

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE MERCURIO
TOTAL EN CABELLO POR ESPECTROSCOPÍAS DE ABSORCIÓN ATÓMICA
CON GENERADOR DE HIDRUROS Y DIFERENCIAL DE EFECTO ZEEMAN
CON PIROLIZADOR**

LUZ HELENA SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA
BOGOTÁ, 2009

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE MERCURIO
TOTAL EN CABELLO POR ESPECTROSCOPIAS DE ABSORCIÓN ATÓMICA
CON GENERADOR DE HIDRUROS Y DIFERENCIAL DE EFECTO ZEEMAN
CON PIROLIZADOR**

LUZ HELENA SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

Trabajo de grado como requisito parcial
para optar al título de magíster en toxicología

Directora:

ELENA E. STASHENKO,
Química, Ph.D.

Codirectores:

JOSÉ RICARDO URREGO NOVOA
Químico Farmacéutico, Magíster en Toxicología.
LUZ YOLANDA VARGAS FIALLO,
Química, Magíster en Química

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA
BOGOTÁ, 2009

RESUMEN

TÍTULO: COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL EN CABELLO POR ESPECTROSCOPIAS DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERADOR DE HIDRUROS Y DIFERENCIAL DE EFECTO ZEEMAN CON PIROLIZADOR*.

AUTOR: SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, Luz Helena **.

PALABRAS CLAVES: Mercurio, cabello, absorción atómica, hidruros, Zeeman.

DESCRIPCIÓN: El cabello es ampliamente utilizado para el biomonitoreo de la exposición a mercurio (Hg). Los métodos de determinación de Hg convencionales requieren entre 100-150 cabellos e implican una digestión química. El objetivo de este trabajo fue el de validar y comparar el método de absorción atómica diferencial de Zeeman con pirolizador (ZAAS), con el método convencional de espectrometría de absorción atómica con generador de hidruros. El ZAAS se basa en la atomización del Hg contenido en la muestra por medio de un pirolizador (RP-91C) y la subsiguiente determinación de Hg en el RA-915* por espectrometría de absorción atómica (AAS) sin llama, con corrección de fondo basada en el efecto Zeeman. La precisión (% de coeficiente de variación) fue de <8%, y la exactitud (% de recuperación) cercana al 100%, para los tres materiales certificados de referencia (IAEA-086, 085 y NIES No.13) analizados por las dos metodologías. Los resultados obtenidos por los dos métodos en 50 muestras de cabello con concentraciones entre 0.32 y 52µg Hg/g, muestran una alta concordancia individual. El intervalo de confianza del 95% para la diferencia, como la prueba t indican que no hay evidencia de diferencias significativas entre las mediciones obtenidas con cada uno de los métodos ($t = -1,38$, Valor $P=0,172$; $L_{Inf}=-0,052$, $L_{Sup}=0,009$). Para estudios epidemiológicos que requieren gran cantidad de determinaciones, el método ZAAS se constituye en una alternativa que aporta resultados confiables, a bajo costo, en corto tiempo y con mínimo impacto ambiental, pues obvia el tratamiento de la muestra con reactivos químicos.

* Trabajo de Grado.

** Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología, Directora: Elena E. Stashenko, Química Ph D.

ABSTRACT

TITLE: COMPARISON OF TWO METHODS OF MERCURY DETERMINATION IN HAIR: HYDRIDE GENERATION ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY AND ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY WITH ZEEMAN BACKGROUND CORRECTION AND PYROLYSIS*.

AUTHOR: SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, Luz Helena**.

KEY WORDS: Mercury, hair, atomic absorption, hydride, Zeeman.

DESCRIPTION: Hair samples are widely used for biomonitoring of mercury (Hg) exposure. The traditional methods require 100 – 150 hair strands and involve chemical digestion. The main goals of this work were the validation of a methodology for mercury determination in hair samples using Atomic Absorption Spectrometry with Zeeman background correction (ZAAS), and also the comparison between ZAAS and hydride generation technique. ZAAS principle is the mercury atomization by pyrolysis (attachment RP-91C), and then, the determination of the total mercury content by atomic absorption spectrometry. In this work, the precision and the accuracy of both methods were determined using certified material of reference (AEA-086, 085 and NIES No.13). The results showed a precision (variance coefficient, %) lower than 8%, and an accuracy (percentage recovery) of almost 100%, for both techniques (ZAAS and hydride generation). The analysis of 50 hair samples (0.32-52µg Hg/g) with both techniques showed high individual agreement. Furthermore, there was no significant difference between the results obtained by each analytical technique ($t = -1,38$, $P=0,172$; $L_{Inf}=-0,052$, $L_{Sup}=0,009$). In epidemiological studies, it is recommendable to use ZAAS because it is a low cost technique with excellent results, it does not require long time of analysis and besides it is environmentally friendly.

* Final Project

** Faculty of Medicine, Department of Toxicology, Director: Elena E. Stashenko, Chemistry, Ph. D.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	27
1. OBJETIVOS.....	16
2. MARCO TEÓRICO	17
2.1 TOXICOCINÉTICA.....	17
2.2 TOXICODINAMIA	19
2.2.1 Metilmercurio	21
2.2.2 Mercurio elemental y compuestos inorgánicos de mercurio	23
2.3 FUENTES DE EXPOSICIÓN	24
2.4 BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN AL MERCURIO	26
2.5 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE MERCURIO	28
2.6 OTRAS TECNOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE MERCURIO	33
2.6.1 Espectrómetro de Absorción Atómica RA-915+ con aditamento RP-91C para análisis de muestras sólidas	34
2.6.1.1 Atomizador	35
2.6.1.2 Analizador	36
2.7 VALIDACIÓN	37
2.7.1 NTC-ISO/IEC 17025	37
2.7.2 Validación interna de metodologías analíticas	37
2.7.3 Principales figuras de mérito	38
2.7.3.1 Límite de detección	38
2.7.3.2 Límite de cuantificación.....	39
2.7.3.3 Linealidad.....	39
2.7.3.4 Sensibilidad.....	40
2.7.3.5 Precisión	40
2.7.3.6 Exactitud	40
2.7.3.7 La carta de control analítico	41
2.8 INCERTIDUMBRE EN LAS MEDIDAS ANALÍTICAS “U”	42
2.8.1 Fuentes de incertidumbre	42
2.8.2 Evaluación de la incertidumbre	46
2.8.2.1 Combinación	47
2.8.3 Expresión de la incertidumbre.....	47
2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
2.9.1 Errores aleatorios.....	48
2.9.2 Errores sistemáticos	48
2.9.3 Propagación de errores en los cálculos aritméticos.....	48
2.9.4 El contraste t para datos emparejados	49
2.9.5 Análisis de varianza (ANOVA)	49
3. METODOLOGÍA	51
3.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CABELLO.....	51
3.1.1 Origen de las muestras	51

3.1.2 Recolección de las muestras	52
3.1.3 Almacenamiento de las muestras	52
3.1.4. Homogeneización de las muestras	53
3.1.5 Lavado de las muestras	54
3.2 PREVALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA HGAAS	55
3.2.1 Verificación de patrones y reactivos	55
3.2.2 Verificación del material volumétrico.....	57
3.2.2.1 Protocolo de lavado y secado.....	57
3.2.2.2 Verificación de balones aforados, volumen IN.....	57
3.2.2.3 Verificación del material volumétrico ajustado por vaciado “EX”.....	58
3.2.2.4 Cálculo del volumen.....	59
3.2.3 Verificación de equipos.....	59
3.2.3.1 Verificación de la balanza analítica METTLER TOLEDO AB240.....	59
3.2.3.2 Equipo de absorción atómica.....	60
3.2.3.4 Equipos menores	60
3.2.4 Revisión de la técnica y los procedimientos.....	60
3.2.4.1 Principio	61
3.2.4.2 Preparación de la curva de calibración	61
3.2.4.2 Procedimiento de digestión de la muestra	62
3.2.4.3 Procedimiento de manejo del equipo de absorción atómica con generador de hidruros.....	63
3.3 VALIDACION INTERNA DEL METODO PARA LA CUANTIFICACION DE MERCURIO POR LA TECNICA DE ABSORCION ATOMICA CON GENERADOR DE HIDRUROS.....	63
3.3.1 Determinación de límite de detección	63
3.3.2 Determinación de límite de cuantificación.....	64
3.3.3 Intervalo de validación y construcción de la curva de calibración	64
3.3.4 Linealidad.....	64
3.3.5 Sensibilidad.....	65
3.3.6 Precisión	65
3.3.7 Exactitud	66
3.3.8 Determinación de la incertidumbre	66
3.3.8.1 Caracterización de las fuentes individuales de incertidumbre.....	66
3.3.8.2 Cálculo de las contribuciones individuales.....	71
3.3.8.3 Incertidumbre estándar combinada.....	71
3.3.9 Control de la calidad analítica	72
3.4 PREVALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA ZAAS	72
3.4.1 Material de referencia certificado	72
3.4.2 Verificación de equipos.....	73
3.4.2.1 Balanza analítica METTLER TOLEDO AG285	73
3.4.2.2 Analizador de mercurio RA-915+/RP-91C	73
3.4.3 Revisión de la técnica y los procedimientos.....	73
3.4.3.1 Principio de operación del RA-915+/RP91C	73

3.4.3.2 Cálculo del coeficiente de calibración A.....	74
3.4.3.3 Método	75
3.4.3.4 Determinación del rango óptimo de pesada.....	76
3.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DIFERENCIAL DE ZEEMAN CON PIROLIZADOR.....	76
3.5.1 Determinación del límite de detección	76
3.5.2 Determinación de límite de cuantificación.....	77
3.5.3 Curva de calibración	77
3.5.4 Intervalo de validación y linealidad	77
3.5.5 Precisión	78
3.5.6 Exactitud	78
3.5.7 Cálculo de la incertidumbre.....	78
3.5.7.1 Caracterización de las fuentes individuales de incertidumbre.....	78
3.6 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	80
3.6.1 Selección de las muestras de cabello usadas en la comparación de las metodologías	80
4. RESULTADOS.....	82
4.1 EFECTO DEL LAVADO DE LAS MUESTRAS	82
4.2 PREVALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERADOR DE HIDRUROS.....	82
4.1.2 Verificación el material volumétrico.....	83
4.1.3 Verificación de equipos.....	85
4.1.3.1 Balanza analítica METTLER TOLEDO AB240.....	85
4.1.3.2 Equipo de absorción atómica THERMO ELECTRON S4 con generador de hidruros VP100	85
4.1.3.3 Ajuste de los parámetros de medición del equipo generador de hidruros VP100	86
4.2 VALIDACIÓN INTERNA DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERADOR DE HIDRUROS.....	90
4.2.1 Límite de detección.....	91
4.2.2 Límite de cuantificación.....	92
4.2.3 Curva de calibración	93
4.2.4 Linealidad.....	95
4.2.5 Sensibilidad.....	95
4.2.6 Precisión	96
4.2.7 Exactitud	99
4.2.8. Control de la calidad analítica para la determinación de Hg por la técnica HG-AAS	101
4.3 DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA DE GENERADOR DE HIDRUROS.....	102
4.3.1 Pesada de las muestras.....	102
4.3.1.1 Incertidumbre estándar en la división de la escala de la balanza	102

4.3.1.2	Incertidumbre estándar en la calibración de la balanza	102
4.3.1.3	Incertidumbre combinada en la pesada de las muestras	103
4.3.1.4	Incertidumbre estándar relativa para la pesada de las muestras	103
4.3.2	Incertidumbre generada en la dilución de las muestras por adición de reactivos en el proceso de digestión	103
4.3.2.1	Incertidumbre generada en la adición de 1,25 mL de ácido sulfúrico	103
4.3.2.2	Incertidumbre generada en la adición de 0,5 mL de ácido nítrico	105
4.3.2.3	Incertidumbre generada por la adición de 10 mL de agua destilada.....	106
4.3.2.4	Incertidumbre generada en la adición de 2,5 mL de permanganato de potasio	108
4.3.2.5	Incertidumbre generada en la adición de 1 mL de persulfato de potasio	109
4.3.2.6	Incertidumbre generada en la adición de 0,66 mL de cloruro de hidroxilamina.....	110
4.3.2.7	Incertidumbre combinada para la dilución de las muestras por adición de reactivos	110
4.3.2.8	Incertidumbre estándar relativa para la dilución de las muestras a 15,91 mL.....	111
4.3.3	Incertidumbre debida a la precisión en la medida de las muestras.....	111
4.3.4	Incertidumbre generada en la elaboración de la curva de calibración	112
4.3.4.1	Incertidumbre generada en la preparación de las soluciones patrón	112
4.3.4.2	Incertidumbre estándar debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones	117
4.3.4.3	Incertidumbre estándar relativa debida a la curva de calibración	120
4.3.5	Incertidumbre combinada del método	120
4.4	INCERTIDUMBRE EXPANDIDA	122
4.4.1	Cálculo de la incertidumbre expandida en la concentración del analito	122
4.4.2	Expresión del resultado.....	122
4.5	PREVALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DIFERENCIAL DE ZEEMAN CON PIROLIZADOR.....	123
4.5.1	Verificación de equipos.....	123
4.5.1.1	Calibración de la balanza.....	123
4.5.1.2	Equipo de absorción atómica diferencial con efecto Zeeman con pirolizador ..	123
4.6	VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DIFERENCIAL DE ZEEMAN CON PIROLIZADOR.....	126
4.6.1	Límite de detección	126
4.6.2	Límite de cuantificación.....	127
4.6.3	Intervalo de validación y Curva de calibración	128
4.6.4	Rango dinámico lineal.....	131
4.6.5	Sensibilidad.....	132
4.6.6	Precisión	132
4.6.7	Exactitud	136
4.7	CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE	138

4.7.1 Cálculo de la incertidumbre para el análisis de cabellos de concentración inferior a 5µg/g de mercurio por la técnica de ZAAS.....	138
4.7.1.1 Pesada de las muestras.....	138
4.7.1.2 Incertidumbre estándar en la división de la escala de la balanza	138
4.7.1.3 Incertidumbre estándar en la calibración de la balanza	138
4.7.1.3 Incertidumbre combinada en la pesada de las muestras.....	139
4.7.1.4 Incertidumbre estándar relativa para la pesada de las muestras	139
4.7.1.5 Incertidumbre debida a la precisión en la medida de las muestras.....	139
4.7.1.6 Incertidumbre generada en la elaboración de la curva de calibración	140
4.7.1.7 Incertidumbre estándar generada en la pesada de los CRM	140
4.7.1.8 Incertidumbre estándar generada al leer los patrones en el equipo RA-915+/RP-91C	140
4.7.1.9 Incertidumbre estándar relativa generada en la elaboración de la curva de calibración.....	142
4.7.1.10 Incertidumbre combinada del método	142
4.7.1.11 Incertidumbre expandida.....	144
4.7.1.12 Cálculo de la incertidumbre expandida en la concentración del analito	144
4.7.1.13 Expresión del resultado.....	144
4.7.2 Cálculo de la incertidumbre para el análisis de cabellos de concentración superior a 5µg/g de mercurio por la técnica de ZAAS	144
4.7.2.1 Pesada de las muestras.....	144
4.7.2.2 Incertidumbre debida a la precisión en la medida de las muestras.....	145
4.7.2.3 Incertidumbre generada en la elaboración de la curva de calibración	146
4.7.2.4 Incertidumbre estándar generada en la pesada de los CRM	146
4.7.2.5 Incertidumbre estándar generada al leer los patrones en el equipo RA-915+/RP-91C	146
4.7.2.6 Incertidumbre estándar relativa generada en la elaboración de la curva de calibración.....	147
4.7.2.7 Incertidumbre combinada del método	148
4.7.2.8 Incertidumbre expandida.....	149
4.7.2.9 Cálculo de la incertidumbre expandida en la concentración del analito	149
4.7.2.10 Expresión del resultado.....	150
4.8 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	150
4.8.1 Prueba de normalidad.....	150
4.8.2 Comparación estadística de los métodos.....	151
4.8.5 Prueba de Bland & Altman.....	152
5. CONCLUSIONES	153
6. RECOMENDACIONES	155
7. BIBLIOGRAFÍA.....	156
8. ANEXOS	164

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Métodos más frecuentemente utilizados para la cuantificación de mercurio y sus respectivos límites de detección.	30
Tabla 2. Propagación de errores en los cálculos aritméticos	49
Tabla 3. Reactivos, patrones y CMR que se usaron en la validación del método para cuantificar Hg en cabello por la técnica HGAAS.....	56
Tabla 4. Identificación de las fuentes de incertidumbre.	68
Pesada de las muestras	68
Tabla 5. Verificación del material volumétrico.....	83
Tabla 6. Parámetros de medida para el espectrofotómetro de absorción atómica.	86
Tabla 7. Parámetros de medición para el generador de hidruros.	90
Tabla 8. Medidas de mercurio en 7 blancos de reactivos adicionados con Hg (300 ng).....	91
Tabla 9. Valores de absorbancia obtenidos en la lectura de 5 curvas de calibración por la técnica de HG-AAS.....	93
Tabla 10. Medidas de la concentración de mercurio realizadas a una muestra de cabello de baja concentración.....	96
Tabla 11. Medidas de la concentración de mercurio realizadas a una muestra de cabello de alta concentración.....	98
Tabla 12. Determinaciones de mercurio realizadas a un CRM de cabello de $0.573 \pm 0.039 \mu\text{g/g}$ de mercurio para la evaluación de la exactitud.	99
Tabla 13. Determinaciones de mercurio realizadas a un CRM de cabello de $4.42 \pm 0.20 \mu\text{g/g}$ de mercurio para la evaluación de la exactitud.	100
Tabla 14. Determinaciones de mercurio realizadas a un CRM de cabello de $23.2 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$ de mercurio para la evaluación de la exactitud.....	100
Tabla 15. Medidas realizadas diariamente a un patrón de $6 \mu\text{g/g}$ de Hg para la elaboración de la carta de control analítico.....	101
Tabla 16. Desviación estándar ponderada para el análisis de las muestras de cabello por la técnica HG-AAS.....	111
Tabla 17. Diseño experimental elaborado para la curva de calibración.....	118
Tabla 18. Determinación del rango óptimo de pesada para muestras de cabello.	125
Tabla 19. Determinación del límite de detección realizado sobre una muestra de cabello de baja concentración de Hg.	126
Tabla 20. Datos usados en la elaboración de la curva de calibración para la cuantificación de muestras de baja y media concentración de mercurio.	128
Tabla 21. Datos usados en la elaboración de la curva de calibración para la cuantificación de muestras de alta concentración de mercurio.....	130
Tabla 22. Determinación de la precisión intra-ensayo utilizando el CRM IAEA 086 ($0.57 \pm 0.039 \mu\text{g/g}$).....	133
Tabla 23. Determinación de la precisión intra-ensayo utilizando el CRM NIES 13 ($4.42 \pm 0.20 \mu\text{g/g}$).....	133

