetros de linealidad (Kutner et al., 2005). Un número de pruebas estadísticas tales como *Fratio* (IUPAC), falta de ajuste (LOF, lack-of-fit), la prueba de Mandel y la significación del término cuadrático se han propuesto para chequear si existe linealidad en una curva de calibración externa (Jurado et al., 2017). El método más comúnmente empleado y recomendado por la normas ISO es la prueba de falta de ajuste (British Standard Institute, 1996; Kutner et al., 2005; González y Herrador, 2007; Sanagi et al., 2010).

Para llevar a cabo la prueba de falta de ajuste, la variabilidad total de las respuestas se descompone en la suma de cuadrados debido a la regresión y la suma de cuadrados de los residuales. La suma de cuadrados de los residuales se divide en la falta de ajuste (desviación de la linealidad) y la suma de cuadrados del error puro (a partir de los puntos repetidos). Esta técnica ha sido extensivamente descrita (British Standard Institute, 1996; Kutner et al., 2005; González y Herrador, 2007). La suma de cuadrados total de las desviaciones de y_{ij} del promedio se denomina SS_{total} y se descompone en tres sumas de cuadrados: debido a la regresión (reg), debido la falta

de ajuste (LOF, por sus siglas en inglés) y debido al error puro (pe, por sus siglas en inglés):

$$SS_{total} = SS_{reg} + SS_{res}$$

donde,

$$SS_{res} = SS_{lof} + SS_{pe}$$

así, finalmente,

$$SS_{total} = SS_{reg} + SS_{res} + SS_{pe}$$

El estadígrafo para comprobar la falta de ajuste se calcula como:

$$F^* = \frac{\frac{SS_{lof}}{c-2}}{\frac{SS_{pe}}{n-c}} = \frac{MSS_{lof}}{MSS_{pe}}$$

Donde:

MSS_{lof} : cuadrado medio de la falta de ajuste (siglas en inglés)

MSS_{pe} : cuadrado medio del error puro (siglas en inglés)

n: es el número total de observaciones

c: es el número de niveles de concentraciones

El estadígrafo F^* se compara con el valor crítico $F_{crit}(1 - \alpha; c - 2, n - c)$. Si $F^* \leq F_{crit}$ se concluye entonces que la regresión es lineal (Kutner et al., 2005). A este tipo de linealidad se denomina linealidad "in-line" (Rodríguez, Campaña y Sendra, 1996; González y Herrador, 2007).

Dentro del reino de los modelos lineales algunos autores consideran dos características: la linealidad "in-line" y la linealidad "on-line" (Rodríguez, Campaña y Sendra, 1996). La linealidad "in-line" se refiere a la linealidad del modelo evaluado por la falta de ajuste (presencia de curvatura) y la linealidad "on-line" se refiere a la

dispersión de los datos alrededor de la línea de calibración y se basa en la desviación estándar relativa de la pendiente:

$$RSD_b = \frac{S_b}{b}$$

donde:

RSD_b : es la desviación estándar relativa de la pendiente (siglas en inglés)

S_b : es la desviación estándar de la pendiente

b : es el valor de la pendiente obtenida por el método de los mínimos cuadrados

Este valor se toma como otro parámetro característico de desempeño y depende del valor máximo aceptado para RSD_b tal que un umbral típico puede ser $RSD_b \leq 5\%$ (González y Herrador, 2007).

1.7.6. Sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación

La sensibilidad es el cambio en la respuesta analítica dividido por el correspondiente cambio en la concentración del analito (González y Herrador, 2007; Tissue, 2015; Potts, 1997), es decir, a un valor dado de la concentración del analito Z_0 :

$$\text{Sensibilidad} = \left(\frac{dY}{dZ} \right)_{Z_0}$$

Si la calibración es lineal, la sensibilidad es justamente la pendiente (González y Herrador, 2007; Tissue, 2015; Barwick y Prichard, 2011).

El límite de detección es la concentración más baja de analito que puede ser detectada y confiablemente distinguida de cero (o del nivel del ruido del sistema), pero no necesariamente cuantificado. El límite de cuantificación es la concentración más baja de analito que puede ser determinada cuantitativamente con un nivel aceptable de precisión (Tissue, 2015; González y Herrador, 2007; Potts, 1997; Shrivastava y Gupta,

2011). Los límites de detección y de cuantificación se obtienen midiendo al menos 10 blancos de muestra.

El límite de detección en unidades de señal analítica se estima comúnmente usando la siguiente expresión: $Y_{LOD} = Y_{Blanco} + 3S_{blanco}$

donde:

Y_{LOD} : es el valor de la señal analítica correspondiente al límite de detección (siglas en inglés)

Y_{Blanco} : es el valor de la señal analítica correspondiente a los blancos de muestras

S_{blanco} : desviación estándar de las muestras de los blancos de muestras

El procedimiento para expresar el límite de cuantificación en unidades de la señal analítica es equivalente al del límite de detección, pero usando un factor de 10 en lugar de 3. Estos límites se pueden expresar en unidades de la señal analítica en cuestión, pero expresado de esta manera son difíciles de manipular (González y Herrador, 2007). Los límites de cuantificación y de detección son mejor expresados en términos de la concentración del analito empleando la función de calibración (González y Herrador, 2007; Shrivastava y Gupta, 2011):

$$Z_{LOD} = \frac{Y_{LOD} - a}{b}$$

donde:

Z_{LOD} : es la concentración del analito correspondiente al límite de detección (siglas en inglés)

a y b: son el intercepto y la pendiente de la línea recta obtenidos por el método de los mínimos cuadrados.

Entonces, el valor del límite de detección, considerando intercepto cero, es (González y Herrador, 2007; Shrivastava y Gupta, 2011):

$$Z_{LOD} = \frac{3S_{Blanco}}{b}$$

Para expresar el límite de cuantificación en unidades de concentración se utiliza una expresión matemática equivalente a la del límite de detección, pero usando un factor de 10 en lugar de 3 (González y Herrador, 2007; Shrivastava y Gupta, 2011).

1.7.7. Exactitud

La exactitud es una entidad con dos componentes (veracidad y precisión) pero considerada como una entidad global (Morillas P. P. et. al., 2016; The Irish National Accreditation Board, 2016; González y Herrador, 2007). Un estudio de exactitud involucra la determinación de la veracidad, la precisión y la robustez, así como la estimación de la incertidumbre de la medición y de los perfiles de exactitud (González y Herrador, 2007).

La precisión se puede considerar a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetibilidad expresa la precisión evaluada bajo las mismas condiciones experimentales sobre un corto periodo de tiempo. La precisión intermedia se aplica a variaciones dentro de un mismo laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipamientos etc. La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios como en los estudios colaborativos (González, Herrador y Asuero, 2010).

En este trabajo solo se realiza un estudio de repetibilidad y precisión intermedia, esta última solo considerando como variable independiente los analistas.

La reproducibilidad intralaboratorio o precisión intermedia se puede determinar como (González, Herrador y Asuero, 2010; González y Herrador, 2007; Analytical Methods Committee, AMCTB No. 70, 2015).

$$S_R^2 = S_r^2 + S_B^2$$

donde:

S_R^2 : es la varianza de la precisión intermedia

S_r^2 : es la varianza de la repetibilidad

S_B^2 : es la varianza entre condiciones (analistas)

A partir de estos datos, se calculan las correspondientes desviaciones estándar relativas (RSD_r y RSD_R).