Tabla 24. Determinación de la precisión intra-ensayo utilizando el CRM IAEA 085 (23.2±0,8 µg/g).....	133
Tabla 25. Determinación de la precisión inter-ensayo utilizando el CRM IAEA 086 (0,57±0,039 mg/kg).....	134
Tabla 26. Determinación de la precisión inter-ensayo utilizando el CRM IAEA 086 (0,57±0,039 mg/kg).....	134
Tabla 27. Determinación de la precisión inter-ensayo utilizando el CRM IAEA 085 (23.2±0,8 mg/kg).....	135
Tabla 28. Determinación de la precisión inter-ensayo utilizando el CRM IAEA 085 (23.2±0,8 mg/kg).....	135
Tabla 29. Evaluación de la exactitud realizada mediante el cálculo del porcentaje de recuperación.	137
Tabla 30. Desviación estándar ponderada para el análisis de las muestras de cabello por la técnica ZAAS.....	140
Tabla 31. Desviación estándar ponderada para el análisis de las muestras de cabello por la técnica ZAAS.....	145

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama “causa efecto” para la determinación de la incertidumbre	67
Figura 2. Diagrama “causa efecto” que relaciona cada una de las fuentes de incertidumbre para la cuantificación de mercurio por la técnica de generador de hidruros.....	79
Figura 3. Verificación del material volumétrico. a. Pipeta de 1 mL. b. Pipeta de 2 mL. c. Pipeta de 5 mL. d. Pipeta de 10 mL. e. Bureta de 25 mL. f. Balón aforado de 100 mL.....	84
Figura 4. Influencia de la velocidad de la bomba en las determinaciones de mercurio por la técnica de HG-AAS. Condiciones: HCl 50%, flujo del gas de arrastre: 100 mL/min, concentración de NaBH ₄ 1%.....	87
Figura 5. Influencia del flujo de gas de arrastre sobre las determinaciones de mercurio por la técnica de HG-AAS. Condiciones: HCl 50%, Velocidad de la bomba: 40 rpm, concentración de Na BH ₄ 1%.....	88
Figura 6. Influencia de la concentración de NaBH ₄ sobre las determinaciones de mercurio por la técnica de HG AAS Condiciones: HCl 50%, Velocidad de la bomba: 40 rpm y flujo del gas de arrastre: 100mL/min.	89
Figura 7. Curva de calibración para la determinación de mercurio por la técnica de generador de hidruros.....	94
Figura 8. Carta de control analítico para las determinaciones de Hg por la técnica HG-AAS.	101
Figura 9. Contribución de incertidumbre calculada en la cuantificación de Hg por la técnica HG-AAS.....	121
Figura 10. Dependencia del coeficiente de calibración A con el tiempo de calentamiento de la unidad adjunta. RP- 91C (pirolizador).....	124
Figura 11. Curva de calibración usada en el análisis de muestras de cabello de concentración inferior a 5 µg/g de mercurio.....	129
Figura 12. Curva de calibración para concentraciones superior a 5 µg/g de Hg.....	130
Figura 13. Contribución de incertidumbre para cada fuente calculada en la cuantificación de Hg por la técnica ZAAS.	143
Figura 14. Contribución de incertidumbre para cada fuente calculada en la cuantificación de Hg por la técnica ZAAS.	149
Figura 15. Correlación lineal	151
Figura 16. Diferencia contra promedio.....	152

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Foto 1. Recolección de la muestra de cabello. Marzo de 2008. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander.....	52
Foto 2 Almacenamiento de las muestras. Marzo de 2008. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander.	53
Foto 3. Homogeneización de las muestras. Marzo de 2008. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander.	53

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A.....	164
Volumen ocupado por 1.000g de agua pesada en aire contra pesas de acero inoxidable.*	164
ANEXO B.....	165
Valores de la distribución t de student para un 95 % de confianza.....	165
ANEXO C.....	166
Procedimiento de manejo del equipo de absorción atómica con generador de hidruros.....	166
ANEXO D.....	168
Procedimiento de manejo del RA-915+/RP91C.....	168
ANEXO E.....	178
Requisitos de precisión a diferentes concentraciones basados en la ecuación de Horwitz/Thompson	178

LISTA DE ACRÓNIMOS

ASS	Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometría de Absorción Atómica).
AES	Atomic Emission Spectroscopy (Espectroscopia de Emisión Atómica).
AFS	Atomic Fluorescence Spectroscopy (Espectroscopia de Fluorescencia Atómica).
ASTM	American Society for Testing and Materials (Sociedad Americana para Ensayos y Materiales).
ASV	Anodic Stripping Voltammetry (Voltamperometría de Redisolución Anódica).
CH₃Hg⁺	Metilmercurio.
(CH₃)₂Hg	Dimetilmercurio.
CVAAS	Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry (Espectroscopia de Absorción Atómica de Vapor Frío).
CVAFS	Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry (Espectroscopia de Fluorescencia Atómica de Vapor Frío).
DL	Detection Limit (Límite de Detección)
EPA	U.S. Environmental Protection Agency (Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos).
E_r	Error relativo.
HCl	Ácido Clorhídrico.
HNO₃	Ácido nítrico.
H₂SO₄	Ácido sulfúrico.
Hg	Mercurio.

Hg-S	Mercurio en sangre
Hg-U	Mercurio en orina
Hg(OH)₂	Hidróxido de mercurio.
mg/kg	Miligramos por kilogramo.
min	Minutos.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ppb	Partes por billón.
ppm	Partículas por millón.
ppt	Partes por trillón.
RSD	Relative Estándar Deviation (Desviación Estándar Relativa).
MS	Espectrometría de masas
SD	Estándar Deviation (Desviación Estándar del Método).
-SH	Grupo sulfhídrico.
ZAAS-HFM	Zeeman Atomic Absorption Spectrometry-High Frequency Modulator (Espectrometría de Absorción Atómica Diferencial de Zeeman, usando Modulación de Alta Frecuencia).

INTRODUCCIÓN

El mercurio es uno de los elementos con mayor riesgo ambiental y se considera un contaminante global, debido a su amplio uso, alta toxicidad y extensa distribución.

El mercurio puede ingresar al organismo por diferentes vías: inhalatoria, cutánea, digestiva y placentaria y su toxicidad depende de la forma química, por tanto los síntomas y signos varían según se trate de exposición al mercurio elemental, a los compuestos inorgánicos de mercurio o a compuestos orgánicos. Estudios recientes parecen indicar que el mercurio tal vez carezca de umbral por debajo del cual no se producen algunos efectos adversos. El mercurio puede causar efectos deletéreos en los sistemas nervioso, digestivo, respiratorio, inmunitario y en los riñones, además de provocar daños pulmonares y cardiovasculares.¹

Dentro de las principales fuentes naturales del mercurio están la desgasificación de la corteza terrestre, las emisiones volcánicas y la evaporación de las masas acuáticas naturales. Entre las fuentes antropógenas están la extracción minera, la utilización de los combustibles fósiles, la fundición de metales, la producción de cemento, la industria de compuestos alcalinos de cloro y la incineración de desechos. Otras aplicaciones del mercurio son las industrias eléctrica y de instrumentos de precisión, amalgamas dentales y algunos agentes terapéuticos.²

En Colombia la presencia del mercurio se debe principalmente a su uso en la industria y a las actividades de minería artesanal del oro^{3,4} con condiciones de trabajo muy precarias desde la perspectiva de la seguridad e higiene laboral. La recuperación del oro artesanal se basa en la molienda del material rocoso seguido de la formación de una amalgama con mercurio, que por tener un peso específico

mayor que el oro, puede ser recuperado manualmente, separando el Hg por medio del calor, lo que provoca la volatilización del metal pesado⁵, exponiendo no solo a la población ocupacional sino también a la población general.

Estas actividades tanto industriales como artesanales generan desechos tóxicos que se vierten al ambiente y ocasionan la contaminación en varios medios, incluyendo los alimentos que consume el hombre. Adicionalmente, dada la habilidad del mercurio para acumularse en los tejidos biológicos, podría influenciar toda la cadena alimenticia.

En este orden de ideas, es necesario contar con biomarcadores de exposición que permitan hacer intervenciones tempranas especialmente en la población más susceptible. El cabello es un buen indicador de la exposición al mercurio a través de fuentes como la dieta, el ambiente y la ocupación, debido a que el metal se acumula en sus proteínas que poseen en abundancia grupos sulfhídricos⁶ y además permite evaluar la contaminación a través del tiempo. Por tal razón, es importante disponer de técnicas analíticas de tal precisión y exactitud, que al ser aplicadas a una matriz como el cabello, aporten resultados confiables.

En general los métodos de rutina para la determinación de mercurio en cabello son muy laboriosos y consumen mucho tiempo, debido al tratamiento previo de la muestra, cuando se puede perder el analito por su volatilidad y puede surgir su contaminación, se requiere entre 100 y 150 cabellos. Como una alternativa, el mercurio total se puede medir directamente en matrices sólidas, usando instrumentos automatizados comerciales. Estos sistemas integran la combustión de la muestra seguida de su análisis por espectrofotometría de absorción atómica.

En este proyecto se evaluó la equivalencia de los resultados de determinación de mercurio en cabello, obtenidos por dos metodologías. La primera es un método

térmico acoplado a sistemas de detección, y la segunda es un método “clásico” ampliamente utilizado, absorción atómica con generador de hidruros.

La presente investigación fue financiada por el Laboratorio de Cromatografía y por el Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander.

El texto está dividido en cuatro partes principales. En la primera, se expone el marco teórico, que comprende las generalidades sobre el mercurio y validación de métodos analíticos, entre otros. En la segunda, se describe de manera detallada la parte experimental de este trabajo, la cual incluyó la validación de los métodos de espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros, espectrofotometría de absorción atómica diferencial con efecto Zeeman, determinación de la incertidumbre y la comparación de las metodologías determinando la concordancia individual de los resultados. Posteriormente, se presenta la discusión de los resultados obtenidos y, finalmente se exponen las conclusiones y recomendaciones derivadas de este proyecto.

1. OBJETIVOS

1.1 GENERAL

Comparar las metodologías de espectroscopía de absorción atómica con generador de hidruros y diferencial de Zeeman con pirolizador en la determinación de mercurio total en cabello.

1.2 ESPECÍFICOS

- ❖ Validar el método de espectroscopía de absorción atómica diferencial de Zeeman con pirolizador para determinación de mercurio total en cabello
- ❖ Validar el método de espectroscopía de absorción atómica con generador de hidruros para determinación de mercurio total en cabello
- ❖ Evaluar los resultados obtenidos por ambas metodologías en términos de confiabilidad analítica
- ❖ Aplicar las dos metodologías para determinación de mercurio en cabello de personas tanto expuestas como no expuestas a mercurio.

2. MARCO TEÓRICO

La toxicidad del mercurio se conoce bien desde la antigüedad (Hipócrates, Plinio y Galeno). El mercurio es el 80^{vo} elemento de la Tabla Periódica de elementos. El mercurio es el único elemento que se encuentra en la naturaleza en varias formas químicas y físicas. A temperatura ambiente, el mercurio elemental (o metálico) existe como un líquido con una alta presión de vapor y, consecuentemente está presente en el ambiente como vapor de mercurio. El mercurio también existe como un catión, en estados de oxidación de +1 (mercurioso) ó +2 (mercúrico). De las formas orgánicas de mercurio, el metilmercurio es el componente más frecuentemente encontrado en el ambiente. Éste se forma principalmente como el resultado de metilación de formas inorgánicas (mercúrico) de mercurio, por microorganismos en el agua⁷.

En el ambiente, los humanos y animales son expuestos a numerosas formas químicas de mercurio, incluyendo vapores de mercurio elemental (Hg), cationes mercurioso (Hg(I)), mercúrico (Hg(II)) y compuestos de mercurio orgánico⁸.

2.1 TOXICOCINÉTICA

Teóricamente el mercurio y sus compuestos pueden entrar al organismo por las siguientes rutas: gastrointestinal, inhalatoria, cutánea o placentaria.

La cinética del mercurio comprende básicamente las siguientes etapas:

1). Absorción: los vapores de mercurio elemental tienen una alta presión que les permite liberarse fácilmente al ambiente y dependiendo de su grado de solubilidad en agua, éstos se depositan en diferentes niveles del tracto respiratorio. Los

compuestos inorgánicos de mercurio que ingresen al organismo por vía pulmonar, como en el caso de aerosoles, son absorbidos en menor grado que los del mercurio metálico.

En el tracto gastrointestinal el mercurio elemental se absorbe en cantidades mínimas, su solubilidad dependerá de la posibilidad de oxidación del mercurio o de la formación de sulfuros. La absorción de los compuestos inorgánicos de mercurio por la vía gastrointestinal depende del tipo de sal que forman. Para los compuestos mercuriosos, que casi no son solubles en agua, se puede esperar una baja absorción; sin embargo, pueden ser parcialmente convertidos a iones mercúricos en el lumen gastrointestinal, que se absorben más fácilmente.

Cuando el mercurio se aplica sobre la piel en vehículos adecuados, se puede absorber, especialmente cuando ocurre su oxidación. Los compuestos mercuriales solubles se han utilizado en desórdenes dermatológicos y en ocasiones se han observado efectos sistémicos, después de la terapia.

Los estudios experimentales sobre los mercuriales inorgánicos parecen demostrar una barrera importante a la penetración de éstos al feto, contrario a los mercuriales orgánicos. Los mercuriales orgánicos ofrecen alto grado de peligro cuando son inhalados, ya que son altamente volátiles. Cuando su ingreso es por ingesta, su absorción es superior al 90%; se encuentran en la literatura informes de intoxicación por contacto con metilmercurioacetamida a través de la piel. El metil y etilmercurio atraviesan fácilmente la barrera placentaria, y se acumulan en el feto⁹.

2). Distribución: los cationes mercuriales, tanto orgánicos como inorgánicos, reaccionan con gran variedad de ligandos orgánicos que se encuentran en moléculas biológicas importantes. Los iones de mercurio inorgánico se distribuyen

en los tejidos y en pocas horas se encuentran en riñones, hígado, sangre, mucosa respiratoria, pared intestinal y colon, piel, glándulas salivales, corazón, músculo esquelético, cerebro y pulmón, en orden descendente de cantidad acumulada. Después de una semana, del 85 a 95% de todo el mercurio inorgánico del organismo se almacena en el riñón⁷. Los mercuriales orgánicos debido a su capacidad de atravesar membranas celulares y su gran resistencia a la biotransformación en los tejidos, se depositan principalmente en el sistema nervioso central¹⁰.

3) Eliminación: el mercurio absorbido se elimina principalmente por la orina, aunque también se encuentran sus trazas en las heces, debido a su secreción dentro del lumen gastrointestinal, especialmente a nivel de colon, por bilis, saliva y jugos gástricos e intestinales. La eliminación empieza inmediatamente se absorbe y continúa a velocidades altas. El almacenamiento en el riñón, y en menor grado la eliminación urinaria, indican la severidad de la exposición. La vida media del mercurio es de aproximadamente dos meses. Los alquilmercuriales de cadena corta, debido a su capacidad de atravesar membranas presentan recirculación enterohepática, especialmente, el metilmercurio, por eso, se considera, que los alquilmercuriales son más tóxicos que las otras formas mercuriales, debido a que el organismo humano los absorbe más pero lo excreta en menor cantidad. Adicionalmente, una porción de lo eliminado por la bilis se encuentra unido a proteínas y la otra está formada por complejos mercuriales de bajo peso molecular.

2.2 TOXICODINAMIA

La actividad toxicológica del ión mercúrico y mercurioso está dada principalmente por la interacción molecular que ocurre en sitios nucleofílicos, y blancos relacionados, de la célula. Sin embargo, cuando se considera la actividad biológica

del ión mercuríco en humanos y otros mamíferos, se deben tener en cuenta las propiedades de unión de este ion. Los iones mercurícos tienen una gran afinidad con los átomos de sulfuro reducidos, especialmente, con aquellas moléculas endógenas que contienen tioles, tales como glutatión, cisteína, metalotioneína, homocisteína, N-acetilcisteína, y albúmina¹¹. La constante de afinidad para la unión del mercurio con los aniones tiolatos es del orden de 10^{15} – 10^{20} . Por comparación, la constante de afinidad de la unión del mercurio a ligandos que contienen oxígeno o nitrógeno es de alrededor de 12 veces menor en magnitud. Sin embargo, el efecto biológico del mercurio orgánico o inorgánico está relacionado con su interacción con grupos sulfhidrilos. La interacción molecular del mercurio con grupos sulfhidrilos en moléculas de albúmina, metalotioneína, glutatión, y cisteína han sido implicados en los mecanismos de recaptación, acumulación, transporte, y toxicidad de iones mercurícos¹¹.

La mayoría del mercurio presente en plasma es unido a la albúmina y a otras proteínas grandes. Se conoce, que el sistema de transporte del anión orgánico no moviliza conjugados mercurícos de proteínas dentro de las células epiteliales tubulares. Sin embargo, los ligandos de conjugados mercurícos de bajo peso molecular son las principales especies de mercurio captadas en la membrana basolateral por el transporte de aniones orgánicos¹².

Uno de los principales efectos intracelulares del mercurio es la inducción y unión de metalotioneína¹³. Las metalotioneínas son pequeñas proteínas intracelulares con un peso molecular aproximado de 6 a 7 kDa. Ellas contienen numerosos residuos de cisteína y tienen la capacidad de unir varios metales, incluyendo mercurio inorgánico, cadmio, zinc, hierro, plata, y platino. La administración de una simple, diaria y no tóxica dosis de cloruro de mercurio por varios días, se ha evidenciado que causa un doblamiento cercano en la concentración de metalotioneína en la corteza renal o medular en ratas¹⁴. La síntesis aumentada de

metalotioneína en el riñón también ha sido demostrada en ratas expuestas a vapores de mercurio sobre el curso de varios días¹⁵. Los vapores de mercurio son convertidos dentro a mercurio inorgánico, el cual es recobrado predominantemente (~98%) en los riñones, sugiriendo que la inducción de metalotioneína en los riñones después de exponerse al mercurio elemental puede ser mediada por mercurio inorgánico.