Horwitz (1982), diseñó una expresión para predecir el valor esperado de las desviaciones estándar relativas para la reproducibilidad interlaboratorio, de acuerdo a: $\% PRSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$, donde c es la concentración del analito en fracciones decimales. Sin embargo, un modelo más contemporáneo ha demostrado que la relación anterior se representa mejor si 3 ecuaciones se usan para cubrir desde las altas a las bajas concentraciones (Prichard y Barwick, 2007):

Si $c < 1,2 \cdot 10^{-7}$ el coeficiente de variación de Horwitz se determina como: $PRSD_R = 0,22c$

Si $1,2 \cdot 10^{-7} \leq c \leq 0,138$ el coeficiente de variación de Horwitz se determina como:

$$PRSD_R = 0,02c^{0,8495}$$

Si $c > 0,1387$ el coeficiente de variación de Horwitz se determina como:

$$PRSD_R = 0,01c^{0,5}$$

Para análisis repetidos llevados a cabo por un solo operador en un solo laboratorio en validaciones/verificaciones intralaboratorio $\% RSD_r = 0,2$ a $0,3$ veces $\% PRSD_R$ mientras que para la precisión intermedia $\% RSD_R = 0,2$ a 1 veces $\% PRSD_R$ (González y Herrador, 2007; Prichard y Barwick, 2007).

1.7.8. Sesgo

El uso de la calibración externa simplifica enormemente el protocolo porque los estándares de calibración se preparan como disoluciones simples del analito. Sin embargo, las consecuencias de los posibles efectos matrices que provienen de la muestra deben ser chequeados. Una herramienta muy útil para comprobar la posible presencia de sesgo constante y de sesgo proporcional debidos a efecto matriz es el método de adición de estándar (SAM, siglas en inglés) (González y Herrador, 2007) y el método de Youden (Maroto et al., 2001). Estos procedimientos son descritos en varias referencias (González y Herrador, 2007; Castells y Castillo, 2000; Maroto et al., 2001; González, Herrador y Asuero, 2005; Maroto et al., 2003) y asumen que la matriz de la muestra no contribuye a la señal como un agente interferente y que no existe interacción entre el analito y la matriz (González y Herrador, 2007).

Según The Irish National Accreditation Board (2016), sesgo es " la diferencia entre el promedio calculado de los resultados de medición y un valor de referencia aceptado".

En este mismo documento se precisa que el sesgo es el error sistemático total, pudiendo existir uno o más componentes de error sistemático que contribuye al sesgo.

Dos herramientas muy útiles para probar la presencia del sesgo proporcional (recobrado, R , significativamente diferente de 1) y sesgo constante (desplazamiento, δc significativamente diferente de 0), debido a los efectos de la matriz es el método de

adición de estándar y el método de Youden respectivamente (Maroto et al., 2001; González y Herrador, 2007)

Por aplicación del método de adición de estándar a porciones representativas de una muestra real se obtienen las siguientes ecuaciones (González y Herrador, 2007):

$$\hat{Y} = a_{SAM} + b_{SAM} \cdot C_{añadida}$$

donde:

\hat{Y} : valor de la respuesta analítica para las muestras a partir del método de adición de estándar

a_{SAM} : es el intercepto de la línea recta obtenida a partir del método de adición de estándar

b_{SAM} : es la pendiente de la línea recta obtenida a partir del método de adición de estándar

$C_{añadida}$: es la concentración del analito adicionado

$$R = \frac{b_{SAM}}{b}$$

donde:

R: es el recobrado de consenso

b: es la pendiente de la línea recta de calibración de los estándares de calibración

La ausencia de sesgo proporcional corresponde a $b_{SAM} = b$, o, en términos del recobrado, $R = 1$. Esto debe ser chequeado para la significación estadística: $t = \frac{|R-1|}{u(R)}$,

con la incertidumbre calculada como: $u(R) = \sqrt{\frac{u^2(b_{SAM})}{b^2} + \frac{b_{SAM}^2 \cdot u^2(b)}{b^4}}$. En la fórmula

anterior $u(R)$ es la incertidumbre de recobrado experimental, $u(b_{SAM})$ y $u(b)$ son las incertidumbres asociadas con las pendientes de las rectas de calibración obtenidas por

el método de adición de estándares y de la calibración externa, respectivamente. Según Maroto et al. (2003) $u(R)$ puede ser calculada como: $u(R) = \frac{s(R)}{\sqrt{n}}$, donde $s(R)$ es la desviación estándar de los n recobrados. El valor de la t de Student se compara con el valor tabulado para 2 colas y $n-1$ grados de libertad y un determinado nivel de confianza (usualmente 95 %) (Ellison, Barwick y Farrant, 2009). Si $t \leq t_{\text{tab}}$ el recobrado de consenso no es significativamente diferente de 1, es decir, no hay sesgo proporcional (González y Herrador, 2007).

El método de Youden consiste en analizar dos o más cantidades diferentes (masas o volúmenes) de una muestra que es representativa de las muestras de rutina. Para el caso más simple de este método solo se analizan dos cantidades diferentes de una muestra rutinaria. En este caso, el sesgo constante se puede estimar a partir de la siguiente expresión matemática (Maroto et al., 2001): $\delta_{ct} = \frac{W_m \cdot \bar{x}_n - W_n \cdot \bar{x}_m}{W_m - W_n}$, donde

\bar{x}_n y \bar{x}_m son los promedios de los resultados analíticos obtenidos cuando se analizan las cantidades de muestras W_m y W_n , respectivamente y δ_{ct} es el sesgo constante.

La ausencia de sesgo constante del procedimiento analítico debe ser comprobado para la significación estadística empleando el siguiente estadígrafo: $t = \frac{|\delta_{ct}|}{u(\delta_{ct})}$ donde $u(\delta_{ct})$ es la incertidumbre debido a la estimación del sesgo constante.

La incertidumbre del sesgo constante se calcula según la siguiente expresión:

$$u(\delta_{ct}) = \frac{1}{W_m - W_n} \sqrt{(W_m \cdot u(\bar{x}_n))^2 + (W_n \cdot u(\bar{x}_m))^2}$$

donde: $u(\bar{x}_n)$ y $u(\bar{x}_m)$ son las incertidumbres de los resultados analíticos \bar{x}_n y \bar{x}_m . Estas incertidumbres dependen de la precisión intermedia del método al nivel de

concentración de la muestra y del número de análisis llevados a cabo para obtener el resultado analítico y se calculan según la siguiente expresión: $u(\bar{x}_i) = \frac{RSD_I \cdot \bar{x}_i}{\sqrt{n}}$, siendo RSD_I la desviación estándar de la precisión intermedia.

Si $t \leq t_{\alpha/2, n_{ef}}$ el sesgo constante no es significativo estadísticamente, siendo α el nivel de significación (usualmente 0,05), n_{ef} los grados efectivos de libertad y $t_{\alpha/2, n_{ef}}$ es la t de Student de dos colas tabulada.

Según Satterthwaite (1941) n_{ef} se calcula según la siguiente expresión matemática:

$$\frac{(\hat{x} + \hat{y})^2}{n_{ef}} = \frac{\hat{x}^2}{r_1} + \frac{\hat{y}^2}{r_2}$$

donde:

\hat{x} y \hat{y} son los valores esperados de x y y , y r_1 y r_2 son los grados de libertad asociados a las varianzas de las distribuciones de x y y con los valores esperados \hat{x} y \hat{y} . En la práctica los valores esperados \hat{x} y \hat{y} son usualmente desconocidos. En este trabajo \hat{x} y \hat{y} si asumen como los valores promedios de sus respectivas distribuciones.