La toxicidad del mercurio depende de su forma química y, por lo tanto, los síntomas y signos varían según se trate de exposición al mercurio elemental, a los compuestos inorgánicos de mercurio, o a los compuestos orgánicos de mercurio (en particular los compuestos de alquilmercurio como sales de metilmercurio y etilmercurio, y el dimetilmercurio)¹⁶.

Aunque es bien sabido que el mercurio y sus compuestos son sustancias muy tóxicas cuyos efectos potenciales deben ser detenidamente estudiados, el grado de toxicidad de estas sustancias, sobre todo la del metilmercurio, está actualmente en discusión¹⁷. Las investigaciones de la última década muestran que los efectos tóxicos pueden generarse a concentraciones más bajas, y que podrían afectar a más población mundial de lo que se había pensado. Como los mecanismos de ciertos efectos tóxicos sutiles y la demostración de su existencia, son cuestiones sumamente complejas, todavía no se ha llegado a comprender en su totalidad este problema^{18,19}.

2.2.1 Metilmercurio

Entre los compuestos orgánicos de mercurio, el metilmercurio ocupa un lugar especial porque mucha población está expuesta a él, y su toxicidad está mejor caracterizada que la de otros compuestos orgánicos de mercurio. Se considera

que, dentro del grupo de los compuestos orgánicos de mercurio, los compuestos de alquilmercurio (en particular, etilmercurio y metilmercurio) son similares en cuanto a toxicidad (además, ambos han sido utilizados como plaguicidas). En cambio, otros compuestos orgánicos de mercurio, como el fenilmercurio, se asemejan más al mercurio inorgánico en lo que respecta a toxicidad²⁰.

El metilmercurio es un neurotóxico muy bien documentado, que puede provocar efectos perjudiciales particularmente en el cerebro en formación^{21,22} Además, este compuesto traspasa con facilidad la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica; por eso es muy preocupante la exposición durante el embarazo⁹.

Asimismo, algunos estudios indican que incluso un pequeño aumento en la exposición al metilmercurio puede causar efectos perjudiciales en el sistema cardiovascular y un incremento en la mortalidad.

Considerando la importancia de las enfermedades cardiovasculares en todo el mundo, estos resultados, aunque no estén confirmados, sugieren que las exposiciones al metilmercurio requieren más atención y un seguimiento adicional. Además, basándose en su evaluación general, el Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer (*International Agency for Research on Cancer, IARC*, 1993) considera que los compuestos de metilmercurio pueden ser carcinógenos para los seres humanos (grupo 2B).

2.2.2 Mercurio elemental y compuestos inorgánicos de mercurio

La vía principal de exposición al mercurio elemental es por inhalación de sus vapores. Cerca del 80% de los vapores inhalados se absorbe por los tejidos pulmonares¹⁵. Este vapor también penetra con facilidad al cerebro y su neurotoxicidad está bien documentada²³. La absorción intestinal de mercurio elemental es baja. El mercurio elemental puede oxidarse en los tejidos corporales a la forma divalente inorgánica⁷.

Se han observado trastornos neurológicos y de comportamiento en seres humanos tras inhalación de vapor de mercurio elemental. Algunos de los síntomas son: temblores, labilidad emocional, insomnio, pérdida de la memoria, cambios en el sistema neuromuscular y dolores de cabeza. Se han observado asimismo efectos en el riñón y la tiroides. Las exposiciones altas también han ocasionado mortalidad. En cuanto a carcinogenicidad, la evaluación general del *IARC* (1993) concluye que el mercurio metálico y los compuestos inorgánicos de mercurio no son clasificables en cuanto a carcinogenicidad para los seres humanos (grupo 3). Por consiguiente, los efectos neurotóxicos, como la inducción de temblores, podrían constituir el efecto crítico que sirva de base para la evaluación de riesgos. También deberían considerarse los efectos en riñones (túbulo renal), pues son el punto de destino crítico en lo que a exposición a compuestos inorgánicos de mercurio se refiere²⁴. Puede que el efecto sea reversible, pero como la exposición de la población general tiende a ser continua, el efecto puede seguir siendo relevante.

2.3 FUENTES DE EXPOSICIÓN

Las fuentes de exposición al Hg varían notablemente de una a otra forma de mercurio. En cuanto a los compuestos de alquilvercurio, de los cuales el metilvercurio es el más importante, la fuente de exposición más significativa es la dieta, particularmente la dieta a base de pescados y mariscos^{25,26}. En el caso del vapor de mercurio elemental, la fuente más importante para la población en general son las amalgamas dentales, pero a veces la exposición en el ambiente de trabajo puede ser muchas veces mayor^{15,27}. En lo que respecta a compuestos inorgánicos de mercurio, los alimentos constituyen la fuente más importante para la mayoría de la gente. Sin embargo, para ciertos segmentos de la población, el uso de cremas y jabones, que contienen mercurio para aclarar la piel y el empleo del mercurio con propósitos culturales/rituales o en medicina tradicional, también puede conducir a la exposición a mercurio inorgánico o elemental²².

El empleo del mercurio en diferentes actividades productivas a nivel mundial es muy grande. Algunos de los procesos antropógenos más importantes que movilizan impurezas de mercurio son la generación de energía y calor a partir del carbón; la producción de cemento; y la minería y otras actividades metalúrgicas que comprenden la extracción y procesamiento de materiales minerales, como la producción de hierro y acero, zinc y oro. Algunas fuentes importantes de liberaciones antropógenas que se producen a raíz de la extracción y el uso intencional del mercurio comprenden la minería del mercurio; la minería del oro y la plata en pequeña escala; la producción de cloro alcalino; el uso de lámparas fluorescentes, faros de automóviles, manómetros, termostatos, termómetros y otros instrumentos y su rotura accidental; las amalgamas dentales; la fabricación de productos que contienen mercurio; el tratamiento de desechos y la incineración de productos que contienen mercurio; los vertederos y la cremación.²⁸

En los países, en los cuales se practica la minería del mercurio o se utiliza el mercurio para la minería en pequeña escala del oro o la plata, estas fuentes pueden ser muy importantes²⁹. En Colombia, por ejemplo, el oro constituye una de las riquezas naturales más importantes con las que se cuenta, pero la tecnología tradicionalmente empleada para la recuperación de las partículas finas de oro se ha basado en la molienda del material rocoso seguida de la formación de una amalgama con mercurio, que por tener un peso específico mayor que el oro, puede ser recuperado manualmente. El paso siguiente del proceso involucra la separación del Hg por medio del calor, lo que provoca la volatilización del metal pesado⁵.

En el proceso de amalgamiento un exceso de Hg siempre es utilizado, alcanzándose, en la región amazónica, relaciones Hg: Au de 0,6 a 1,3 (CETME, 1989). El exceso del metal pesado se pierde como pequeñas gotas y pasa a contaminar los suelos o los ríos, donde las colas de molino son depositadas, produciendo los llamados puntos críticos³⁰. Asimismo, el Hg volatilizado regresa al suelo por la acción del agua de lluvia y la asociación del metal pesado con las partículas más finas hace que la erosión hídrica o eólica contribuya a su dispersión.

La presencia de Hg en el ambiente tiene implicaciones importantes por los efectos tóxicos que produce en los seres vivos, ya que es un metal que se acumula en los tejidos blandos y provoca enfermedades irreversibles e incluso la muerte^{31,32}. Por esta razón, es necesario conocer los niveles del elemento en los componentes del ecosistema, a fin de identificar oportunamente posibles focos de contaminación y de esta forma, establecer medidas para la remediación o inmovilización de este elemento.

2.4 BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN AL MERCURIO

El diagnóstico de la intoxicación por mercurio depende de la forma de exposición, aguda o crónica, de la clase de mercurio responsable de la intoxicación, de la cantidad absorbida y de las manifestaciones clínicas³³.

En general, la exposición a Hg es monitoreada con mercurio en sangre (Hg-S) para exposiciones agudas o accidentales, y con mercurio en orina (Hg-U), para exposiciones ocupacionales a niveles ambientales constantes, sin olvidar, que la tasa de Hg-S total puede tener grandes variaciones según la población en la que se mide. Así, es muy alto en aquellos grupos humanos con dieta basada en pescado (Hg-S 40 µg/L), mientras que en poblaciones con dieta no basada en pescado, el Hg-S está por debajo de 10 µg/L. El Hg-U muestra marcada variación circadiana, que inclusive no puede compensarse totalmente corrigiéndola por densidad o excreción de creatinina. Por este hecho, la muestra puntual ha sido descartada y reemplazada por orina de 24 horas. En no expuestos, el Hg-U generalmente está por debajo 10 µg/L^{4,34}. El BEI Hg de la ACGIH es Hg-U menor a 40 µg/L, Hg-S menor de 30 µg/L.

Para el biomonitoreo de exposición a metilmercurio, las determinaciones de mercurio en cabello y en sangre son las más comúnmente usadas, específicamente la determinación en cabello es apoyada por la Agencia para las Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades, como medida de exposición del metilmercurio (Departamento de Estados Unidos de la Salud y de Servicios Humano, 1999).

El uso de esta matriz biológica en diversas investigaciones en el mundo, ha permitido demostrar varios efectos deletéreos del mercurio. Por ejemplo, en un

estudio realizado en Minamata se encontró una alta correlación entre los niveles del mercurio en pelo maternal y las secuelas de neurodesarrollo en sus descendientes. Otras investigaciones realizadas en muestras de autopsias de pobladores de Suecia³⁵, mostraron una correlación altamente significativa entre niveles de mercurio en cabello y corteza renal e hígado, resultados similares fueron obtenidos en Polonia³⁶, donde además se encontró una alta correlación con los niveles en cerebelo, hecho que ya se había mostrado en pobladores de Japón, donde además se encontró una correlación entre el mercurio contenido en cabello con el hallado en corazón, bazo, cerebro, hígado, corteza y medula renal³⁷.

Cuando se compara con la muestra de sangre y orina, el cabello tiene varias ventajas en aspectos como la recolección de la muestra dado que no es un procedimiento invasivo, reduce el riesgo de transmisión de enfermedades, no requiere supervisión médica³⁸ y es una matriz que se puede almacenar por largo tiempo. Además, permite trazar los cambios dinámicos a lo largo de la longitud del pelo indicando un promedio de tiempo de exposición de semanas a meses. Varios estudios demuestran que la concentración total del mercurio en cabello puede reflejar las concentraciones medias del metilmercurio que circulan en la sangre³⁹. No obstante, teniendo en cuenta que la vida media del metilmercurio en el cuerpo es cerca de 1.5-2 meses^{20,40}, el pelo más cercano al cuero cabelludo refleja las exposiciones recientes que también contribuyen a la concentración actual de la sangre⁴¹.

Por otra parte, bajo condiciones razonablemente constantes de la exposición, las concentraciones humanas del mercurio en cabello (en $\mu\text{g/g}$) son aproximadamente 250 a 300 veces más altas que las encontradas en sangre (en $\mu\text{g/mL}$) (EPA 2001). Sin embargo, los cocientes de concentración expresados como coeficientes de la regresión parecen variar algo en los grupos europeos y americanos de la población^{42,43}. Por tanto, la concentración del mercurio en cabello necesita ser

interpretada teniendo en cuenta características individuales y no se debe asumir como un indicador uniforme de la concentración en sangre o del nivel de exposición oral. Además, se debe considerar que el mercurio ambiental también se puede incorporar al cabello⁴⁴, mientras que los tratamientos permanentes del pelo pueden quitar el mercurio endógeno del pelo⁴⁵⁻⁴⁷, a su vez, el color del pelo puede afectar la concentración del mercurio^{19,41}.

En relación con los valores de referencia para Colombia, se utilizan los recomendados por el Instituto Nacional de Salud. Estos valores en población no expuesta expresados como mercurio total, son⁴⁸:

Sangre: $\leq 20 \mu\text{g/L}$ (según el Centro Toxicológico de Quebec, CTQ).

Orina: $\leq 50 \mu\text{g/L}$ (según el Centro Toxicológico de Quebec, CTQ).

Cabello: $\leq 5 \mu\text{g/g}$ (Según la Organización Mundial de la Salud).

En este orden de ideas, es necesario contar con biomarcadores de exposición que permitan hacer intervenciones tempranas, especialmente en la población más susceptible. Como se mencionó en párrafos anteriores, el cabello se constituye en un buen indicador de la intoxicación crónica con mercurio, debido a que el metal es acumulado en las proteínas del mismo, ya que en ellas abundan los grupos sulfhídricos⁴⁹. En ese sentido, es importante disponer de técnicas analíticas de tal precisión y exactitud que al ser aplicadas a una matriz como el cabello, aporten resultados confiables.

2.5 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE MERCURIO

El análisis de los metales en muestras biológicas y ambientales es complicado por las diferentes formas orgánicas e inorgánicas del metal, en las cuales puede

encontrarse. Para el mercurio, esta complicación es usualmente superada por reducir todo el mercurio de la muestra a su estado elemental antes del análisis; esta solución no es apropiada cuando se desea información sobre de las especies individuales de mercurio.

El mercurio tiene el problema adicional de ser relativamente volátil, por lo tanto, la muestra se pierde fácilmente durante su preparación y el análisis. Para solucionar estas complicaciones, varios métodos han sido desarrollados para determinar las cantidades trazas del mercurio en muestras biológicas y ambientales, aún en medios complejos. Se debe prestar una cuidadosa atención para evitar contaminación de la muestra con mercurio, especialmente cuando se determinan concentraciones trazas. También se debe prestar atención en la preservación de la muestra y de esta forma, evitar alterar la distribución del mercurio en la muestra. La preservación de muestras acuosas se logra a menudo usando la acidificación. Sin embargo, la materia suspendida se debe quitar antes de la acidificación, el dimetilmercurio y el Hg (0) tienen que ser eliminados, pues puede ocurrir la conversión de estas especies en metilmercurio y mercurio (II). Para las matrices sólidas, el método de la preservación de opción es el congelamiento; éste, preserva todas las especies de mercurio indefinidamente.

Muchas investigaciones han estado enfocadas a determinar los niveles del mercurio en la sangre, la orina, los tejidos y el cabello de seres humanos y de animales. Los métodos que se han utilizado son colorimétrico de la ditizona, la espectroscopía de absorción atómica (AAS)⁵⁰, la espectroscopía de fluorescencia atómica (AFS)⁵¹ o el análisis por activación de neutrón (NAA)⁵². Además, también se han probado los métodos basados en espectrometría de masas (MS), espectrofotometría y voltamperometría de redisolución anódica (ASV). (Véase **Tabla 1**). De los métodos disponibles, el vapor frío (CVAAS) es el más ampliamente utilizado.

En la mayoría de los métodos, el mercurio en la muestra se reduce al estado elemental. Algunos métodos requieren la predigestión de la muestra antes de la reducción. En todas las fases de la preparación y del análisis de la muestra, la posibilidad de contaminación del mercurio encontrado naturalmente en el ambiente debe ser considerada, por tanto, deben seguirse estándares rigurosos para prevenirla.

Tabla 1. Métodos más frecuentemente utilizados para la cuantificación de mercurio y sus respectivos límites de detección.

Método	Límite de detección reportado
Método colorimétrico de ditizona	0,01-0,1 mg/g
Espectrometría de absorción atómica - horno de grafito (GF AAS)	1 ng/g
	0,01-1 ng/g
	0,001-0,01 ng/g
Análisis por activación neutrónica- instrumental (INAA)	1-10 ng/g
- Radioquímica (RNAA)	0,01-1 ng/g
Cromatografía gaseosa - detector de captura electrónica	0,01-0,05 ng/g
- Detector de emisión atómica	~ 0,05 ng/g
- Espectrometría de masas	0,1 ng/g
- CVAAS / CVAFS	0,01-0,05 ng/g
Cromatografía líquida de alta eficiencia - detector de ultra-violeta	1 ng/mL
-CVAAS	0,5 ng/mL
-CVAFS	0,08 ng/mL
- Electroquímico	0,1-1 ng/mL
Plasma acoplado inductivamente - espectrometría de masas (ICP MS)	0,01 ng/mL
- Espectrometría de emisión atómica (ICP AES)	2 ng/mL
Espectrometría foto-acústica	0,05 ng
Fluorescencia de rayos X	5 ng/g - 1 mg/g
Métodos electroquímicos	0,1-1 mg/g

Fuente: Tomado de Mesquita R, Silveira Bueno M.I., Jardim W. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. Química Nova, 23 (4) (2000).

Entre los diferentes procedimientos físicos y químicos, que deben aplicarse a la muestra, previos a la determinación de mercurio, dependiendo del tipo de matriz con que se trabaje y el método utilizado, se encuentra la descomposición, cuando se utilizan algunos ácidos inorgánicos concentrados, tales como el clorhídrico (HCl), nítrico (HNO₃) y el sulfúrico (H₂SO₄), con el fin de digerir el material orgánico y solubilizar el mercurio en la fase acuosa. Para la digestión del cabello también se pueden usar bases fuertes (KOH, NaOH), oxidantes (H₂O₂, KMnO₄, K₂S₂O₈), radiación de microondas y temperaturas elevadas. Otro de los procedimientos empleados es la separación del metal, la cual puede realizarse por diferentes procesos, tales como la volatilización del mercurio, la precipitación de metales, la extracción del mercurio y la absorción, por medio de técnicas cromatográficas y de intercambio iónico.

Los métodos para determinación de mercurio inorgánico y de mercurio orgánico (sobre todo metil-mercurio) han sido reportados en muestras como sangre, orina, cabello, y leche materna⁵³. El mercurio total se determina típicamente usando CVAAS después de la conversión completa de todo el mercurio a la forma elemental volátil usando ácido nítrico/ácido, bromato/bromuro perclórico, digestiones agresivas, seguidas de la reducción del mercurio iónico su forma elemental. El mercurio inorgánico se puede determinar después de digestiones más suaves (HCl, ácido sulfúrico) y de la reducción. La forma orgánica es determinada por la diferencia entre total e inorgánica. El metil-mercurio también se determina usando cromatografía de gases con detector de captura de electrones (ECD).

Las técnicas instrumentales más frecuentemente empleadas para la medición de las concentraciones de mercurio en cabello incluyen la espectroscopía de absorción atómica-vapor frío (CVAAS)^{58,59}, espectroscopía de fluorescencia-vapor frío⁶⁰, plasma acoplado inductivamente a espectrometría de masas (ICP-MS),

plasma acoplado inductivamente a espectrometría de emisión atómica (ICP-AES)⁶¹. Además, el contenido de mercurio en cabello ha sido medido por análisis de activación neutrónica (NAA)⁶² y fluorescencia de rayos X⁶³. La sensibilidad de NAA es similar a la de CVAAS, pero las recuperaciones y la precisión variables hacen NAA, menos confiable.