Si el sesgo constante es significativo el procedimiento debe ser revisado (Maroto et al., 2001). No obstante González y Herrador (2007) señalan que si, durante el estudio del efecto matriz, existen sesgo proporcional y sesgo constante, entonces el valor de la concentración estimada corregida para el analito será: $Z = \frac{Z_{hallada} - \delta_{ct}}{R}$, donde $Z_{hallada}$ es la concentración no corregida del analito.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se describe la etapa experimental de la investigación desarrollada, se especifican los reactivos, materiales y equipos y las condiciones a las cuales se efectúan los análisis.

2.1. Equipos, reactivos y preparación de las disoluciones

Para la determinación de Fe^{2+} y Fe total mediante espectrofotometría UV – Visible se empleó un espectrofotómetro Genesys 10 UV con celdas de 1 cm de camino óptico. Todo el material volumétrico utilizado estaba certificado por la Oficina Territorial de Normalización.

Los reactivos empleados en el método de determinación de Fe^{2+} y Fe total fueron ácido clorhídrico concentrado (36,0-38,0 %) de Uni-Chem, clorhidrato de hidroxilamina (99,5 %) de Panreac, acetato de amonio (97 %) de Chemical Reagents, o-fenantrolina (99,5 %) de Merck, permanganato de potasio (95 %) de Merck, sal de Mohr (99-101 %) de Chemical Reagents, ácido acético glacial (99.8 %) de Uni-Chem y ácido sulfúrico concentrado (95-98 %) de Uni-Chem.

Para preparar la disolución de clorhidrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) se disolvieron 10 g de la misma en 100 mL de agua destilada. En el caso de la solución buffer de acetato de amonio se disolvieron 250 g de este en 150 mL de agua destilada y luego se agregaron 700 mL de ácido acético glacial. Para preparar la disolución de la o-fenantrolina ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$) se disolvieron 0,1 g de la misma en 100 mL de agua destilada, se agitó y se adicionaron 2 gotas de HCl concentrado. Para la preparación de

la disolución de permanganato de potasio de concentración 0,02 mol/L se disolvieron 0,316 g del mismo en 100 mL de agua destilada y se homogenizó.

Además, se utilizó una disolución de sal de Mohr $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sulfato doble de hierro(II) y amonio hexahidratado), la cual se preparó pesando 1,4044 g de la misma, se añadieron 50 mL de agua destilada y lentamente 20 mL de H_2SO_4 concentrado, posteriormente se agregó permanganato de potasio (KMnO_4) gota a gota hasta que permaneció un débil color rosado y se diluyó en 100 mL de agua destilada. Esta disolución contenía una concentración de Fe de 1000 mg/L. Para preparar la disolución madre de Fe^{2+} se tomó una alícuota de 50 mL de la solución estándar anterior y se llevó a un matraz volumétrico de 1000 mL y se enrasó con agua destilada. Esta última disolución, la cual se preparó diariamente, contenía una concentración de Fe de 10 mg/L.

2.2. Verificación del método de cuantificación de Fe^{2+} por el método de la o-fenantrolina

Para preparar las disoluciones de la curva de calibración se tomaron 5 matraces aforados de 100 mL a los cuales se añadieron 0,5; 1,5; 2,5; 3,5 y 4,5 mL de la solución de concentración 10 mg/L, estos volúmenes se corresponden a concentraciones finales de Fe de 0,05; 0,15; 0,25; 0,35 y 0,45 mg/L respectivamente.

A los patrones se añadieron 2 mL de ácido clorhídrico concentrado y a continuación se agregó 1 mL de clorhidrato de hidroxilamina con el objetivo de reducir todo el Fe^{3+} presente a Fe^{2+} . Se agregaron 10 mL de la solución buffer de acetato de amonio y 4 mL de solución de o-fenantrolina. Finalmente se llevaron al aforo con agua destilada y se homogenizaron. Se esperó que transcurrieran 10 minutos para un máximo desarrollo

de color y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm. A cada concentración se realizaron 5 réplicas.

Para la comprobación estadística del procedimiento desarrollado se realizaron los correspondientes análisis de regresión, límites de detección y cuantificación, precisión y sesgo. Para los análisis primeramente se realizó la comprobación de la posible presencia de errores burdos mediante la prueba de Grubbs.

Para comprobar la linealidad de los datos primeramente se realizó un análisis estadístico que incluyó varias pruebas de proporcionalidad como son determinación del intervalo de confianza de la pendiente y del intercepto, así como la significación estadística de los mismos y se analizó además la significación estadística de la correlación. Para la evaluación de la linealidad se utilizó la prueba de falta de ajuste.

Para determinar los límites de detección y cuantificación en la cuantificación de Fe^{2+} se analizaron 20 muestras blancas. En este caso se prepararon siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, excepto la adición del analito.

Para determinar la precisión de los métodos analíticos se tuvo en cuenta la repetibilidad y la precisión intermedia.

Para determinar el comportamiento de la repetibilidad del método se realizó la lectura de las soluciones patrón de Fe^{2+} a los niveles de concentración mínimo (0,05 mg/L), medio (0,25 mg/L) y máximo (0,45 mg/L) comprendidos dentro del rango de estudio, para lo cual se realizaron diez réplicas en un mismo día, empleando el mismo equipo y el mismo analista en todos los casos. Como criterio para evaluar la repetibilidad se empleó el coeficiente de variación de las concentraciones.

El estudio de la precisión intermedia se realizó a los mismos niveles de concentración utilizados en la repetibilidad pero considerando como el único factor de variabilidad los analistas.

La determinación del sesgo proporcional se realizó con muestras de agua fluvial procedente del río Sagua la Grande, para lo cual se añadieron 25 mL de muestra a 15 matraces de 100 mL y posteriormente se añadieron 20 mL de fenantrolina y 10 mL de acetato de amonio.

Para llevar a cabo el método de adición de estándar, con el fin de determinar el sesgo proporcional, se añadieron volúmenes de 0, 1, 2, 3 y 4 mL de solución patrón de concentración 7,25 mg/L y posteriormente se enrasaron los matraces hasta el aforo y se homogenizaron. Se dejaron transcurrir 10 minutos para el máximo desarrollo de color. Todas las muestras se midieron en el espectrofotómetro a 510 nm y los análisis se hicieron por triplicado. Para determinar la posible presencia de sesgo proporcional se construye una gráfica de absorbancia vs concentración añadida del analito.

Para determinar la posible presencia de sesgo constante se empleó el método de Youden, para lo cual se tomaron 15 y 35 mL de muestra y se procedió de igual manera que para la determinación del sesgo proporcional, excepto las adiciones de disoluciones estándar, y se realizaron por triplicado.

2.3. Determinación de Fe^{2+} y Fe^{total} en muestras de agua fluvial

Para la determinación de Fe^{2+} en muestras de agua fluvial de la Empresa Electroquímica de Sagua UEB Cloro – Sosa y procedente del río Sagua la Grande, se tuvo en cuenta el lugar donde se encontraba la muestra debido a la posibilidad de cambio en la relación molar Fe^{2+}/Fe^{3+} con el tiempo en soluciones ácidas. Para

determinar únicamente el contenido de Fe^{2+} se acidificaron 1500 mL de muestra con 30 mL de HCl concentrado al momento de la recolección. Se llenó el frasco directamente desde la fuente de muestreo y se cerró herméticamente. Se retiró una porción de 25 mL de muestra acidificada y se agregaron 20 mL de o-fenantrolina y 10 mL de solución de acetato de amonio con agitación vigorosa. Posteriormente se llevó al aforo con agua destilada y se homogenizó. Se dejaron transcurrir 10 minutos para un máximo desarrollo de color.

Para la determinación de Fe total se adicionaron 25 mL de muestra acidificada a un erlenmeyer de 250 mL y 1 mL de la disolución de clorhidrato de hidroxilamina. Posteriormente se calentó a ebullición hasta que el volumen de muestra disminuyera a 10-15 mL. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se continuó el resto de la operación como para la cuantificación de Fe^{2+} . Las determinaciones de Fe^{2+} y Fe total se hicieron por quintuplicado. El contenido de Fe^{3+} se calcula a partir de los valores obtenidos de Fe^{2+} y Fe total.

CAPÍTULO III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este capítulo se muestran y analizan los principales resultados obtenidos en el proceso de verificación del método analítico empleado para la cuantificación de Fe^{2+} y Fe total en muestras de agua fluvial de la Empresa Electroquímica de Sagua UEB Cloro – Sosa. Para ello se tienen en cuenta varios criterios como linealidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), precisión y sesgo. También se reportan los resultados obtenidos durante la cuantificación de estos analitos en una muestra de agua fluvial procedente del río de Sagua la Grande.

3.1. Verificación del método de cuantificación de Fe^{2+} mediante espectrofotometría UV– Visible

En el anexo 1 se muestran los resultados obtenidos durante la verificación del método colorimétrico de la o–fenantrolina empleado para la determinación de Fe^{2+} disuelto por espectrofotometría UV – Visible.

Se realizó la determinación de errores burdos a los resultados obtenidos, para la cual se plantearon las siguientes hipótesis:

H_0 : No existen errores burdos

H_1 : Existen errores burdos

Se obtuvo que en todos los casos y para un 95 % de confianza los valores de G_{exp} son menores que $G_{critico}$ ($G_{exp} < G_{critico}$), por lo tanto, se aceptó la hipótesis nula y se concluyó que no existen errores burdos.

3.1.1. Linealidad

En la Figura 3.1 se observa la curva de calibración obtenida en la determinación de Fe^{2+} .

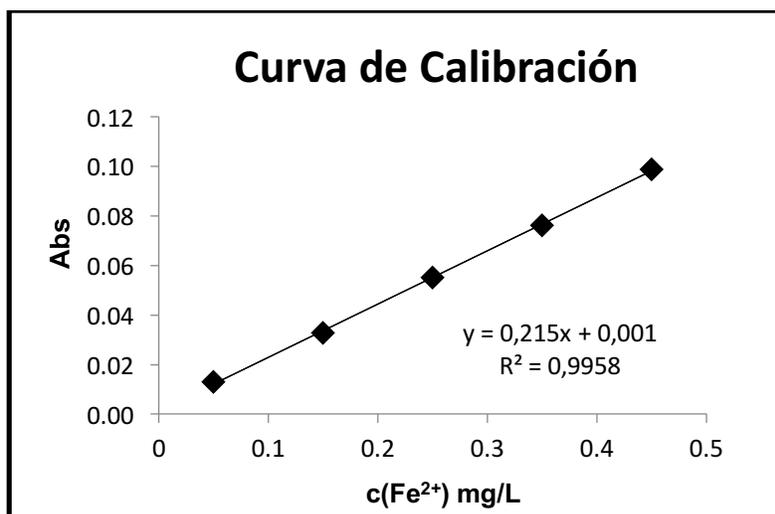


Figura 3.1 Curva de calibración obtenida para el análisis de regresión.

Para comprobar si la regresión es lineal se procedió a un análisis estadístico apoyado en la construcción de la curva de regresión, el análisis de los residuos, la comprobación de la significación estadística de la correlación del intercepto y de la pendiente y la prueba de falta de ajuste. Los resultados se observan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Análisis de la regresión para la determinación de Fe^{2+}

Parámetros	Valor calculado	Criterio
Coefficiente de correlación	0,9979	$r > 0,99$
Intercepto	$0,001 \pm 0,001$	Incluye el cero
Pendiente	$0,215 \pm 0,005$	No Incluye el cero
Valor F – Fisher (F)	5724,6123	$F_{\text{exp}} > F_{\text{crítica}}$ $F_{\text{crítica}} = 4,279$
t – Student	$t_b = 75,661$ $t_a = 1,727$	$t_{\text{exp}} > t(0,05, 23)$ $t_{\text{crítica}} = 2,068$
Prueba LOF	1,19	$F_{\text{exp}} < F_{\text{crítica}}$ $F_{\text{crítica}} = 3,10$

Para comprobar si existe correlación entre los valores de absorbancia y las concentraciones se formularon las siguientes hipótesis:

H_0 = no existe correlación entre la $c(\text{Fe}^{2+})$ y la absorbancia.

H_1 = existe correlación entre la $c(\text{Fe}^{2+})$ y la absorbancia.

Como $t_{\text{exp}} = 75,661 > t_{\text{tab}} = 2,068$ para un 95 % de confianza y 23 grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula; existe una correlación significativa entre la $c(\text{Fe}^{2+})$ y la absorbancia. Los resultados muestran un buen ajuste de la curva de calibración a los datos experimentales, debido a que el coeficiente de correlación tiene valor muy próximo a 1, lo que significa que existe correlación con una probabilidad elevada.

Con el objetivo de verificar la significación estadística del intercepto se plantearon las siguientes pruebas de hipótesis:

H_0 : intercepto = 0

H_1 : intercepto \neq 0

Como $t_{exp} = 1,727 > t_{tab} = 2,068$ para un 95 % de confianza y 23 grados de libertad, se aceptala hipótesis nula; el intercepto no es significativamente diferente de 0. Lo anterior se corrobora a partir del intervalo de confianza del intercepto el cual incluye el cero, lo cual significa que este parámetro es significativamente iguala 0.

A pesar del resultado anterior en este trabajo no se despreció el intercepto del modelo de regresión, ya que como plantearon Kutner et al. (2005) "... es generalmente una práctica segura no usar un modelo de regresión a través del origen y en su lugar emplear el modelo de regresión con el intercepto. (...) y a menos que el tamaño de la muestra sea muy pequeño el uso del modelo de regresión con intercepto no tiene desventajas de ninguna consecuencia."

Un resultado diferente se obtuvo para la pendiente como se puede demostrar a partir de la comprobación de las siguientes hipótesis:

H_0 : pendiente = 0

H_1 : pendiente \neq 0

Como $t_{exp} = 75,661 > t_{tab} = 2,068$ para un 95 % de confianza y 23 grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula; la pendiente es significativamente diferente de 0, es decir existe una relación de proporcionalidad entre los valores de absorbancia y las concentraciones de Fe^{2+} .

Para comprobar la homogeneidad de varianza de las absorbancias (homocedasticidad) se representan en la figura 3.2 un gráfico de los residuales obtenidos. Como se

observaal graficar los residuales contra las concentraciones se obtienen los puntos distribuidos al azar alrededor del eje x, lo que indica que existe homocedasticidad.