En general, todos los métodos para determinación de mercurio en cabello humano son en alguna medida muy laboriosos y consumen mucho tiempo. Como un enfoque alternativo, el mercurio total puede ser medido directamente en matrices sólidas y líquidas por medio de instrumentos comerciales automatizados⁶³.

Cada una de estas técnicas tiene sus propias ventajas, pero también los métodos muestran algunos problemas comunes, tales como baja reproducibilidad, análisis prolongado y “adaptabilidad” limitada a las muestras. Pero, la principal dificultad que presentan los métodos analíticos para la determinación del mercurio y de cualquier metal, en las diferentes matrices, es el tratamiento de la muestra. Infortunadamente, muchos materiales de interés, tales como tejidos animales, minerales y derivados del petróleo, no son solubles en los disolventes comunes, y con frecuencia, requieren un tratamiento previo laborioso, con ácidos concentrados y bases fuertes y calentamiento, para obtener una disolución de analito adecuada para la atomización. Generalmente, esta etapa de descomposición y disolución es la que consume más tiempo y cuando el trabajo se hace más intenso; además, frecuentemente se presenta la contaminación ambiental o la pérdida de las especies volátiles de mercurio, y se introducen más errores que en la propia medida espectroscópica.

En general, una desventaja de los métodos de detección espectroscópica, es que requieren que la muestra se encuentre disuelta en medio acuoso, para que pueda

ser introducida, posteriormente, a la fuente de excitación; esto se logra aplicando procedimientos que implican digestión ácida y calentamiento.

La técnica de espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros, (HG-AAS) que se utilizó en el presente estudio, es un método de atomización aplicable a la determinación de mercurio, ya que es el único elemento metálico que tiene una presión de vapor apreciable a temperatura ambiente, pero esta técnica ha sido un problema para los usuarios de absorción atómica, pues requiere únicamente de la óptica del equipo (se utiliza sin llama) y la reacción externa (donde se libera el mercurio de la matriz) se lleva a cabo en un generador de hidruros, con celdas y reactores diferentes a los empleados con los demás metales que se analizan por este método.

2.6 OTRAS TECNOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE MERCURIO

El método de pirólisis acoplado a la AAS proporciona una alternativa muy atractiva para la determinación de mercurio⁶⁴⁻⁶⁶. Un análisis de rutina requiere solamente de 5 minutos, ya que no es necesario la preparación de la muestra o procesos de derivatización, sino que el análisis se realiza directamente sobre las muestras sólidas, que pueden ser de naturaleza diversa.

En los métodos de absorción atómica se presentan dos tipos de interferencias, a saber: 1. Las interferencias espectrales, que se producen cuando la absorción o emisión de una especie interferente se solapa o aparece muy próxima a la absorción o emisión del analito, de modo que su resolución por el monocromador resulta imposible; 2. Las interferencias químicas, que se producen como consecuencia de diversos procesos químicos, que ocurren durante la atomización y alteran las características de la absorción del analito.

Para corregir las interferencias espectrales debidas a los componentes de la matriz, se han desarrollado varios métodos, dentro de los cuales se destaca el de la corrección de fondo por el efecto Zeeman, el cual ha sido introducido en algunas tecnologías que emplean el método de pirólisis para la preparación de la muestra y la determinación del mercurio.

Una de las tecnologías, que se utilizó para realizar el presente estudio, consiste en un espectrómetro de absorción, analizador de mercurio con corrección de Zeeman RA-915⁺, manufacturado por Lumex Ltda. (San Petersburgo, Rusia)⁶⁴, con modulación de alta frecuencia y luz polarizada, acoplado al aditamento de pirólisis PR-91C. Este equipo ha sido utilizado en diversas investigaciones alrededor del mundo, en temas relacionados con la determinación del mercurio en ambientes contaminados, muestras biológicas, productos medicinales, gas natural, entre otros⁶⁷.

2.6.1 Espectrómetro de Absorción Atómica RA-915+ con aditamento RP-91C para análisis de muestras sólidas

La determinación de mercurio en cabello, se basa en la atomización del mercurio contenido en la muestra por medio de un aditamento de pirólisis (RP-91C) y la subsiguiente determinación de mercurio en el analizador RA-915⁺, por espectrometría de absorción atómica (AAS) sin llama⁶⁴. El analizador hace la corrección del fondo (debido a interferencias espectrales) basada en el efecto Zeeman. En este caso, la preparación de la muestra consta de la recolección, almacenamiento, y pesado del cabello, además, no se requiere la acumulación previa del mercurio sobre algún adsorbente (este es un paso que involucran los métodos tradicionales de análisis del mercurio).

2.6.1.1 Atomizador

El principio de operación del aditamento (RP-91C) se fundamenta en la destrucción térmica de la matriz de la muestra y la reducción del mercurio de un estado enlazado a un estado atómico⁶⁸.

El atomizador consta de dos secciones, las cuales son calentadas a 800⁰C independientemente. La muestra se coloca en una “navecilla” (portamuestra) y se inserta en la primera sección del atomizador. En él, los compuestos volátiles (los compuestos orgánicos del mercurio) son evaporados y permanecen sin disociar, produciendo una gran cantidad de humo y otras sustancias, los cuales incrementan la absorción de fondo de la radiación de la resonancia del mercurio. Posteriormente, todos los compuestos gaseosos formados se transportan hacia la segunda sección del atomizador por un gas portador (generalmente aire), donde todas las sustancias del mercurio se disocian completamente; el humo y los otros componentes interferentes son calcinados hasta formar agua y dióxido de carbono, principalmente. Después del atomizador, el flujo de gas entra a la celda analítica del aditamento. El efecto de algunos compuestos residuales es eliminado con la corrección de fondo, que hace el analizador.

2.6.1.2 Analizador

En el analizador se realiza la determinación de la cantidad de mercurio elemental, formado previamente en el pirolizador (aditamento RP-91C). Su sistema de operación se basa en la espectrometría de absorción atómica diferencial de Zeeman, usando modulación de alta frecuencia (ZAAS) de la polarización de la luz.

Una lámpara de mercurio es colocada en un campo magnético permanente, H . La línea de resonancia del mercurio ($\lambda = 254 \text{ nm}$) es dividida en tres componentes polarizados de Zeeman (π , σ^- y σ^+ , respectivamente). Cuando la radiación se propaga a lo largo de la dirección del campo magnético, un fotodetector detecta únicamente la radiación de las componentes σ , una de éstas cae dentro del perfil de las líneas de absorción del mercurio y la otra se sitúa por fuera. Cuando el vapor de mercurio está ausente en la celda, la diferencia entre las intensidades de la radiación de los componentes σ son iguales. Cuando los átomos absorbentes aparecen en la celda, la diferencia entre las intensidades de los componentes σ se incrementa conforme crece la concentración de vapor de mercurio.

Las componentes σ son separadas por el modulador de polarización. Los componentes interferentes no afectan las lecturas del analizador, ya que el desplazamiento espectral de las componentes σ es significativamente más pequeño en comparación con los anchos de las bandas a absorción molecular y del espectro de dispersión que presenta la absorción de fondo de estos compuestos. Cuando la concentración de mercurio en la muestra analizada es muy baja, la sensibilidad del análisis se mejora utilizando una celda multipaso con una longitud efectiva de 10 m aproximadamente. De esta forma, se logra aumentar el porcentaje de átomos de mercurio que absorben la radiación σ^- en la celda analítica.

2.7 VALIDACIÓN

Validar un método analítico consiste en verificar y documentar su validez para un uso predicho⁶⁹. El proceso de verificación se realiza experimentalmente y la documentación se obtiene siguiendo un protocolo que incluye la evaluación de parámetros matemático-estadístico y operativo-económico, sobre la metodología.

2.7.1 NTC-ISO/IEC 17025

La norma internacional ISO/IEC 17025 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración”, en su segunda edición, especifica que los laboratorios deben aplicar métodos y procedimientos apropiados para todos los ensayos o las calibraciones dentro de su alcance.

Cuando el cliente no especifique el método a utilizar, el laboratorio debe seleccionar los métodos apropiados que hayan sido: publicados en normas internacionales, publicados en libros o revistas técnicas especializadas, publicados por organizaciones técnicas reconocidas o especificados por el fabricante del equipo. También se pueden utilizar los métodos desarrollados por el laboratorio o los métodos adoptados por el laboratorio, si son apropiados para el uso previsto y si han sido validados⁷⁰.

2.7.2 Validación interna de metodologías analíticas

La validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico

previsto. El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y las modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para ser aplicados⁷¹⁻⁷³.

2.7.3 Principales figuras de mérito

Dentro de la evaluación estadística de una metodología analítica se deben especificar los parámetros de calidad; estos parámetros describen los rangos y condiciones de trabajo de las técnicas, sus atributos y sus limitaciones, en los siguientes 7 ítems se describen algunos de los más importantes⁷⁴⁻⁷⁶.

2.7.3.1 Limite de detección

El límite de detección (LD) se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado.

En una definición más reciente, la ISO [ISO, 1997] introduce el término general “concentración neta mínima detectable” como la concentración neta verdadera del analito en el material sujeto a análisis que conducirá, con una probabilidad $(1-\alpha)$, a la conclusión de que la concentración de analito en el material analizado es mayor que la de un blanco. La IUPAC [IUPAC, 1995], en un documento preliminar, proporciona una definición similar y adoptaba el término ‘valor (verdadero) mínimo detectable’, como equivalente al límite de detección.

De acuerdo con las definiciones de la ISO y la IUPAC, el LD es un parámetro del método analítico definido *a priori*, porque se fija *antes* de que se realice la medida.

El LD es pues esencialmente diferente a la decisión sobre si se detecta un analito o no, puesto que dicha decisión se toma una vez se conoce el resultado de la medida⁷⁷.

2.7.3.2 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la concentración más baja que se puede determinar por un método analítico de forma reproducible, con criterios de exactitud y precisión conocidos. En el laboratorio el límite de cuantificación se realiza mediante la preparación de un número estipulado de blancos a los cuales se realiza la cuantificación del analito de interés⁷⁸.

2.7.3.3 Linealidad

La linealidad y el rango de un procedimiento analítico son su habilidad, dentro de un rango dado, para obtener resultados directamente proporcionales a la cantidad (concentración) de analito en la muestra para las cuales se ha demostrado que el método analítico tiene un nivel adecuado de precisión y exactitud.

Para asegurar la linealidad de un método se debe calcular la regresión lineal y sus valores residuales. Estos últimos representan la diferencia entre el valor observado y el valor calculado o predicho con la ecuación obtenida de la regresión lineal. La linealidad se confirma si los valores residuales se distribuyen de forma aleatoria pero si la distribución tiene tendencia sistemática indica que no es lineal.

2.7.3.4 Sensibilidad

Es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración. Normalmente, se mide como la pendiente de la curva de calibración. Como valor se puede reportar el promedio de las curvas obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar⁷⁹.

2.7.3.5 Precisión

La precisión es el grado de repetibilidad de un método analítico bajo condiciones de operación normal. Se expresa como porcentaje de coeficiente de variación (%CV) para un número significativo de muestras. Existen diferentes formas de expresar la precisión de una serie de datos de las cuales se destacan.

Repetibilidad: es el resultado del método de operación en un corto intervalo de tiempo bajo las mismas condiciones (es la precisión inter-ensayos). Esto se debe determinar desde un mínimo de nueve determinaciones que cubran el rango especificado por el procedimiento (tres niveles con tres repeticiones cada uno)

Precisión intermedia: Es el resultado que se da debido a las variaciones aleatorias dentro del laboratorio. Estas variaciones pueden ser: días diferentes, analistas diferentes, equipo, etc.⁷⁹.

2.7.3.6 Exactitud

La exactitud en una metodología analítica puede únicamente ser determinada con referencia a un valor conocido o “valor verdadero”. Una medida exacta es la que al mismo tiempo es precisa y libre de error. La exactitud se puede determinar de dos formas: la primera, por comparación directa con una referencia estándar conocida, tal como una de control de calidad o con material certificado; la segunda por

comparación directa con un estándar analizado con una técnica alternativa que se considere el estándar o el patrón de oro⁸⁰.

Para documentar la exactitud, se debe tener un mínimo de nueve determinaciones en un mínimo de 3 niveles de concentración que cubren el rango especificado (por ejemplo, tres concentraciones con tres réplicas de cada uno). Los datos se reportan como porcentaje de recuperación (% R) de la cantidad de muestra adicionada o como la diferencia entre el promedio y el valor verdadero con intervalos de confianza.

El % R se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{\text{Cantidad Experimental}}{\text{Cantidad Real}} \times 100$$

Es pertinente mencionar la diferencia fundamental entre exactitud y precisión. La exactitud mide la concordancia entre un resultado y su valor verdadero; la precisión mide la concordancia entre varios resultados⁷⁷. La precisión se determina sólo repitiendo una medición, en tanto que la exactitud no puede determinarse cabalmente ya que no es posible conocer el valor verdadero de una cantidad; así, en su lugar se debe emplear un valor aceptado.

2.7.3.7 La carta de control analítico

La carta de control analítico es una herramienta estadística que permite monitorear el comportamiento de los resultados de una metodología a lo largo del tiempo. En la mayoría de las organizaciones se lleva una carta de control analítico para las metodologías de interés. La carta se construye midiendo a lo largo del tiempo una muestra o un patrón de referencia; con el acumulado de las mediciones se calcula la desviación estándar de las medidas y se fijan unos límites. Los límites de advertencia y los límites de control; los límites de

advertencia, por lo general corresponden a dos desviaciones estándar por debajo y por encima del promedio de las mediciones y los límites de control, tres desviaciones estándar por debajo y por encima del promedio de las mediciones.

2.8 INCERTIDUMBRE EN LAS MEDIDAS ANALÍTICAS “U”

En la búsqueda de resultados confiables, los analistas observan, que una muestra analizada un número definido de veces proporciona diferentes valores aunque cada una de las determinaciones se realice de la misma muestra y bajo condiciones de trabajo idénticas. Los resultados varían dentro de un rango. Esto es debido a los errores que se pudieron cometer durante el análisis. Cada paso a seguir durante el análisis tiene asociado un error inherente, al cometer dichos errores, las medidas realizadas no serán verdaderas, variarán dentro de un rango llamado incertidumbre. Es necesario identificar cada una de las fuentes de incertidumbre, evaluarlas y finalmente, estimar el aporte de cada fuente a la incertidumbre total del análisis.

Es fundamental diferenciar los términos “error” e “incertidumbre”. Error es la diferencia entre el valor medido y el valor convencionalmente verdadero, del objeto que se está midiendo. Incertidumbre es la cuantificación de la duda que se tiene sobre el resultado de la medición. Cuando sea posible, se trata de corregir los errores conocidos por ejemplo, aplicando las correcciones indicadas en los certificados de calibración. Pero cualquier error que, no se conozca su valor, es una fuente de la incertidumbre⁷⁹

2.8.1 Fuentes de incertidumbre

Un análisis en particular está compuesto en la mayor parte de los casos por varios pasos, cada uno de ellos tiene asociado un valor de incertidumbre en la medida,

por ejemplo, la pesada de una muestra está influenciada por factores internos y externos que afectan el valor reportado por la balanza⁷⁶.

A continuación, se describe en forma detallada cada fuente de error al pesar.

❖ Corrección por flotación

Un error por flotación afectará los datos si la densidad del objeto que se pesa difiere significativamente de los pesos estándar. El origen de este error es la diferencia de la fuerza de flotación ejercida por el medio (aire) sobre el objeto y los pesos estándar. La corrección para la flotación se obtiene por medio de la siguiente ecuación:

$$W_1 = W_2 + W_2 \left(\frac{d_{aire}}{d_{objeto}} - \frac{d_{aire}}{d_{pesa}} \right)$$

En donde W_1 es la masa corregida del objeto, W_2 es la masa de los pesos estándar, d_{objeto} es la densidad del objeto, d_{pesa} es la densidad de los pesos y d_{aire} es la densidad del aire desplazado por ellos y tiene un valor de 0.0012 g/cm^3 ,⁷⁶.

❖ Efectos de la temperatura

Los intentos para pesar un objeto, cuya temperatura es diferente a la del ambiente, darán como resultado un error significativo. La causa más común de este problema es el tiempo necesario para que el objeto que se ha calentado regrese a la temperatura ambiente. Los errores debidos a la diferencia de temperatura tienen dos fuentes. Primero, las corrientes de convección dentro de la balanza ejercen un efecto de flotación sobre el platillo y el objeto. Segundo, el aire caliente atrapado en el recipiente cerrado pesa menos que el mismo volumen a menor temperatura⁷⁶.

❖ **División de escala de la balanza**

Dependiendo del modelo de balanza usada, varía la división de la escala es decir, con cuántos decimales se obtiene el valor de pesada en una balanza determinada, el último decimal en la escala es un decimal incierto, ésta será una fuente de incertidumbre en la medida, como también lo es el reporte de calibración llamado error máximo y la precisión de la balanza. Estas fuentes de incertidumbre deben ser calculadas y evaluadas de acuerdo con la ley de propagación de errores para encontrar la incertidumbre durante la pesada de una sustancia.

❖ **Medición de un volumen**

La medición precisa del volumen es tan importante para muchos métodos analíticos como la medición precisa de la masa. Existen en general dos clases de material volumétrico: de llenado *in*, volumen preciso en el interior del recipiente como en el caso de matraces aforados; y de volumen *ex*, volumen preciso una vez descargado el recipiente como en el caso de pipetas. El fabricante del material reporta las condiciones bajo las cuales se calibró el material y la tolerancia de la medida⁷⁶.

❖ **Tolerancia del material volumétrico**

Son los límites de aceptación que se han elegido para un producto, esto depende de la capacidad de llenado.

❖ **Efecto de la temperatura sobre la medición del volumen**

El volumen ocupado por una determinada masa de un líquido varía con la temperatura, lo mismo que sucede con el recipiente que contiene al líquido durante la medición. La mayor parte de dispositivos para mediciones volumétricas

se fabrica con vidrio, que tiene un pequeño coeficiente de expansión. En consecuencia, para el trabajo analítico no se debe tener presente como una fuente de incertidumbre en la medida.