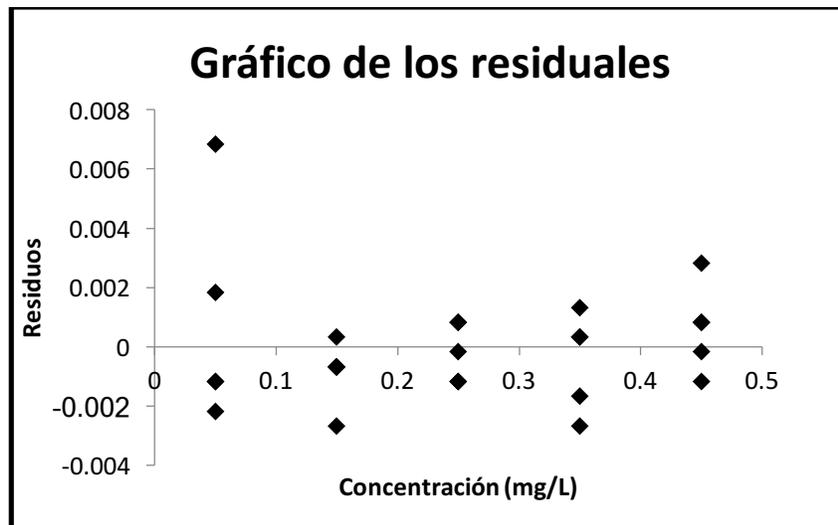


Figura 3.2 Gráfico de residuales de la curva de calibración de Fe^{2+}

Para comprobar si los resultados experimentales se ajustan a un modelo lineal se formularon las siguientes hipótesis:

$$H_0: \text{Abs} = \beta_0 + \beta_1 \cdot c(\text{Fe}^{2+})$$

$$H_1: \text{Abs} \neq \beta_0 + \beta_1 \cdot c(\text{Fe}^{2+})$$

Como $F_{\text{exp}} = 1,19 < F_{\text{tab}} = 3.10$ para un 95 % de confianza y 20 y 3 grados de libertad entonces se acepta la hipótesis nula, por lo cual los resultados experimentales se ajustan a un modelo lineal (linealidad in-line, ausencia de curvatura). La linealidad on-line es igual a 1,32 % indicando que existe poca dispersión de los datos alrededor de la línea de calibración.

Por todo lo anterior se puede afirmar que los resultados experimentales obtenidos en el método de determinación de Fe^{2+} por espectrofotometría UV – Visible se ajustan a una línea recta.

3.1.2. Límite de detección y límite de cuantificación

En el método de determinación de Fe^{2+} el valor obtenido para el límite de detección fue 0,013 mg/L y para el límite de cuantificación 0,043 mg/L. Como se puede apreciar estos valores están por debajo del valor mínimo de la curva de calibración.

3.1.3. Análisis de la precisión para cuantificar los contenidos de Fe^{2+}

Al realizar los replicados para el análisis de la precisión se tuvo en cuenta la repetibilidad y precisión intermedia. Se realizaron 10 determinaciones en tres niveles de concentración: 0,05 (mínimo); 0,25 (medio) y 0,45 (máximo) mg/L.

Para la precisión intermedia las determinaciones se realizaron en el mismo laboratorio, pero con diferentes analistas. Se realizó la comprobación de errores burdos a los datos experimentales obtenidos, para todos los casos $G_{\text{exp}} < G_{\text{crítico}}$ para un 95 % de confianza, por lo tanto, se acepta la hipótesis nula y se concluye que no existen errores burdos (Anexo1). En la Tabla 3.2 se muestran los resultados de la repetibilidad al determinar el contenido de Fe^{2+} .

Tabla 3.2 Resultados de los análisis de la repetibilidad de la determinación de Fe^{2+}

	$c(\text{Fe}^{2+})$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	0,05	0,25	0,45
Coefficiente de variación experimental (%)	6,454	5,118	1,703
Coefficiente de variación crítico (%)	7,535	5,914	5,413

Como parte del análisis de repetibilidad correspondiente a la cuantificación de Fe^{2+} se comprobó que en los tres niveles de concentración se cumplió que el coeficiente de variación experimental es menor que el coeficiente de variación crítico (expresados

ambos en porcentaje) (ver tabla 3.2), por lo cual se puede afirmar que la cuantificación es adecuadamente repetible bajo las condiciones de los ensayos realizados.

Tabla 3.3 Resultados de los análisis de la precisión intermedia de las determinaciones de Fe^{2+} .

	$c(\text{Fe}^{2+})$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	0,05	0,25	0,45
Coefficiente de variación experimental (%)	11,257	6,336	3,314
Coefficiente de variación crítico (%)	25,116	19,712	18,043

De los análisis de precisión intermedia de determinaciones llevadas a cabo por diferentes analistas, el mismo día, se comprobó que para el factor evaluado y en los tres niveles de concentración se cumplió que los coeficientes de variación experimentales son menores que los coeficientes de variación críticos (expresados ambos en porcentaje) (ver tabla 3.3), por lo cual se puede afirmar que la cuantificación es reproducible bajo las condiciones de los ensayos realizados.

3.1.4. Sesgo

3.1.4.1. Sesgo proporcional

Se realizó la determinación de errores burdos a los resultados obtenidos, para la cual se plantearon las siguientes hipótesis:

H_0 : No existen errores burdos

H_1 : Existen errores burdos

Se obtuvo que en la mayoría de los casos y para un 95 % de confianza los valores de G_{exp} son menores que $G_{\text{crítico}}$ ($G_{\text{exp}} < G_{\text{crítico}}$), por lo tanto, se aceptó la hipótesis nula y se

concluyó que no existen errores burdos. Sin embargo, para el valor mínimo de la primera adición de estándar el valor del estadígrafo es solo ligeramente superior al nivel crítico. En este trabajo se decidió no considerarlo un error burdo.

Como el método empleado para determinar la posible existencia de sesgo proporcional se basa en que los resultados obtenidos se ajustan a una línea recta se realizó un análisis de regresión de los mismos para comprobar esta suposición. Con tal fin se formularon las siguientes hipótesis:

$$H_0: \text{Abs} = \beta_0 + \beta_1 \cdot c(\text{Fe}^{2+})$$

$$H_1: \text{Abs} \neq \beta_0 + \beta_1 \cdot c(\text{Fe}^{2+})$$

Para decidir cuál hipótesis se cumple se realizó una prueba de falta de ajuste obteniéndose que la $F_{\text{exp}} = 2,96 < F_{\text{tab}} = 3,71$ para un 95 % de confianza y 10 y 3 grados de libertad entonces se acepta la hipótesis nula, por lo cual los resultados experimentales se ajustan a un modelo lineal.

Para comprobar si la pendiente es estadísticamente significativa se formularon las siguientes hipótesis:

$$H_0: \text{pendiente} = 0$$

$$H_1: \text{pendiente} \neq 0$$

Como $t_{\text{exp}} = 29,114 > t_{\text{tab}} = 2,228$ para un 95 % de confianza y 10 grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula; la pendiente es significativamente diferente de 0, es decir existe una relación de proporcionalidad entre los valores de absorbancia y las concentraciones de Fe^{2+} .

Para comprobar si el intercepto es significativo estadísticamente se formularon las siguientes hipótesis:

H_0 : intercepto = 0

H_1 : intercepto \neq 0

Como $t_{exp} = 89,013 > t_{tab} = 2,228$ para un 95 % de confianza y 10 grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula; el intercepto es significativamente diferente de 0.