Las mediciones volumétricas se deben referir a una temperatura estándar, este punto de referencia por lo general es de 20°C, por tanto, se debe usar una corrección en las medidas de volumen medidos a temperaturas diferentes, dicho factor de corrección se describe en la siguiente ecuación:

$$\pm (V * \Delta T * Z)$$

En donde V es el volumen medido, ΔT la diferencia entre la temperatura de calibración y la experimental y Z el factor de compresibilidad del agua⁷⁶

❖ Incertidumbre generada durante una dilución

El factor de dilución normalmente se emplea cuando se miden elementos químicos en muestras de concentración de masa (mg/L) mayor al intervalo de trabajo del método. El factor de dilución se obtiene a partir de un proceso de dilución y pueden llevarse a cabo n diluciones de la muestra. El modelo matemático de una dilución está dado por la siguiente ecuación:

$$Fd_n = \frac{V_2}{V_1}$$

En donde, Fd_n es el factor de dilución n , V_2 es el volumen de aforo y V_1 el volumen de la alícuota. En el proceso de una dilución se identifican dos fuentes de incertidumbre, el V_2 de aforo y el V_1 de la alícuota de la muestra. La estimación de incertidumbre estándar relativa del factor de dilución (UFd_n), se realiza combinando las incertidumbres de ambas mediciones: volumen de la alícuota de muestra y volumen de aforo, de forma relativa y cuadrática, de acuerdo con la ecuación⁷⁶.

$$\frac{UFd_n}{Fd_n} = \sqrt{\left(\frac{UV_1}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{UV_2}{V_2}\right)^2}$$

❖ Construcción de una curva de calibración

Muchas metodologías necesitan la elaboración de una curva de calibración para la cuantificación del analito de interés, ésta supone la elaboración de una serie consecutiva de patrones a los cuales se mide una propiedad (absorbancia, transmitancia, fluorescencia, etc.), el diseño experimental, supone una correlación lineal entre la concentración (α) y la propiedad medida (γ). Dicha relación en la mayoría de las ocasiones es lineal y se describe mediante la siguiente ecuación:

$$\gamma = m\alpha + b$$

La construcción de esta curva de calibración y la interpolación de los patrones y muestra genera un valor de incertidumbre el cual debe ser combinado con la incertidumbre de la preparación de los patrones para evaluar la incertidumbre en la curva de calibración⁷⁶.

2.8.2 Evaluación de la incertidumbre

En esta etapa deben cuantificarse todas las fuentes de incertidumbre identificadas en la etapa anterior. Hay dos formas de cuantificar las fuentes de incertidumbre:

a) Experimentalmente, es decir, haciendo replicados en el laboratorio. (Incertidumbre Tipo A)

b) Usando información disponible: certificados de calibración, tolerancias del material volumétrico, manuales de instrumentos, etc. (Incertidumbre Tipo B)

Es importante señalar, que todas las componentes de incertidumbre deben expresarse como incertidumbre estándar. En el caso de que la incertidumbre se determine experimentalmente, la incertidumbre estándar se obtiene calculando la desviación estándar de los replicados. Si se utiliza información previa, la incertidumbre estándar se suele obtener dividiendo por $\sqrt{3}$ el intervalo proporcionado por el fabricante (con lo que se supone que el intervalo de confianza sigue una distribución rectangular)⁸¹.

2.8.2.1 Combinación

Una vez que se han calculado todas las fuentes de incertidumbre, éstas deben combinarse siguiendo la ley de propagación de errores. De esta forma, se obtiene una incertidumbre estándar combinada, U_c . El último paso, consiste en calcular la incertidumbre expandida, U . Para ello, debe multiplicarse la incertidumbre estándar por un factor de cobertura, k , ($U=k \cdot u$). Normalmente, k es igual a 2. De esta forma, se obtiene un intervalo donde existe aproximadamente un 95% de probabilidad de que se encuentre el valor verdadero⁷⁹.

2.8.3 Expresión de la incertidumbre

En informes de rutina es suficiente presentar el valor de la incertidumbre expandida. El resultado debe ir junto con la incertidumbre expandida U , como se indica a continuación:

Resultado = $X \pm U$ (unidades)

2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico tiene como objetivo identificar fuentes de error en un conjunto de datos; los errores pueden ser de dos tipos, aleatorios o sistemáticos.

2.9.1 Errores aleatorios

Los errores aleatorios o indeterminados se manifiestan cuando se efectúa una medición, y se deben a numerosas variables no controladas que son parte inevitable de toda medición física o química.

2.9.2 Errores sistemáticos

Los errores sistemáticos tienen un valor definido, una causa conocida y una magnitud semejante a la que tienen las mediciones repetidas efectuadas en la misma forma. Estos errores dan lugar a una tendencia en la técnica de medición, tienen un signo y afectan por igual a todos los datos de un conjunto. Existen tres tipos de errores sistemáticos: (1). Los que se deben al instrumento de medida, ya sea porque tiene pequeños defectos o por inestabilidad de sus componentes; (2). los errores del método que surgen del comportamiento químico o físico no ideal de los sistemas analíticos y (3). los errores personales que se deben al mal manejo del analista por falta de precaución o experiencia.

2.9.3 Propagación de errores en los cálculos aritméticos

Con frecuencia es necesario estimar la desviación estándar de un resultado calculado a partir de dos o más datos experimentales, donde cada uno tiene una desviación estándar conocida. Como se muestra en la Tabla 2, la forma de hacer estos estimados depende del tipo de operaciones aritméticas empleadas.

Tabla 2. Propagación de errores en los cálculos aritméticos

Tipo de cálculo	Ejemplo	Desviación estándar de y
Sumas y restas	$y = a + b - c$	$S_y = \sqrt{S_a^2 + S_b^2 + S_c^2}$
Multiplicaciones o divisiones	$y = \frac{(a \times b)}{c}$	$\frac{S_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{S_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{S_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{S_c}{c}\right)^2}$
Exponenciales	$y = a^x$	$\frac{S_y}{y} = x \frac{S_a}{a}$
Logaritmos	$y = \log_{10} a$	$S_y = 0.434 \frac{S_a}{a}$
Antilogaritmos	$y = \text{antilog}_{10} a$	$\frac{S_y}{y} = 2.303 S_a$

2.9.4 El contraste *t* para datos emparejados

Para comparar dos métodos de análisis por medio del estudio de muestras que contienen, de manera sustancial, diferentes cantidades del analito, se observa la diferencia, *d*, entre cada par de resultados obtenidos por los dos métodos. Si no existen diferencias entre los dos métodos, estas diferencias se obtienen de una población con media $\mu_d = 0$. Para probar la hipótesis nula, se prueba si *d* difiere significativamente de cero utilizando el estadístico *t*.

2.9.5 Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de varianza se puede utilizar para separar la variación debida al error aleatorio de cualquier otra variación. También se puede emplear en situaciones donde hay más de una fuente de variación aleatoria o factor. Las variaciones pueden ser controladas por el operador con el fin de diseñar experimentos intencionalmente que permitan identificar y evaluar las fuentes de variación en una

metodología. Al variar un factor estamos hablando de un ANOVA de un factor, si se varían dos factores el ANOVA es de dos factores, y se mostrará si los resultados son significativamente diferentes al variar un factor.

3. METODOLOGÍA

3.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CABELLO

Una de las etapas más importantes durante el análisis de mercurio en muestras de cabello consiste en la preparación correcta de la muestra. Para garantizar que la muestra de cabello analizada por el método de absorción atómica con generador de hidruros (HG-AAS) o por absorción atómica diferencial con efecto Zeeman (ZAAS) fuera representativa, ésta debió someterse a un proceso adecuado de recolección, almacenamiento y homogeneización.

3.1.1 Origen de las muestras

Las muestras de cabello que se emplearon en este estudio se obtuvieron de los siguientes grupos poblacionales:

- ❖ Pobladores del municipio minero de Segovia del departamento de Antioquia. Estas muestras se tomaron para determinar la concentración de mercurio como parte de la tesis de grado para optar al Título de Magíster en Toxicología de la doctora Yolanda Sandoval. El título de la tesis fue “Alteraciones neurocomportamentales en personas expuestas a mercurio en la actividad minera del oro en el municipio de Segovia (Antioquia). 2005”.
- ❖ Odontólogos y auxiliares de odontología del servicio médico de la Universidad Industrial de Santander.
- ❖ Profesionales del área de Química de la Universidad Industrial de Santander.

- ❖ Personas que presumiblemente poseen mercurio en concentraciones muy bajas: vegetarianos, sin amalgamas dentales y sin exposición ni ocupacional ni ambiental a Hg.
- ❖ Pobladores de los corregimientos en la ribera del río Magdalena del municipio de Puerto Wilches.

3.1.2 Recolección de las muestras

El procedimiento que se siguió fue el siguiente: Una vez seleccionado un mechón de cabello de la zona occipital, éste se cortó lo más cerca posible al cuero cabelludo en una cantidad aproximada de 50 a 100 cabellos. La muestra se fijó con cinta adhesiva a una hoja de papel, especificando cuál era el segmento próximo a la raíz. Se rotuló la hoja con el código del voluntario y fecha de recolección y se depositó en un sobre de papel.

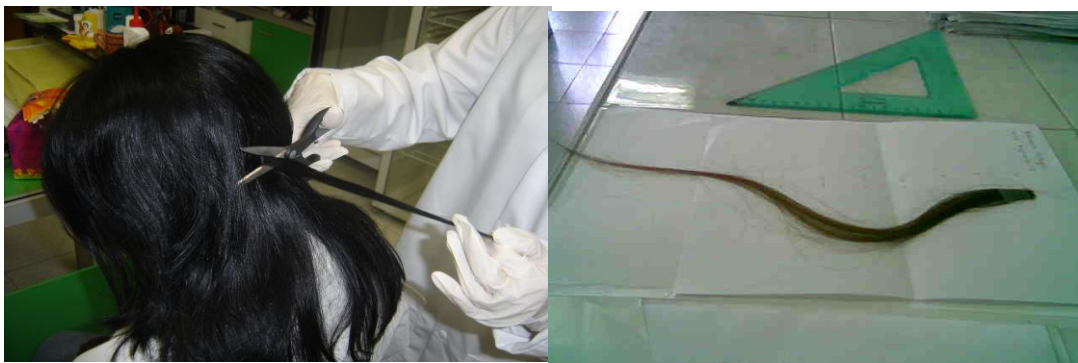


Foto 1. Recolección de la muestra de cabello. Bucaramanga, Marzo de 2008. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander.

3.1.3 Almacenamiento de las muestras

Las muestras se empacaron en bolsas de papel protegidas de la luz y la humedad en un desecador



Foto 2 Almacenamiento de las muestras. Marzo de 2008. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander.

3.1.4. Homogeneización de las muestras

- ❖ Se tomaron los primeros 3 cm del segmento próximo a la raíz del cabello, y se realizó un corte fino, por medio de unas tijeras de acero inoxidable. La longitud de corte fue de 3 mm aproximadamente.
- ❖ Este cabello, finamente cortado, se sometió a un procedimiento de cuarteo que consistió en mezclarlo por medio de una espátula y dividirlo en cuatro porciones; de esas cuatro porciones se tomaron dos, para mezclarlas y dividir las nuevamente en cuatro porciones, y tomar dos; este proceso se repitió 3 veces, para obtener una muestra representativa.



Foto 3. Homogeneización de las muestras. Bucaramanga Marzo de 2008. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander.

3.1.5 Lavado de las muestras

El cabello humano puede contener diversas sustancias como aceites y lacas de origen cosmético que facilitan la adhesión de partículas del medio. Como una forma de verificar si estas sustancias producen algún tipo de interferencias en el análisis de metales, se compararon los resultados de muestras sometidas a un proceso de lavado con muestras analizadas sin lavado previo.

De las técnicas de lavado reportadas en la literatura se escogió la desarrollada por Rodríguez M.C. en la tesis de Magíster en Química de la Universidad de Zulia, Venezuela, en 1996 titulada: "Desarrollo metodológico para la determinación de mercurio en muestras clínicas y biológicas por espectrofotometría de absorción atómica con vapor frío y sistema de inyección en flujo continuo". La técnica consiste en dejar en remojo la muestra de cabello en 5 mL de acetona por 5 minutos, descartar el solvente y repetir el proceso tres veces por un minuto cada vez y dejar secar a temperatura ambiente.

Para verificar si existen diferencias estadísticas significativas en los resultados obtenidos por la técnica HG-AAS, se tomó una muestra y se dividió en dos porciones, una fue sometida al proceso de lavado y la otra no. Cada una de las porciones se analizó 5 veces.

Para verificar el efecto del lavado de las muestras de cabello en la técnica de ZAAS, se seleccionaron aleatoriamente 13 muestras de un grupo de 800. Una porción de cada muestra fue sometida al proceso de lavado y la otra no, las muestras lavadas y sin lavar se analizaron por esta técnica y los resultados se sometieron a un análisis de varianza para identificar diferencias estadísticas significativas.

3.2 PREVALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA HGAAS

La prevalidación es parte integrante y pre-requisito en una validación; consiste en una serie de verificaciones que permiten obtener información relevante y orientar el proceso de la validación propiamente dicha. Antes de iniciar el proceso de validación se revisaron aspectos técnicos y operativos relacionados con cada una de las etapas de la metodología; esto involucró el desempeño en la pesada de las muestras, preparación de reactivos, diluciones, elaboración de la curva de calibración y lectura de los patrones y muestras en el equipo. Todo esto con el fin de garantizar condiciones óptimas de trabajo, en equipos, materiales y en la metodología propiamente dicha. Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander.

3.2.1 Verificación de patrones y reactivos

Se identificaron y localizaron los reactivos, patrones y material de referencia certificado (CRM) necesarios para realizar la validación; éstos se muestran en la **Tabla 3**.

De los reactivos y patrones empleados se revisó su ficha técnica, esto, con el fin de conocer la fecha de vencimiento, precauciones de manejo, pureza, cantidad y conservación del reactivo puro o en solución (si es el caso).

Tabla 3. Reactivos, patrones y CMR que se usaron en la validación del método para cuantificar Hg en cabello por la técnica HGAAS.

Mercurio total HGAAS	Casa Comercial	Procedencia
Acido sulfúrico	Sigma-Aldrich, Lot. 81900	Alemania
Ácido nítrico	Sigma- Aldrich, Lot. 81900	Alemania
Ácido clorhídrico	Sigma- Aldrich, Lot. 81900	Alemania
Permanganato de potasio	J.T. Baker, Lot. 3228-1	EE.UU.
Persulfato de potasio	Merck, Lot. 0057501	Alemania
Clorhidrato de Hidroxilamina	Carlo Erba Lot. 455474	Italia
Patrón de Mercurio (Hg), Certipur (1000mg/L ± 2mg/L)	MERCK	Alemania
CRM de cabello IAEA 086, concentración baja de Hg (0.573 ± 0.039 µg/g)	International Atomic Energy Agency	Austria
CRM de cabello NIES 13, concentración intermedia de Hg (4.42 ± 0.2 µg/g)	National Institute for Enviromental Studies.	Japón
CRM de cabello IAEA 085 concentración alta de Hg. 23.2±0.8 µg/g	International Atomic Energy Agency	Austria

3.2.2 Verificación del material volumétrico

Se verificó el material volumétrico necesario para desarrollar la metodología, se identificó el material aforado que necesitaba ser validado. El material se clasificó como de volumen *in* y de volumen *ex*. Antes de realizar cualquier ensayo, se siguió el protocolo de lavado y secado del material.

3.2.2.1 Protocolo de lavado y secado

Para el lavado y secado del material se siguieron los protocolos a saber:

- ❖ Sumergir completamente el material en una solución de Extrán al 2 % por 2 horas.
- ❖ Enjuagar el material con abundante agua de la llave hasta retirar completamente la capa jabonosa.
- ❖ Enjuagar con solución de ácido nítrico al 10% por 30 minutos.
- ❖ Enjuagar mínimo seis veces con agua desionizada.
- ❖ Disponer el material en el área de secado, el material se debe escurrir y el secado debe ser por goteo. Para esto, los balones se deben almacenar boca abajo y las pipetas y buretas se deben almacenar en forma vertical.
- ❖ Una vez secado el material, se debe guardar para protegerlo del polvo.

3.2.2.2 Verificación de balones aforados, volumen IN

Este material se usó en la preparación de los patrones. El material se verificó con el siguiente protocolo:

- ❖ Secar completamente el material a verificar.

- ❖ Pesar el recipiente a verificar.
- ❖ Determinar la temperatura del líquido de llenado (agua destilada).
- ❖ Llenar el recipiente con el líquido hasta que la parte inferior del menisco quede justo por encima de la marca del aforo.
- ❖ Pesar el recipiente a verificar con su carga.
- ❖ Determinar el peso de la carga por diferencia.
- ❖ Repetir el procedimiento por lo menos 10 veces.

3.2.2.3 Verificación del material volumétrico ajustado por vaciado “EX”

Dentro de esta categoría se incluyeron: Pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL; bureta de 25 mL. Este material se verificó con el siguiente protocolo:

- ❖ Secar completamente un vaso de vidrio para almacenar la alícuota.
- ❖ Pesar el vaso.
- ❖ Determinar la temperatura del líquido de llenado (agua destilada).
- ❖ Llenar el recipiente a verificar con el líquido de llenado hasta que la parte inferior del menisco quede justo por encima de la marca del aforo.
- ❖ Secar la punta con un paño.
- ❖ Vaciar el líquido dentro del vaso pesado.
- ❖ Pesar nuevamente el vaso con su carga.
- ❖ Determinar el peso de la carga por diferencia.
- ❖ Repetir el procedimiento por lo menos diez veces.

3.2.2.4 Cálculo del volumen

Es necesario llevar los datos de masa obtenidos en las anteriores verificaciones a datos expresados en volumen. Esto se logra multiplicando la masa (W) por un factor (Z), como se muestra en la **Ecuación 1**. A cada conjunto de datos se le calculó la desviación estándar. Este valor nunca debe ser mayor del valor de tolerancia especificado por el fabricante de cada material, en caso contrario la verificación se debe repetir.

$$V_{20} = W \times Z \quad \text{Ecuación 1}$$

El valor de Z se escoge de acuerdo con la temperatura de trabajo (24°C). (Véase **Anexo A**).

3.2.3 Verificación de equipos

Se realizó la lista de equipos usados en la validación, a los cuales se les efectuaron el mantenimiento preventivo correspondiente y las calibraciones que garantizaron condiciones óptimas de su funcionamiento.

3.2.3.1 Verificación de la balanza analítica METTLER TOLEDO AB240

Durante el tiempo, en el cual se usó la balanza analítica, se hicieron verificaciones con una pesa de 0.5 g, se construyó la carta de control analítico para la balanza y se identificaron los errores máximos permitidos. Como una forma de realizar un control de la calidad analítica de los resultados, la balanza fue sometida a procedimientos de calibración desarrollados por la empresa MetroLabor Ltda. (Bogotá, Colombia) organización autorizada para realizar calibración de balanzas,

la cual verificó y calibró la balanza analítica y expidió el correspondiente certificado de calibración.

3.2.3.2 Equipo de absorción atómica

Las medidas de absorbancia se realizaron en un equipo THERMO ELECTRON modelo S4 y el equipo Generador de Hidruros VP100, a los cuales la empresa INNOVATEK (Bogotá, Colombia) realizó el mantenimiento preventivo y las correspondientes calibraciones.

3.2.3.4 Equipos menores

En el desarrollo de la metodología se usó un baño de calentamiento, un *vortex* y un baño ultrasónico, estos equipos no necesitan calibraciones para su uso previsto, sólo se verificó su correcto funcionamiento.

3.2.4 Revisión de la técnica y los procedimientos

Para la cuantificación de mercurio en cabello por la técnica de HG-AAS se siguieron dos metodologías: (1). para la digestión de la muestra el procedimiento HG-017-3, *Digestión of bird feather and hair for total mercury*, metodología. Basada en la norma EPA 245.6, y (2) para la determinación de mercurio HG 0.06-3.12, *Analysis of total mercury in tissue by cold vapor atomic absorptio.*, ambos procedimientos son tomados del *Florida Department of Environmental Protection*⁵. Como muestras de trabajo se usaron cabello y los CRM, descritos en la **Tabla 3**.

3.2.4.1 Principio

Una cantidad de muestra pesada, se somete a digestión ácida y oxidación con permanganato y persulfato de potasio, para eliminar la materia orgánica y llevar todo el mercurio a su forma oxidada. La solución resultante se trata con clorhidrato de hidroxilamina, para consumir el exceso de permanganato de potasio y posteriormente, se reduce a mercurio elemental por la acción del hidrógeno nascente que proviene de la reacción del borohidruro de sodio en medio ácido. El hidruro volátil es arrastrado a la cámara de atomización por un gas inerte. La concentración del analito se determina por la medición de la absorbancia que es interpolada en una curva de calibración de mercurio previamente construida.

3.2.4.2 Preparación de la curva de calibración

La curva de calibración se preparó a partir del *Certipur* de 1000 mg/L en Hg. Se midió 10 μ L de este patrón y se introdujo en un balón aforado de 100 mL, éste se aforó con agua desionizada y se rotuló como solución madre de 100 μ g/L de Hg. De esta solución, se tomaron alicuotas de 0.0, 0.1, 0.3, 0.7, 1.5, y 3.0 mL las cuales se aforaron a 10 mL con agua desionizada para obtener patrones de 0.0, 1, 3, 7, 15 y 30 μ g/L. A cada uno de estos patrones se le adicionaron los reactivos usados en la digestión de las muestras. Los reactivos, concentraciones y cantidades se describen detalladamente, a continuación, en el procedimiento de digestión de las muestras.

3.2.4.2 Procedimiento de digestión de la muestra

Se pesó aproximadamente entre 12-50 mg de muestra de cabello, que se colocó en un tubo de ensayo de 30 mL tapa rosca. El proceso de digestión ácida y la oxidación fueron los siguientes:

Los tubos se colocaron en un Erlenmeyer con hielo. Se adicionaron lentamente 1.25 mL de H_2SO_4 y 0.5 mL de HNO_3 . Después de adición de los ácidos, los tubos se agitaron en intervalos de 15 minutos durante una hora. Se tapó la boca del tubo con una película adherente para cubrimiento de alimentos y se ajustó la tapa herméticamente, se dejó en reposo por 24 horas. Los tubos se calentaron en un baño María a 58°C por 30 minutos, durante los primeros 5 minutos se observaron para que en caso de presentarse una reacción violenta, los tubos se sacaran del baño serológico y se golpearan suavemente para romper las burbujas.

Posteriormente, se enfriaron en un baño de hielo. Se adicionaron a los tubos 10 mL de agua desionizada, excepto al blanco, pues éste se preparó solo al momento de llevar las muestras al baño María. El blanco contenía 10 mL de agua desionizada y las mismas cantidades de ácidos adicionadas a las muestras. A continuación, se le adicionaron 2.5 mL de KMnO_4 al 5% a todos los tubos, se dejaron en reposo 15 minutos. Si transcurrido este tiempo no persistía el color violeta, se adicionaban 250 μL de KMnO_4 al 5%, hasta que el color púrpura persistiera por 15 minutos.

A continuación, a los tubos se les adicionó 1 mL de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ al 5% (éste se preparó el mismo día), se dejaron en reposo durante 12 horas y se adicionaron 0.7 mL de clorhidrato de hidroxilamina al 12%, para consumir el exceso de permanganato de potasio. Se midió la absorbancia de las soluciones y ésta fue interpolada en la curva de calibración construida con patrones de mercurio. El procedimiento de

operación del equipo de absorción atómica con generador de hidruros se describe a continuación.

3.2.4.3 Procedimiento de manejo del equipo de absorción atómica con generador de hidruros

El procedimiento de manejo, se describe en el **ANEXO C**.

3.3 VALIDACION INTERNA DEL METODO PARA LA CUANTIFICACION DE MERCURIO POR LA TECNICA DE ABSORCION ATOMICA CON GENERADOR DE HIDRUROS

Se calcularon las figuras de mérito características de la técnica con el fin de evaluar la validez de los resultados.

3.3.1 Determinación de límite de detección

Para determinar el límite de detección se prepararon 7 blancos de reactivos adicionados con 300 ng de Hg. Se usaron blancos enriquecidos para determinar el límite de detección, ya que las señales de los blancos arrojaban desviaciones estándar muy altas que no permitían una correcta determinación de este parámetro.

Con los datos de los blancos adicionados enriquecidos con Hg, se determinó el límite de detección, calculando la desviación estándar de las medidas y aplicando la siguiente ecuación:

$$LD = \bar{X} + 3SD$$

Ecuación 2

Donde \bar{X} es el valor medio de las determinaciones de los blancos enriquecidos y SD es la desviación estándar de las medidas.

3.3.2 Determinación de límite de cuantificación

El límite de cuantificación se calculó con base en las lecturas de los blancos enriquecidos y aplicando la siguiente ecuación:

$$LC = \bar{X} + 10SD \qquad \text{Ecuación 3}$$

3.3.3 Intervalo de validación y construcción de la curva de calibración

La curva de calibración se construyó en un intervalo de 0.0 a 30 µg/L, preparando patrones de 0.0, 1, 3, 6, 15 y 30 µg/L; éstos se midieron cada vez que se procesaron las diferentes muestras. Se escogió un intervalo de validación que permitió el análisis de muestras de baja y alta concentración.

3.3.4 Linealidad

En el intervalo de validación se realizó una prueba de t de *student* para comprobar la linealidad de la curva de calibración dentro del rango de validación.

Fue necesario utilizar una prueba estadística adecuada para comprobar que el coeficiente de correlación era realmente significativo, considerando el número de pares de valores usados en su cálculo. El método más simple fue calcular el valor t usando la ecuación:

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

Ecuación 4

Donde r es el coeficiente de correlación y n el número de pares usados para calcular r . El valor calculado de t se comparó con el tabulado al nivel de significación deseado, usando una prueba t de dos colas y $(n-2)$ grados de libertad (véase **Anexo B**). La hipótesis nula en este caso es que no existe correlación entre X y Y . Si el valor calculado de t es mayor que el tabulado, la hipótesis nula se rechaza y se concluye que existe una correlación significativa.

3.3.5 Sensibilidad

La sensibilidad de la metodología se determinó como la concentración en $\mu\text{g/L}$ de mercurio requerida para producir una señal del 1% de absorción (0.0044 unidades de absorbancia de un patrón de $7 \mu\text{g/L}$ de Hg).

3.3.6 Precisión

Se determinó la precisión de la metodología evaluando la repetibilidad y reproducibilidad a dos niveles de concentración, en rangos bajos de concentración (muestras de cabello de concentración menor de $5 \mu\text{g/g}$) y en rangos altos de concentración (muestras de cabello de concentración igual o superior a $5 \mu\text{g/g}$, que al ser leídas en el equipo e interpoladas en la curva de calibración, no requerían dilución). Se midieron en diferentes días y por triplicado dos muestras de cabello, una con alta concentración de mercurio y la otra con baja concentración de mercurio. Con los datos obtenidos se estimaron el coeficiente de

variación y la desviación estándar de las medidas como parámetros estadísticos a evaluar.

3.3.7 Exactitud

La exactitud se evaluó con el cálculo del porcentaje de recuperación de las medidas de tres CRM, con concentraciones alta, media y baja. Las medidas se realizaron por triplicado durante días diferentes, para el CRM de alta concentración y para los CRMs con concentraciones media y baja, se cuantificó la concentración en días diferentes.

3.3.8 Determinación de la incertidumbre

Para la determinación de la incertidumbre se siguió la metodología propuesta en la guía *Eurachem/CITAC, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*⁷⁵. Como primera medida se identificaron las principales fuentes de incertidumbre de la metodología, se calculó la incertidumbre estándar relativa debida a cada fuente, posteriormente se combinaron de acuerdo a la ley de propagación de errores, se calculó la incertidumbre expandida y finalmente se expresó el resultado.

3.3.8.1 Caracterización de las fuentes individuales de incertidumbre

Se identificaron las fuentes individuales de incertidumbre en la pesada, la dilución de la muestra, la preparación de los patrones y la lectura de la curva de calibración en el HG-AAS, teniendo en cuenta las fuentes de incertidumbre tipo A, exploradas experimentalmente, y las fuentes de tipo B, reportadas en las tolerancias y certificados de calibración.

Se elaboró un diagrama “causa-efecto” con las diferentes fuentes de incertidumbre relacionadas (Véase **figura 1.** y **Tabla 4.**)

Figura 1. Diagrama “causa efecto” para la determinación de la incertidumbre

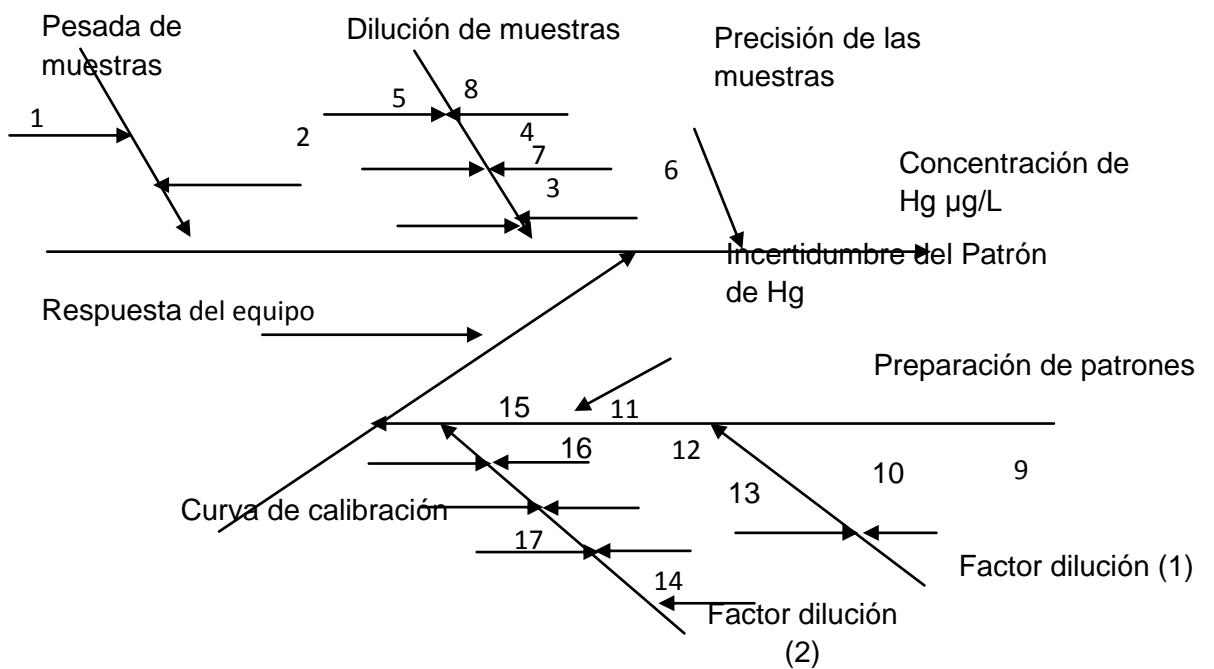


Tabla 4. Identificación de las fuentes de incertidumbre.

Pesada de las muestras	
1	Incertidumbre en la calibración de la balanza
2	División de la escala de la balanza
Dilución de las muestras por adición de reactivos	
3	Adición de 1.25 mL de ácido sulfúrico (pipeta de 2 mL) <ul style="list-style-type: none"> ❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente ❖ Repetibilidad de la pipeta ❖ Tolerancia de pipeta
4	Adición de 0.5 mL de ácido nítrico (pipeta de 1 mL) <ul style="list-style-type: none"> ❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente ❖ Repetibilidad de la pipeta ❖ Tolerancia de pipeta
5	Adición de 10 mL de agua desionizada (pipeta de 10 mL) <ul style="list-style-type: none"> ❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente ❖ Repetibilidad de la pipeta ❖ Tolerancia de pipeta
6	Adición de 2.5 mL de permanganato de Potasio (Pipeta de 5 mL) <ul style="list-style-type: none"> ❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente

	❖ Repetibilidad de la pipeta
	❖ Tolerancia de pipeta
7	Adición de 1 mL de persulfato de potasio (Pipeta de 1mL)
	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Repetibilidad de la pipeta
	❖ Tolerancia de pipeta
8	Adición de 0.66 ml de clorhidrato de hidroxilamina (pipeta de 1mL)
	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Repetibilidad de la pipeta
	❖ Tolerancia de pipeta
Preparación de patrones	
Primer factor de dilución (preparación de la solución madre)	
9	Incertidumbre debida al uso de la micropipeta de 100 μ L
	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Tolerancia de la micropipeta
10	Incertidumbre debida al uso de un balón aforado de 100 mL
	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Repetibilidad del balón
	❖ Tolerancia de balón
Segundo factor de dilución, preparación de patrones a partir de la solución madre.	

11	Adición de alícuota de solución madre (micropipeta de 1000 μ L)
	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Repetibilidad de la micropipeta
	❖ Tolerancia de la micropipeta
12	Adición de agua desionizada para completar 10 mL (bureta de 25 mL)
	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Repetibilidad de la bureta
	❖ Tolerancia de bureta
13	Adición de 1.25 mL de ácido sulfúrico (pipeta de 2 mL)
	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Repetibilidad de la pipeta
	❖ Tolerancia de pipeta
14	Adición de 0.5 mL de ácido nítrico (pipeta de 1 mL)
	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Repetibilidad de la pipeta
	❖ Tolerancia de pipeta
15	Adición de 2.5 mL de permanganato de potasio (pipeta de 5 mL)
	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Repetibilidad de la pipeta
	❖ Tolerancia de pipeta
	Adición de 1 mL de persulfato de potasio (Pipeta de 1mL)

	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Repetibilidad de la pipeta
	❖ Tolerancia de pipeta
	Adición de 0.66 mL de clorhidrato de hidroxilamina (pipeta de 1 mL)
	❖ Efecto de la diferencia de temperatura de calibración y del ambiente
	❖ Repetibilidad de la pipeta
	❖ Tolerancia de pipeta
Material de referencia usado en la preparación de los patrones de la curva	
Respuesta del equipo	

Fuente: Luz Helena Sánchez Rodríguez, autora del presente proyecto

3.3.8.2 Cálculo de las contribuciones individuales

Para realizar el cálculo de las contribuciones individuales se siguió el procedimiento descrito en el apéndice E de la guía *Eurachem/CITAC, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*⁷⁵.

3.3.8.3 Incertidumbre estándar combinada

Una vez calculadas todas las fuentes de incertidumbre, éstas se combinaron siguiendo la ley de propagación de errores, en donde la suma de errores se obtiene mediante la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de cada uno de los errores. En el caso de productos y cocientes, el error propagado se obtiene sacando la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de cada uno de los errores dividido entre el valor nominal. De esta forma, se obtiene una incertidumbre

estándar combinada, U_c . Finalmente, se calculó la incertidumbre expandida, U . Para ello, se multiplicó la incertidumbre combinada de la metodología por un factor de cobertura, k , ($U=k \cdot u$), el cual fue 2. De esta forma, se obtuvo el valor de incertidumbre expandida en donde existe aproximadamente un 95% de probabilidad de encontrar el valor verdadero⁷⁴.

3.3.9 Control de la calidad analítica

Con el objetivo de monitorear el comportamiento de la metodología en el tiempo se construyó una carta de control analítico con el resultado de las medidas de un patrón de 6 $\mu\text{g/L}$ durante 20 días, con estas medidas se estimaron los límites de advertencia y los límites de control de la metodología.

3.4 PREVALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA ZAAS

En esta etapa, se verificaron aspectos técnicos relacionados con los dos pasos desarrollados en la metodología, la pesada de las muestras y la lectura de la señal en el equipo de absorción atómica diferencial con efecto Zeeman y pirolizador. Esta parte del trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander.

3.4.1 Material de referencia certificado

Durante la validación de la metodología se usaron tres materiales de referencia certificados a saber: (1) CRM de cabello IAEA 086, concentración baja de Hg, $0.573 \pm 0.039 \mu\text{g/g}$; (2) CRM de cabello NIES 13, concentración intermedia de Hg, $4.42 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ y (3) CRM de cabello IAEA 085, concentración alta de Hg, $23.2 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$.

3.4.2 Verificación de equipos

Para el desarrollo de la técnica se verificó el desempeño normal de la balanza y del equipo de ZAAS, para garantizar mejores condiciones de trabajo.

3.4.2.1 Balanza analítica METTLER TOLEDO AG285

Como una medida de control de la calidad analítica en los datos de pesada determinados por la balanza analítica, ésta se sometió a un procedimiento de calibración en donde la empresa Metrolabor Ltda. (Bogotá, Colombia) emitió el respectivo certificado de calibración para la balanza empleada en este trabajo.

3.4.2.2 Analizador de mercurio RA-915+/RP-91C

En el Anexo C, se describen los procedimientos previos que deben realizarse antes de cuantificar mercurio en cualquier tipo de matriz, cuando se utiliza el analizador de mercurio RA-915⁺/RP-91C.