A partir de los resultados obtenidos se calculó el sesgo de consenso el cual fue igual a 2,2.

Para comprobar si existe sesgo proporcional se formularon las siguientes hipótesis:

H_0 : $R = 1$ (no hay sesgo proporcional)

H_1 : $R \neq 1$ (hay sesgo proporcional)

El valor de la t de Student experimental fue $58,952 > 4,302$ (valor crítico) para 95 % de confianza y 2 grados de libertad, lo cual significa que hay sesgo proporcional, es decir la concentración de la matriz influye en los resultados analíticos, motivo por lo cual los resultados deben ser corregidos en función del recobrado de consenso (ver los anexos para los resultados).

3.1.4.2. Sesgo constante

Para la determinación del sesgo constante también se comprobó la presencia o no de errores burdos, para la cual se plantearon las siguientes hipótesis:

H_0 : No existen errores burdos

H_1 : Existen errores burdos

Se obtuvo que en todos los casos y para un 95 % de confianza los valores de G_{exp} son menores que $G_{crítico}$ ($G_{exp} < G_{crítico}$), por lo tanto, se aceptó la hipótesis nula y se concluyó que no existen errores burdos.

A partir de los resultados obtenidos y empleando la ecuación de la línea recta obtenida mediante el estudio de regresión se calcularon las $c(Fe^{2+})$, las desviaciones estándar relativas de la precisión intermedia (variando solo analistas), las incertidumbres de las concentraciones el sesgo constante y su incertidumbre, el número de grados de libertad efectivos y la t de Student experimental. Para comprobar si existe sesgo constante se formularon las siguientes hipótesis:

$H_0: \delta_{ct} = 0$ (no hay sesgo constante)

$H_1: \delta_{ct} \neq 0$ (hay sesgo constante)

El valor de la t de Student experimental fue $1,56 < 2,75$ (valor crítico) para 95 % de confianza y 8,81 grados de libertad efectivos, lo cual significa que no hay sesgo constante, es decir la cantidad de la matriz no influye en los resultados analíticos, motivo por lo cual los resultados analíticos no deben ser corregidos en función del sesgo constante (ver los anexos para los resultados).

3.2. Determinación de las concentraciones de Fe^{2+} y Fe total

Para la determinación de las concentraciones de Fe^{2+} y Fe total también se comprobó la presencia o no de errores burdos, para la cual se plantearon las siguientes hipótesis:

H_0 : No existen errores burdos

H_1 : Existen errores burdos

Se obtuvo que en todos los casos y para un 95 % de confianza los valores de G_{exp} son menores que $G_{critico}$ ($G_{exp} < G_{critico}$), por lo tanto, se aceptó la hipótesis nula y se concluyó que no existen errores burdos.

Siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 3 la concentración de Fe^{2+} disuelto y no corregida en función del sesgo proporcional fue $0,20 \pm 0,04$ mg/L. Corrigiendo los resultados por el valor del sesgo proporcional ($R = 2,20 \pm 0,08$) se obtuvo que la concentración de Fe^{2+} en el agua fluvial empleada en la Empresa Electroquímica de Sagua UEB Cloro-Sosa y procedente del río Sagua la Grande fue $0,09 \pm 0,01$ mg/L.

La concentración de Fe total disuelto y no corregida en función del sesgo proporcional fue $0,38 \pm 0,04$ mg/L. Corrigiendo los resultados por el valor del sesgo proporcional ($R = 2,20 \pm 0,08$) se obtuvo que la concentración de Fe^{2+} en el agua fluvial empleada en la Empresa Electroquímica de Sagua UEB Cloro-Sosa y procedente del río Sagua la Grande fue $0,17 \pm 0,02$ mg/L.

La concentración de Fe^{3+} disuelto corregida por el sesgo fue $0,08 \pm 0,03$ mg/L.

CONCLUSIONES

1. A partir de la evaluación de los criterios de regresión, precisión intermedia, límites de detección y cuantificación y sesgo se puede afirmar que la cuantificación de Fe^{2+} por espectrofotometría UV – Visible es adecuada para la determinación de este analito en muestras de aguafluvial de la Empresa Electroquímica de Sagua UEB Cloro – Sosa.
2. Las concentraciones de Fe^{2+} , Fe^{3+} y Fe total de las muestras tomadas del agua fluvial empleada en la Empresa Electroquímica de Sagua UEB Cloro-Sosa y procedente del río Sagua la Grande fueron $0,09 \pm 0,01$ mg/L; $0,08 \pm 0,03$ mg/L y $0,17 \pm 0,02$ mg/L respectivamente.

RECOMENDACIONES

- Extender este estudio a otros analitos cuantificados en las aguas empleadas en la Empresa Electroquímica de Sagua UEB Cloro-Sosa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GONZÁLEZ, A. G. & HERRADOR, M. Á. 2007. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 227–238.
2. KUTNER, M. H., NACHTSHEIM, C. J., NETER, J. & LI, W. 2005. *Applied Linear Statistical Models*, New York, McGraw-Hill/Irwin.
3. Analytical Methods Committee 1988, 'Uses (Proper and Improper) of Correlation Coefficients', *Analyst*, vol. 113, pp. 1469–1471.
4. Analytical Methods Committee, AMCTB No. 69 2015, 'Using the Grubbs and Cochran tests to identify outliers', *Analytical Methods*, vol. 7, no. 19, pp. 7948–7950
5. Analytical Methods Committee, AMCTB No. 70 2015, 'An analyst's guide to precision', *Analytical Methods*, vol. 7, no. 20, pp. 8508–8510.
6. Analytical Methods Committee AMCTB No 39 2009, 'Rogues and Suspects: How to Tackle Outliers', AMC Technical Briefs.
7. Anghel, L. V., Balasoiu, M., Lazar, D. M. y Ishchenko, L. A. 2011, 'Stability of tris-1,10-phenantroline iron(II) complex in biomineral particles produced by *Klebsiella Oxytoca*'.
8. Barwick, V. y Prichard, E. (eds) 2011, *Eurachem Guide: Terminology in Analytical Measurement – Introduction to VIM 3*, 1st edn. Disponible Revisado.
9. Brinkmann, T., Santonja, G. G., Schorcht, F., Roudier, S. y Sancho, L. D. 2014, *Best Available Techniques (BAT) Reference Document for the Production of Chlor-alkali*, Report EUR 26844 EN, European Commission, Joint Research

- Centre, Institute for Prospective Technological Studies, Luxemburgo. Disponible.
Revisado [13/04/2018].
10. British Standard Institute 1996, BS ISO 11095:1996. Linear calibration using reference materials, BSI, Londres.
 11. Castells, R. C. y Castillo, M. A. 2000, 'Systematic errors: detection and correction by means of standard calibration, Youden calibration and standard additions method in conjunction with a method response model', *Analytica Chimica Acta*, vol. 423, pp. 179–185.
 12. Chriwa Wasseraufbereitungstechnik GmbH 2016a, Manual de Instrucciones para la Unidad de Agua Cruda 71U100, Hambühren.
 13. Chriwa Wasseraufbereitungstechnik GmbH 2016b, Manual de Instrucciones para la Unidad de Agua Desmineralizada 73U100, Hambühren.
 14. Deutsches Institut für Normung 2005, DIN EN ISO 9000:2005 Quality management systems – Fundamentals and vocabulary (ISO 9000:2005); Trilingual version EN ISO 9000:2005, DIN, Bruselas.
 15. Eaton, A. D. 2005, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th edn, American Public Health Association, American Water Works Association Water Pollution Control Federation, New York.
 16. Ellison, S. L. R., Barwick, V. J. y Farrant, T. J. D. 2009, Practical statistics for the analytical scientist. A bench guide, 2da edn, RSC Publishing, Cambridge, UK.
 17. González, A. G. y Herrador, M. Á. 2007, 'A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles', *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 26, no. 3, pp. 227–238.