3.4.3 Revisión de la técnica y los procedimientos

La metodología implementada para el análisis de mercurio en muestras sólidas por la técnica de absorción atómica diferencial con efecto Zeeman fue la recomendada por el fabricante del equipo. (Véase **Anexo C**).

3.4.3.1 Principio de operación del RA-915+/RP91C

El principio de operación de ésta técnica se fundamenta en la destrucción térmica de la matriz de la muestra; el mercurio presente es reducido de su estado

enlazado a un estado atómico en fase gaseosa, la absorbancia de los átomos de mercurio se lee a 254 nm y se interpola en una curva de calibración.

3.4.3.2 Cálculo del coeficiente de calibración A

Como etapa preliminar al análisis de muestras de cabello en el analizador de mercurio se determinó el coeficiente de calibración A de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Para el análisis de mercurio en cabello, el acoplamiento RA-915⁺/RP91C fue conectado al puerto COM del computador por medio de un cable de interfase, luego se encendió el computador y se inició el programa del equipo en el modo "Complex" (muestras sólidas o complejas). Se corrió la gráfica y se esperaron 60 segundos para observar que el valor de la señal del PMT (*Photo-multiplier tube*) fuera mayor de 8000. Esto garantizó la limpieza de las ventanas de vidrio ubicadas en la celda analítica del pirolizador y la estabilización de la radiación generada por la lámpara de mercurio. Posteriormente, se comprobó el funcionamiento del analizador de acuerdo con el manual de operación. Para determinar el coeficiente de calibración, el aditamento RP-91C se dejó calentar 30 minutos, se ajustó el flujo de aire en la bomba a 1 L/min (manteniéndola constante durante las mediciones) y, a continuación, se iniciaron las mediciones analizando 5 mg del CRM 085 (23,2 mg/Kg) cada 20 minutos durante 4 horas. Para cada una de estas determinaciones se calculó el coeficiente de correlación A (q dependencia del contenido de mercurio en la muestra, S la integral de la señal analítica, A el área) utilizando la Ecuación 4, y se relacionó con el respectivo tiempo de calentamiento del pirolizador por medio de una gráfica de A Vs t.

$$A = q/S \quad \text{(Ecuación 4)}$$

El tiempo en el cual se observó un valor constante en la magnitud de este coeficiente se seleccionó como tiempo de acondicionamiento del pirolizador previo a la realización de las mediciones de mercurio en cabello.

3.4.3.3 Método

Una submuestra de cabello (5-10 mg) se pesó en una balanza analítica y se colocó en el porta muestras de cuarzo del pirolizador. Se dio inicio a la integración de la señal analítica a través del programa computacional del RA-915⁺ y se introdujo el portamuestras al pirolizador. Empleando calentamiento controlado, la muestra de cabello se descompuso en el atomizador que posee una celda de conversión catalítica, la cual transforma la muestra a dióxido de carbono, agua y mercurio. El vapor con los átomos y las moléculas pasa por último a una celda analítica incorporada en la trayectoria del espectrofotómetro de absorción atómica que trabaja a una longitud de onda de 254 nm. Después de transcurridos 60 segundos, se finalizó el proceso de integración y se registró el área bajo la curva. Finalmente, se extrajo el portamuestras del pirolizador.

Si el área obtenida para la muestra es de 400, se debe incrementar la cantidad de muestra usada para la cuantificación, sin embargo, este aumento en la cantidad de muestra debe hacerse teniendo la precaución de que la señal del tubo fotomultiplicador (PTM) no vaya a caer por debajo de 4000, pues si esto sucede, no se garantiza la confiabilidad en la medición.

3.4.3.4 Determinación del rango óptimo de pesada

Para obtener un resultado confiable y dentro de las especificaciones dadas por el equipo, fue necesario determinar la cantidad de masa mínima y máxima que se podía someter a análisis.

Para determinar este rango se pesó un CRM IAEA 085 de $23.2 \pm 0,8$, entre 0.5 mg y 11 mg, y se registraron las señales emitidas por el equipo para cada uno de los pesos dados.

3.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DIFERENCIAL DE ZEEMAN CON PIROLIZADOR

Se estimaron las figuras de mérito características de la metodología que dan validez a los resultados obtenidos, esto, acompañado además por la estimación de la incertidumbre.

3.5.1 Determinación del límite de detección

Para el cálculo del límite de detección se utilizó cabello de una niña vegetariana desde el vientre materno, sin presencia de amalgamas dentales, ni exposición ocupacional, ni ambiental al mercurio. Se pesaron 5 mg de muestra de cabello y se leyó la señal de la medida; esto se repitió 7 veces. La señal fue interpolada en una curva de calibración para determinar la concentración.

El cálculo del límite de detección se estimó con la **Ecuación 2**.

3.5.2 Determinación de límite de cuantificación

El límite de cuantificación se estimó con el promedio y la desviación estándar de las medidas de las muestras usadas en la determinación del límite de detección. Para realizar el cálculo se utilizó la **Ecuación 3**.

3.5.3 Curva de calibración

Para la construcción de las curvas de calibración se usaron los tres CRM de cabello enunciados en el numeral 2.2.1. Se pesaron entre 0,5 y 10 mg de cada uno de los CRM para la elaboración de las curvas en diferentes rangos de concentración. Las curvas se elaboraron graficando la masa de mercurio contenida en la muestra (eje x) *versus* el área del pico registrado (eje y). Para muestras de baja concentración se elaboraron las curvas con el CRM de cabello IAEA 086, concentración baja de Hg, $0.573 \pm 0.039 \mu\text{g/g}$ y con el CRM de cabello NIES 13, de concentración intermedia de Hg, $4.42 \pm 0.20 \mu\text{g/g}$. Para muestras que contenían concentraciones superiores a $5 \mu\text{g/g}$ de mercurio se elaboró la curva usando el CRM IAEA 085, de concentración de Hg, $23.2 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$. Sobre estas curvas de calibración se interpolaron las áreas de los picos de las muestras y patrones.

3.5.4 Intervalo de validación y linealidad

Para establecer el intervalo de validación escogido para esta técnica se tuvo en cuenta la concentración de las muestras a analizar. Se requería que la curva de calibración construida en el intervalo de validación permitiera la interpolación en las áreas de los picos generados por muestras con concentraciones baja y alta.

3.5.5 Precisión

La precisión se determinó como la reproducibilidad y la repetibilidad de la metodología mediante el análisis de patrones certificados de cabello de diferentes concentraciones, los cuales se analizaron por triplicado durante diferentes días; la evaluación estadística se realizó con el cálculo del coeficiente de variación y la desviación estándar de las medidas realizadas. Se realizaron diferentes medidas para determinar la precisión intraensayo (repetibilidad) y la precisión interensayo (reproducibilidad).

3.5.6 Exactitud

La exactitud se evaluó con el cálculo del porcentaje de recuperación realizado con diferentes CRM. Las determinaciones se llevaron a cabo con tres CRMs de cabello, que se analizaron en diferentes días; con el promedio de las determinaciones y el valor de concentración reportado en los certificados de los materiales, se calculó el porcentaje de recuperación de la metodología como un parámetro estadístico.

3.5.7 Cálculo de la incertidumbre

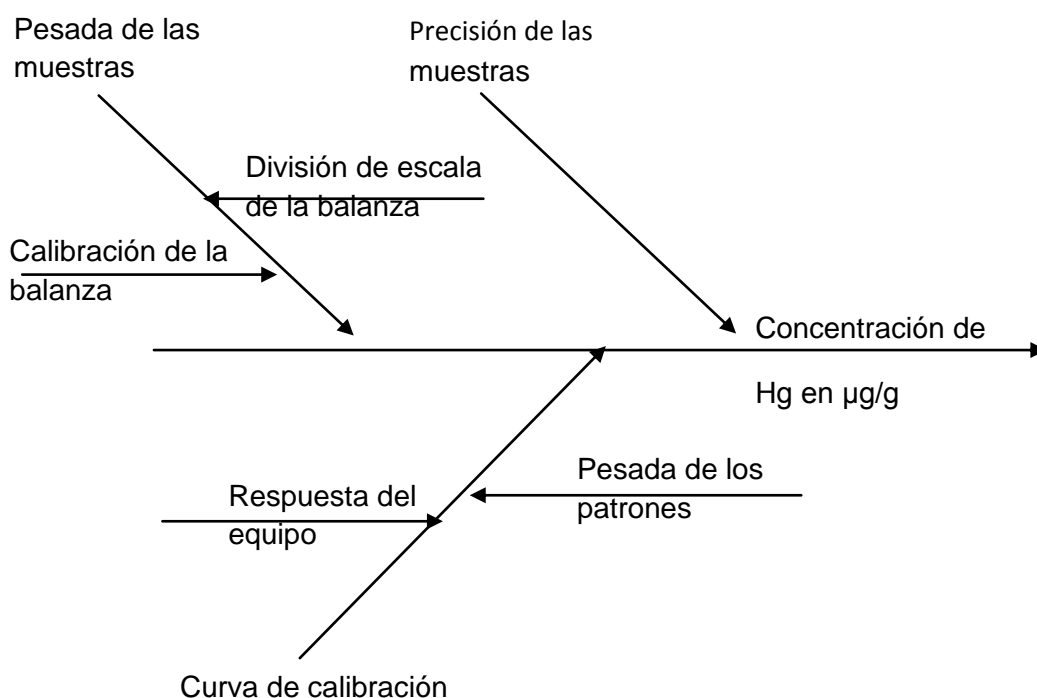
Para el cálculo de la incertidumbre se siguió la metodología propuesta en el numeral **3.3.8**.

3.5.7.1 Caracterización de las fuentes individuales de incertidumbre

La técnica presenta dos etapas que aportan individualmente incertidumbre a la medición de mercurio, la pesada de las muestras y la lectura de patrones y muestras en el equipo de absorción atómica diferencial con efecto Zeeman. El

diagrama muestra las relaciones existentes entre cada una de las fuentes individuales de incertidumbre.

Figura 2. Diagrama “causa efecto” que relaciona cada una de las fuentes de incertidumbre para la cuantificación de mercurio por la técnica de generador de hidruros.



Una vez identificadas las fuentes de incertidumbre, se procedió a calcular las incertidumbres estándar relativas a cada fuente, las cuales se combinaron de acuerdo con la ley de propagación de errores. Finalmente, se calculó la incertidumbre expandida multiplicando la incertidumbre combinada del método por un factor de cobertura, $K=2$, y con este valor se determinó la incertidumbre para los análisis de mercurio realizados por la técnica ZAAS.

3.6 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Para evaluar la equivalencia de los resultados emitidos por los dos métodos, se realizó el siguiente diseño experimental:

Cada una de las 50 muestras seleccionadas se dividió en dos partes.

La primera de las partes se ensayó con la técnica de HG-AAS (Procedimiento A).

La segunda parte se analizó con la técnica de ZAAS (Procedimiento B).

Sean X : resultados obtenidos mediante el procedimiento A.

Y : resultados obtenidos mediante el procedimiento B.

Los datos generados de esta manera son de la forma (X_i, Y_i) , $i=1,2,\dots,50$, que tienen la característica de ser una muestra pareada o relacionada. El análisis estadístico, para determinar si hay diferencias significativas entre los dos métodos, se realizó a través de una prueba t . Además, se utilizó la técnica de Bland & Altman que se enfoca en el promedio y la variabilidad de las diferencias entre pares de mediciones, aportando un gráfico de dispersión de la diferencia entre la mediciones (eje y) contra sus medias (eje x), lo que muestra si hay o no la falta de concordancia individual⁸²⁻⁸⁴.

3.6.1 Selección de las muestras de cabello usadas en la comparación de las metodologías

De las muestras obtenidas en el estudio de Segovia (Antioquia), se seleccionaron aquellas que pesaron más de 500 mg; esto con el fin de disponer suficiente material para realizar las determinaciones por ambas metodologías.

La concentración de mercurio en estas muestras era conocida; las muestras se dividieron en dos grupos: (1) las que tenían valores superiores a 5 μg de mercurio

por de cabello y (2) las que tenían concentraciones inferiores a este valor. Se consideró este valor como punto de corte para la selección de las muestras dado que esta concentración es la que está establecida en la normatividad vigente en nuestro país como valor permisible en cabello. Se seleccionaron aleatoriamente 35 muestras.

Adicionalmente, se analizaron muestras provenientes de 15 voluntarios (odontólogos, químicos, pescadores y personas vegetarianas).

4. RESULTADOS

4.1 EFECTO DEL LAVADO DE LAS MUESTRAS

Para evaluar el efecto del lavado de las muestras de cabello se utilizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (versión no paramétrica de la prueba t para muestras relacionadas). Una vez realizadas estas pruebas se concluyó que no hay un efecto significativo en la medición de la concentración de mercurio que se pueda atribuir al lavado de las muestras (ZAAS, valor $p = 0,48$; HGAAS, valor $p = 0,50$).

4.2 PREVALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERADOR DE HIDRUROS

Se muestran los resultados de todas las verificaciones realizadas en el laboratorio con el fin de asegurar condiciones óptimas de trabajo, de materiales, equipos y reactivos.

4.1.2 Verificación el material volumétrico

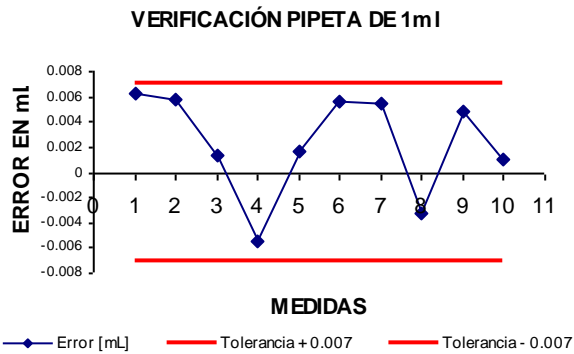
El material volumétrico usado en la metodología se verificó mediante el método gravimétrico, las mediciones realizadas se muestran en la **Tabla 5**. Con los datos obtenidos en la verificación de cada instrumento se elaboró una gráfica que muestra el error en la medida de los volúmenes dentro de los valores de tolerancias permitidos para cada volumen.

Tabla 5. Verificación del material volumétrico.

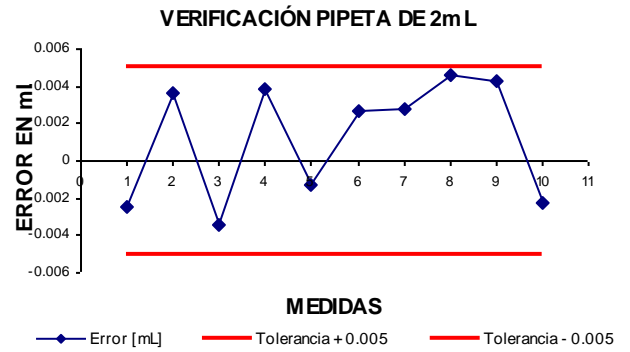
Medidas	Pipeta 1 mL	Pipeta 2 mL	Pipeta 5 mL	Pipeta 10 mL	Bureta 25 mL	Balón 100 mL
1	1,0062	1.9975	5,0123	10.0068	25,0343	99.9082
2	1,0058	2.0036	5,0145	9.9913	25,0173	99.9371
3	1,0013	1.9966	5,0023	9.9969	25,0465	99.9520
4	0,9945	2.0089	5,0034	10.0016	25,0336	99.9397
5	1,0017	1.9987	4,9956	9.9901	25,0256	99.9443
6	1,0057	2.0087	5,0059	9.9902	25,0445	100.0110
7	1,0055	2.0088	4,987	10.004	25,0154	99.9987
8	0,9967	2.0046	4,9905	9.9943	25,0358	99.9560
9	1,0048	2.0053	5,0098	10.005	25,0427	100.0987
10	1,0011	1.9977	5,0045	10.0076	25,0317	100.0940
S	0.0013	0.005	0,0091	0.0088	0.0260	0.066
Tolerancia	± 0.007	± 0.015	± 0.015	± 0.02	± 0.05	± 0.1

Fuente: Luz Helena Sánchez Rodríguez, autora del presente proyecto

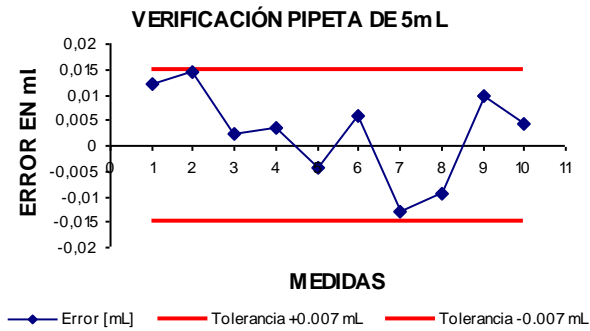
Figura 3. Verificación del material volumétrico. a. Pipeta de 1 mL. b. Pipeta de 2 mL. c. Pipeta de 5 mL. d. Pipeta de 10 mL. e. Bureta de 25 mL. f. Balón aforado de 100 mL.



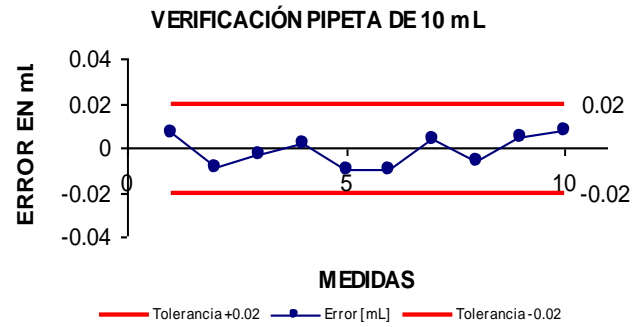
(a)



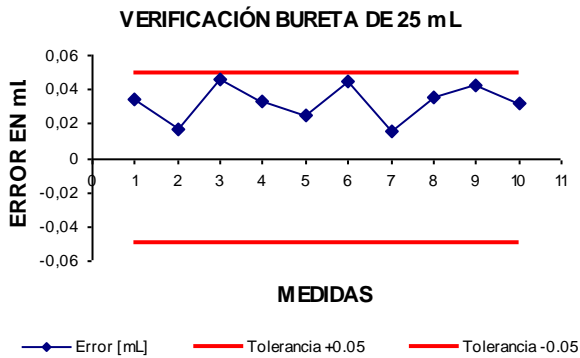
(b)



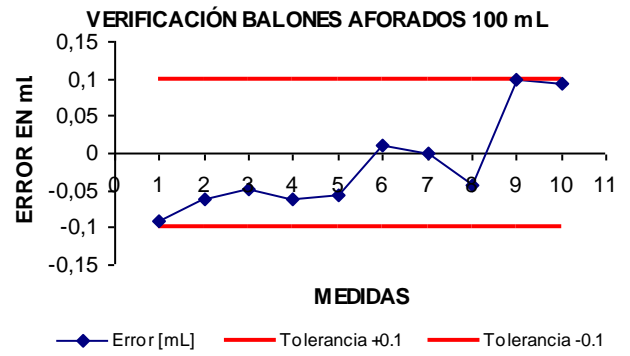
(c)



(d)



(e)



(f)

Los datos muestran que las medidas hechas con todo el material volumétrico de aforo y graduado se encuentran dentro de los valores de tolerancia reportado por el fabricante. Se observa un comportamiento sinusoidal de las medidas dentro de valores de tolerancia permitidos, esto refleja que los errores aleatorios de las medidas de volumen, se encuentran bajo control y que no existen errores sistemáticos.