18. González, A. G., Herrador, M. Á. y Asuero, A. G. 2005, 'Practical digest for evaluating the uncertainty of analytical assays from validation data according to the LGC/VAM protocol', *Talanta*, vol. 65, no. 4, pp. 1022–1030.
19. González, A. G., Herrador, M. Á. y Asuero, A. G. 2010, 'Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards', *Talanta*, vol. 82, pp. 1995–1998.
20. Harvey, D. 2000, *Modern Analytical Chemistry*, 1era edn, McGraw-Hill Higher Education, United States of America.
21. Horwitz, W. 1982, 'Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs', *Analytical Chemistry*, vol. 54, no. 1, pp. 67A–76A.
22. Horwitz, W. 1995, 'Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies', *Pure Appl. Chem*, vol. 67, p. 331.
23. Huber, L. 2007, *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, 2nd edn, Informa Healthcare USA, Inc., New York.
24. Hubert, P., Nguyen-Huu, J.-J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Cohen, N., Compagnon, P.-A., Dewé, W., Feinberg, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Valat, L. y Rozet, E. 2007, 'Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal–Part III', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 45, no. 1, pp. 82–96.
25. International Organization for Standardization 1994, *ISO 5725-2:1994. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results Part 2: Basic Method for the Determination of Repeatability and Reproducibility of a Standard Measurement Method*, ISO Ginebra.

26. Irving, H. y Mellor, D. H. 1962, '1002. The stability of metal complexes of 1,10-phenanthroline and its analogues. Part I. 1,10-Phenanthroline and 2,2[prime or minute]-bipyridyl', *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, no. 0, pp. 5222-5237.
27. Jurado, J. M., Alcázar, A., Muñiz-Valencia, R., Ceballos-Magaña, S. G. y Raposo, F. 2017, 'Some practical considerations for linearity assessment of calibration curves as function of concentration levels according to the fitness-for-purpose approach', *Talanta*, vol. 172, pp. 221–229.
28. Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., Neter, J. y Li, W. 2005, *Applied Linear Statistical Models*, McGraw-Hill/Irwin, New York.
29. Lahiri, S. C. y Aditya, S. 1964, 'The Thermodynamics of Formation of tris-o-Phenanthroline-Iron Complexes in Solution'.
30. Lazić, D., Škundrić, B., Penavin-Škundri, J., Sladojević, S., Vasiljević, L., Blagojević, D. y Obrenović, Z. 2010, 'Stability of tris-1,10-phenanthroline iron (II) complex in different composites', *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, vol. 16, no. 2, p. 193–198.
31. Maroto, A., Boqué, R., Riu, J. y Rius, F. X. 2001, 'Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays', *Analytica Chimica Acta*, vol. 440, no. 2, pp. 171–184.
32. Maroto, A., Boqué, R., Riu, J. y Rius, F. X. 2003, 'Effect of non-significant proportional bias in the final measurement uncertainty', *Analyst*, vol. 128, pp. 373–378.

33. Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Buydens, L. M. C., Jong, S. D., Lewi, P. J. y Smeyers-Verbeke, J. 1997, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Amsterdam, Elsevier.
34. McBryde, W. A. E. 1978, A critical review of equilibrium data for proton and metal complexes of 1,10—phenanthroline 2,2'—bipyridyl and related compounds, International Union of Pure and Applied Chemistry Analytical Chemistry Division. Commission on Equilibrium Data. Disponible. Revisado.
35. Miller, J. N. y Miller, J. C. 2010, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 6th edn, Pearson Education Limited, England.
36. Morillas P. P. et. al. (ed.) 2016, Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados, 1era (española), 2da (inglesa) edn, Eurolab España. Disponible en: www.eurachem.org. Revisado [17/04/2018].
37. Ney Cruz Hernández, Ramiro Valdés chequea inversión en Electroquímica de Sagua, Bohemia Digital. [En línea]. Disponible en: <http://bohemia.cu/nacionales/2017/07/ramiro-valdes-chequea-inversion-en-electroquimica-de-sagua>. Revisado [18/03/2018].
38. Paidar, M., Fateev, V. y Bouzek, K. 2016, 'Membrane electrolysis—History, current status and perspective', Electrochimica Acta, vol. 209, pp. 737–756.
39. Partido Comunista de Cuba 2017, Lineamientos de la política económica y social del Partido y la Revolución para el período 2016-2021, pp. 32, 33.
40. Potts, P. J. 1997, 'Glossary of Terms and Definitions Used in Analytical Chemistry', Geostandards and Geoanalytical Research, vol. 21, no. 1, pp. 157–161.

41. Prichard, E. y Barwick, V. 2007, Quality assurance in analytical chemistry, Wiley, Great Britain.
42. Rodríguez, L. C., Campaña, A. M. G. y Sendra, J. M. B. 1996, 'Statistical Estimation of Linear Calibration Range', Analytical Letters, vol. 29, no. 7, pp. 1231–1239.
43. Sanagi, M. M., Nasir, Z., Ling, S. L., Hermawan, D., Ibrahim, W. A. W. y Naim, A. A. 2010, 'A Practical Approach for Linearity Assessment of Calibration Curves Under the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Guidelines for an In-House Validation of Method of Analysis', Journal of AOAC International, vol. 93, no. 4, pp. 1322–1330.
44. Satterthwaite, F. E. 1941, 'Synthesis of Variance', vol. 6, no. 5, pp. 306-390.
45. Schmittinger, P., Florkiewicz, T., Curlin, L. C., Lüke, B., Scannell, R., Navin, T., Zelfel, E. y Artsch, R. B. 2012, Chlorine en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. 8, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 575-577.
46. Shrivastava, A. y Gupta, V. B. 2011, 'Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods', Chronicles of Young Scientists, vol. 2, no. 1, pp. 21–25.
47. Sommer, L. 1989, Analytical Absorption Spectrophotometry In The Visible And Ultraviolet The Principles, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
48. The Irish National Accreditation Board 2016, PS15: Guide to Method Validation for Quantitative Analysis in Chemical Testing Laboratories.
49. Tissue, B. M. 2015, 'Glossary of Analytical Terms'.

ANEXOS

Anexo 1. Verificación del método espectrofotométrico UV – Visible para la determinación de Fe²⁺

a) Análisis de regresión. Determinación de errores burdos

Conc (mg/L)	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A _{media}	Prueba de Grubbs			
							Desv. Estándar	G _{máx}	G _{mín}	G _{crítico} (95 %)
0,05	0,014	0,011	0,011	0,019	0,010	0,013	0,004	1,633	0,816	1,715
0,15	0,031	0,033	0,034	0,033	0,033	0,033	0,001	1,095	1,643	
0,25	0,056	0,055	0,054	0,056	0,054	0,055	0,001	1,000	1,000	
0,35	0,077	0,075	0,074	0,077	0,078	0,076	0,002	1,095	1,339	
0,45	0,097	0,099	0,101	0,099	0,098	0,099	0,001	1,483	1,214	

b) Repetibilidad

c(Fe) mg/L	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	Prueba de Grubbs			G _{crítico} (P=0,05)
											Desv. Estándar	G _{máx}	G _{mín}	
0,05	0,011	0,012	0,012	0,011	0,013	0,010	0,011	0,010	0,011	0,010	0,001	1,911	1,106	2,290
0,25	0,055	0,056	0,054	0,060	0,055	0,062	0,059	0,058	0,061	0,055	0,003	1,564	1,216	
0,45	0,099	0,098	0,102	0,101	0,100	0,096	0,098	0,099	0,099	0,098	0,002	1,765	1,765	

- Análisis estadístico

Nivel Bajo	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	R 7	R 8	R 9	R 10	Media
c(Fe)	0,047	0,051	0,051	0,047	0,056	0,042	0,047	0,042	0,047	0,042	0,047
CV(%)											6,454

Nivel Medio	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6	Rep7	Rep8	Rep9	Rep10	Media
c(Fe)	0,249	0,253	0,244	0,272	0,249	0,281	0,267	0,263	0,277	0,249	0,260
CV(%)											5,118

Nivel Alto	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6	Rep7	Rep8	Rep9	Rep10	Media
c(Fe)	0,453	0,449	0,467	0,463	0,458	0,440	0,449	0,453	0,453	0,449	0,453
CV(%)											1,703

c) Precisión intermedia (Analistas)

c(Fe) = 0,05 mg/L

	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5
Analista1	0,010	0,010	0,013	0,010	0,013
Analista2	0,012	0,011	0,011	0,011	0,012

$c(\text{Fe}) = 0,25 \text{ mg/L}$

	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5
Analista1	0,065	0,058	0,059	0,053	0,059
Analista2	0,056	0,055	0,054	0,056	0,054

$c(\text{Fe}) = 0,45 \text{ mg/L}$

	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5
Analista1	0,094	0,091	0,099	0,093	0,098
Analista2	0,097	0,099	0,101	0,099	0,098

- Determinación de errores burdos.

Prueba de Grubbs					
Analista 1					
$c(\text{Fe}) \text{ mg/L}$	Media	DesviaciónEstándar	$G_{\text{mín}}$	$G_{\text{máx}}$	$G_{\text{critico}}(\alpha=0,05)$
0,05	0,011	0,001	0,730	1,095	1,715
0,25	0,059	0,004	1,360	1,453	
0,45	0,095	0,003	1,180	1,180	

Prueba de Grubbs					
Analista 1					
c(Fe) mg/L	Media	DesviaciónEstándar	G _{mín}	G _{máx}	G _{crítico} ($\alpha=0,05$)
0,05	0,043	0,000	0,730	1,095	1,715
0,25	0,102	0,001	1,000	1,000	
0,45	0,147	0,001	1,214	1,483	

- Análisis estadístico

Nivel bajo

	c1(mg/L)	c2(mg/L)	c3(mg/L)	c4(mg/L)	c5(mg/L)	Media	CV _{teórico} (%)	CV _{exp} (%)
Analista1	0,042	0,042	0,056	0,042	0,056	0,048	25,116	11,257
Analista2	0,051	0,047	0,047	0,047	0,051			

Nivel medio

	c1(mg/L)	c2(mg/L)	c3(mg/L)	c4(mg/L)	c5(mg/L)	Media	CV _{teórico} (%)	CV _{exp} (%)
Analista1	0,298	0,265	0,270	0,242	0,270	0,260	19,712	6,336
Analista2	0,256	0,251	0,247	0,256	0,247			

Nivel alto

	c1(mg/L)	c2(mg/L)	c3(mg/L)	c4(mg/L)	c5(mg/L)	Media	CV _{teórico} (%)	CV _{exp} (%)
Analista1	0,433	0,419	0,456	0,428	0,451	0,446	18,043	3,314
Analista2	0,447	0,456	0,465	0,456	0,451			

d) Sesgo Proporcional

					Prueba de Grubbs			
Conc añadida (mg/L)	A 1	A 2	A 3	A _{media}	Desv. Estándar	G _{máx}	G _{mín}	G _{crítico} (95 %)
0,000	0,028	0,027	0,025	0,027	0,002	0,873	1,091	1,154
0,073	0,059	0,059	0,054	0,057	0,003	0,577	1,155	
0,145	0,095	0,094	0,090	0,093	0,003	0,756	1,134	
0,218	0,128	0,127	0,123	0,126	0,003	0,756	1,134	
0,290	0,162	0,166	0,164	0,164	0,002	1,000	1,000	

R	R _{promedio}	s(R)	u(R)	t _{exp}	t _{critica}
2,16	2,20	0,03	0,02	58,95	4,30
2,21					
2,22					

e) Sesgo constante

Volumen añadido (mL)	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A _{media}	Prueba de Grubbs			
								Desv. Estándar	G _{máx}	G _{mín}	G _{crítico} (95 %)
15	0,018	0,020	0,020	0,023	0,024	0,022	0,021	0,0022	1,271	1,421	1,887
35	0,049	0,044	0,058	0,052	0,052	0,052	0,051	0,0046	1,492	1,565	

Volumen añadido (mL)	c 1 (mg/L)	c 2 (mg/L)	c 3 (mg/L)	c 4 (mg/L)	c 5 (mg/L)	c 6 (mg/L)	c _{media} (mg/L)	RSD _t	u	δct	u(δct)
35	0,012	0,010	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,0820	0,0004		

n _{eff}	t _{exp}	t _{tab}
8,810	1,564	2,7515

f) Cuantificación de Fe²⁺ soluble

A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A _{media}	Prueba de Grubbs			
						Desv. Estándar	G _{máx}	G _{mín}	G _{crítico} (95 %)
0,010	0,012	0,015	0,012	0,011	0,012	0,002	1,604	1,069	1,715

Concentración de Fe²⁺ soluble no corregida por el sesgo proporcional

c 1	c 2	c 3	c 4	c 5	c_{media}	Desv.	Intervalo
(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	Estándar	de
							confianza
0,167	0,205	0,260	0,205	0,186	0,205	0,0348	0,04

Concentración de Fe²⁺ soluble corregida por el sesgo proporcional

c 1	c 2	c 3	c 4	c 5	c_{media}	Desv.	Intervalo
(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	Estándar	de
							confianza
0,076	0,093	0,118	0,093	0,085	0,093	0,0158	0,01

g) Cuantificación de Fe total soluble

						Prueba de Grubbs			
A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A_{media}	Desv.	G_{máx}	G_{mín}	G_{crítico}
						Estándar			(95 %)
0,020	0,022	0,020	0,021	0,025	0,022	0,002	1,640	0,772	1,715

Concentración de Fe total soluble no corregida por el sesgo proporcional

c 1	c 2	c 3	c 4	c 5	c_{media}	Desv.	Intervalo
(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	Estándar	de
							confianza
0,353	0,391	0,353	0,372	0,447	0,3833	0,0386	0,04

Concentración de Fe total soluble corregida por el sesgo proporcional

c 1	c 2	c 3	c 4	c 5	c_{media}	Desv.	Intervalo
(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	Estándar	de
							confianza
0,16	0,17	0,16	0,16	0,20	0,17	0,0175	0,02

h) Concentración de Fe³⁺ soluble corregida por el sesgo proporcional

c 1	c 2	c 3	c 4	c 5	c_{media}	Desv.	Intervalo
(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	Estándar	de
							confianza
0,08	0,08	0,04	0,08	0,12	0,08	0,03	0,03