4.1.3 Verificación de equipos

4.1.3.1 Balanza analítica METTLER TOLEDO AB240

La empresa Metrolabor Ltda. (Bogotá, Colombia) realizó la calibración de la balanza METTLER TOLEDO AB240 con la emisión del respectivo certificado de calibración (Véase **Anexo F**).

4.1.3.2 Equipo de absorción atómica THERMO ELECTRON S4 con generador de hidruros VP100

La empresa INNOVATEK (Bogotá, Colombia) realizó el respectivo mantenimiento preventivo al equipo de absorción atómica verificando su correcto funcionamiento tanto de lámparas, como del espectrofotómetro. Se establecieron los siguientes parámetros de trabajo para el espectrofotómetro, según lo indicado en el manual de manejo del equipo:

Tabla 6. Parámetros de medida para el espectrofotómetro de absorción atómica.

Parámetros
Lámpara: Mercurio
Longitud de onda: 253.7 nm
Corrección de fondo: D ₂
Tipo de señal: Continuo
Tiempo de medida: 4.0 segundos
Rendija: 0.5nm

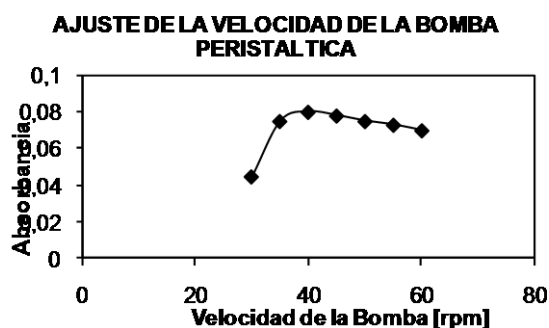
4.1.3.3 Ajuste de los parámetros de medición del equipo generador de hidruros VP100

Las modificaciones realizadas a los parámetros de medición del equipo generador de hidruros permitieron establecer las mejores condiciones de su funcionamiento, reflejadas en un aumento considerable en la absorbancia para la medida de un patrón de 6 µg/L de mercurio.

Se observa, que la velocidad de la bomba peristáltica a la cual se obtiene la mayor absorbancia, es de 40 rpm (revoluciones por minuto). (Véase **Figura 4**). Velocidades inferiores a esta presentan menor absorbancia, esto se debe a que la cantidad de reactivos (HCl y NaBH₄) inyectados a la cámara de reacción fue pequeña y no se logró que todo el mercurio presente en la muestra fuera llevado de la solución a vapor. Velocidades superiores a 40 rpm disminuyen la absorbancia de las medidas puesto que los reactivos están en exceso y se genera

una acumulación de líquido en la cámara de reacción, lo que impide el flujo normal de vapor de mercurio a la cámara de lectura de absorbancia.

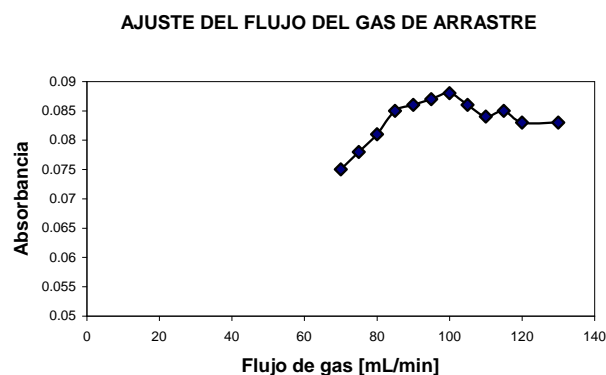
Figura 4. Influencia de la velocidad de la bomba en las determinaciones de mercurio por la técnica de HG-AAS. Condiciones: HCl 50%, flujo del gas de arrastre: 100 mL/min, concentración de NaBH₄ 1%.



Fuente: Luz Helena Sánchez Rodríguez, autora del presente proyecto

La variación en el flujo del gas de arrastre permitió determinar que el mayor valor de absorbancia se presentó a 100 mL/min. Flujos de gas de arrastre inferiores a 100 mL/min no alcanzan la velocidad de arrastre necesario para que todo el vapor de mercurio fuera llevado a la cámara de lectura. Flujos de gas superiores a 100 mL/min arrastran rápidamente el vapor de mercurio generado en la cámara y no se llega al equilibrio deseado en la lectura (Véase **Figura 5**).

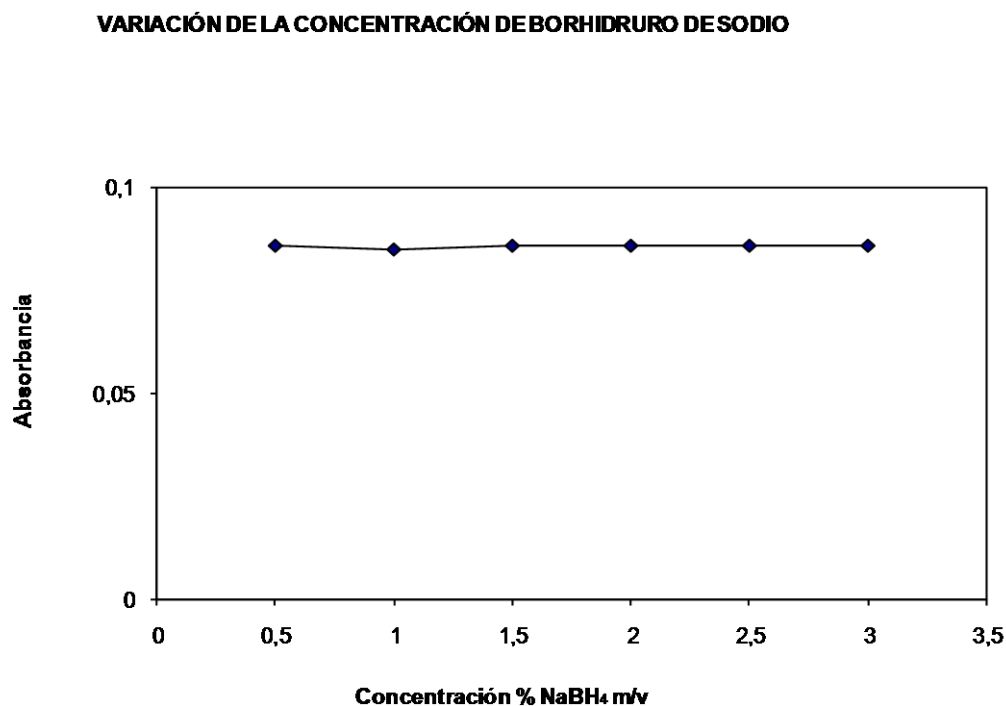
Figura 5. Influencia del flujo de gas de arrastre sobre las determinaciones de mercurio por la técnica de HG-AAS. Condiciones: HCl 50%, Velocidad de la bomba: 40 rpm, concentración de Na BH₄ 1%.



Fuente: Luz Helena Sánchez Rodríguez, autora del presente proyecto

La absorbancia registrada al leer un patrón de 6 µg/L de mercurio se mantuvo aproximadamente constante al variar la concentración de NaBH₄. Para concentraciones superiores al 2 % la reacción en la cámara de mezcla del VP100 era más turbulenta y se presentaba formación de agua en las paredes de la manguera que comunicaba la cámara de reacción con la celda de lectura. La condensación del vapor dentro de la manguera, obstruía el paso normal del vapor de mercurio generando mediciones imprecisas. (Véase **Figura 6**).

Figura 6. Influencia de la concentración de NaBH_4 sobre las determinaciones de mercurio por la técnica de HG AAS Condiciones: HCl 50%, Velocidad de la bomba: 40 rpm y flujo del gas de arrastre: 100mL/min.



Fuente: Luz Helena Sánchez Rodríguez, autora del presente proyecto.

Luego de realizadas las diferentes modificaciones al equipo VP100, se definieron las condiciones bajo las cuales el espectrofotómetro presentaba el valor más alto de absorción. Las condiciones establecidas se presentan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Parámetros de medición para el generador de hidruros.

Parámetros de Generador de hidruros
Modo: vapor sin calentamiento
Velocidad flujo gas soporte: 100 mL/min
Velocidad de la bomba: 40 rpm
Concentración de borhidruro de sodio: 0,5 % (m/v) NaOH al 0.5 %(m/v)
Concentración de acido clorhídrico : 50 %(v/v)
Presión de gas de arrastre: 10 psi

4.2 VALIDACIÓN INTERNA DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERADOR DE HIDRUROS

Una vez establecidos los parámetros de medición, que garantizaran condiciones óptimas y estables para las medidas, se validó la técnica calculando las diferentes figuras de mérito que dan validez a los resultados emitidos por la metodología.

4.2.1 Límite de detección

Para determinación del límite de detección se leyeron 7 blancos de reactivos enriquecidos con Hg (300 ng); los datos se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Medidas de mercurio en 7 blancos de reactivos adicionados con Hg (300 ng).

Medidas	Concentración en $\mu\text{g/L}$
1	0.186
2	0.244
3	0.130
4	0.104
5	0.161
6	0.118
7	0.192
Promedio	0.162
Desviación estándar	0.049

Fuente: Luz Helena Sánchez Rodríguez, autora del presente proyecto

Con los datos se determinó el límite de detección calculando la desviación estándar y el promedio aplicando la **Ecuación 2**.

$$LD = 0.162 + 3 * 0.049 \quad LD = 0.309 \mu\text{g} / L$$

Es práctico expresar el límite de detección en unidades de $\mu\text{g/g}$ en el análisis de muestras sólidas, para esto, se usó la densidad del agua a la temperatura de análisis ($24\text{ }^\circ\text{C}$), ver **Anexo A**.

$$LD = 0,309 \frac{\mu\text{g}}{L} \times \frac{1,0037 L}{kg} \times \frac{1kg}{1000 g} = 0,000310 \frac{\mu\text{g}}{g}$$

El anterior valor indica que la metodología usada para la determinación de mercurio en cabello por la técnica de generador de hidruros permite detectar mercurio en muestras de cabello con una concentración igual o mayor de $0,000310\ \mu\text{g/g}$.

4.2.2 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se calculó con base en las lecturas de los blancos adicionados reportados anteriormente y la **Ecuación 3**.

$$LC = 0.162 + 10 * 0.049 \quad LC = 0.652 \mu\text{g} / L$$

Al igual que en el LD, el LC se reporta en unidades de $\mu\text{g/g}$.

$$LC = 0.652 \frac{\mu\text{g}}{L} \times \frac{1.0037 L}{kg} \times \frac{1kg}{1000 g} = 0,000654 \frac{\mu\text{g}}{g}$$

La metodología usada para la determinación de mercurio por la técnica de generador de hidruros permite la cuantificación de mercurio en muestras de cabello con una concentración igual o superior a $0,000654\ \mu\text{g/g}$.

Como límite superior de cuantificación para la metodología se tomó el valor de concentración del patrón más alto usado en la curva de calibración. No es posible

asignar un valor fijo de concentración como límite superior de cuantificación puesto que en el proceso se pueden realizar n diluciones que permiten la lectura de la muestra en la curva de calibración. Cabe aclarar, que dichas determinaciones estarán sujetas a un error más amplio puesto que se tienen que involucrar uno o varios factores de dilución.

4.2.3 Curva de calibración

La curva de calibración fue preparada y medida para cada uno de los ensayos programados diariamente. Se escogieron aleatoriamente 5 curvas de calibración que se muestran en la **Tabla 9** con los promedios de las mediciones se elaboró la curva de calibración de la metodología dentro del rango de validación escogido.

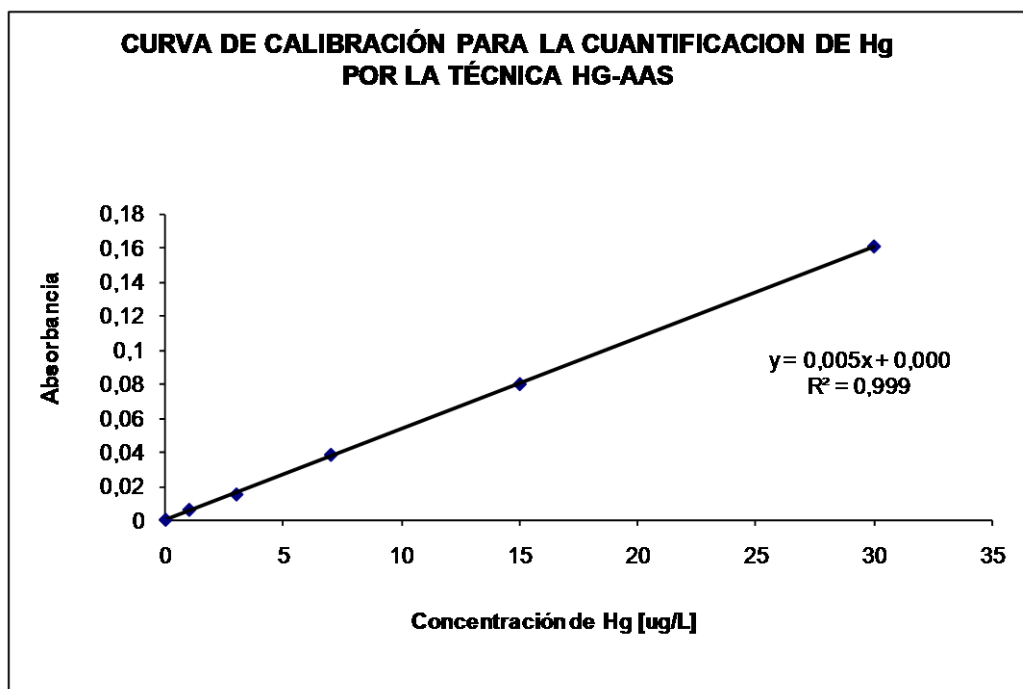
Tabla 9. Valores de absorbancia obtenidos en la lectura de 5 curvas de calibración por la técnica de HG-AAS.

Patrón (μg Hg/L)	Absorbancia, días					Promedio
	1	2	3	4	5	
0	0.002	0	0	0	0	0.000
1	0.006	0.005	0.005	0.009	0.006	0.006
3	0.015	0.012	0.012	0.019	0.018	0.015
7	0.041	0.035	0.035	0.043	0.038	0.038
15	0.088	0.066	0.077	0.086	0.082	0.080
30	0.188	0.131	0.155	0.168	0.16	0.160
r	0.9984	0.9986	0.999	0.9995	0.9998	0.9999
M	0.0062	0.044	0.0052	0.0055	0.0053	0.0053
B	0.0015	0.0008	0.0012	0.0025	0.001	0.0003

La **Tabla 9** presenta los coeficientes de correlación y las ecuaciones para las rectas de mínimos cuadrados para todo el conjunto de curvas elaboradas. Los análisis de mercurio realizados en las muestras y patrones se obtuvieron interpolando sobre la curva de calibración preparada el mismo día.

La concentración de mercurio en los patrones preparados para elaborar la curva de calibración es directamente proporcional a la absorbancia reportada por el equipo de HG -AAS. Esto lo asegura el coeficiente de correlación ($R^2 = 0,9999$). Se relacionó el promedio de las absorbancias y las concentraciones para elaborar la **Figura 7** que muestra la curva de calibración de la metodología.

Figura 7. Curva de calibración para la determinación de mercurio por la técnica de generador de hidruros.



Fuente: Luz Helena Sánchez Rodríguez, autora del presente proyecto

4.2.4 Linealidad

Se aplicó la prueba t , ver **Ecuación 4**, a la curva de calibración para verificar la linealidad en el intervalo de la curva.

Hipótesis nula: No existe correlación entre la concentración de mercurio y la absorbancia (X,Y).

$t_{cal} = 200$ reemplazando en la **Ecuación 4**

$t_{tab} = 2.78$ Con un 95% de confianza y 4 grados de libertad, ver **Anexo B**.

Como $t_{cal} > t_{tab}$ la hipótesis se rechaza y se concluye que existe una correlación significativa entre la concentración de mercurio en las muestras y la absorbancia reportada por el equipo. Se determinó el rango dinámico lineal entre el límite inferior de cuantificación y 30 $\mu\text{g/L}$, límite superior de la curva de calibración.

4.2.5 Sensibilidad

Se calculó como la concentración que genera 0,0044 unidades de absorbancia. Se leyó un patrón de 7 $\mu\text{g/L}$ de Hg, éste generó una absorbancia de 0,0384, luego el cálculo de la sensibilidad dio:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{0,0044 \times 7 \mu\text{g} / \text{L}}{0,0384} = 0,802 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}}$$

Este valor indica que una concentración de Hg de 0,802 $\mu\text{g/L}$ genera un aumento en la absorbancia de 1 %.

4.2.6 Precisión

La precisión de la metodología se evaluó con la desviación estándar y coeficiente de variación (% CV) de 21 mediciones de mercurio hechas sobre dos muestras de cabello. Una muestra de cabello de baja concentración en mercurio y otra muestra de cabello de alta concentración en mercurio. Las determinaciones se realizaron por triplicado durante 7 días. Con estas determinaciones se evaluó la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Tabla 10. Medidas de la concentración de mercurio realizadas a una muestra de cabello de baja concentración.

Medición	Réplica 1 µg/g	Réplica 2 µg/g	Réplica 3 µg/g	Promedio	DS	% CV	Concentración µg/g ± DS
1	2,80	2,86	2,80	2,82	0.03	1,2	2.82 ± 0,03
2	2,59	2,55	2,42	2,52	0.09	3,4	2.52 ± 0,09
3	2,73	2,77	2,84	2,78	0.06	2	2.78 ± 0,06
4	2,95	3,10	2,95	3,00	0.09	3	3.00 ± 0,09
5	2,60	2,50	2,46	2,52	0.07	3	2.52 ± 0,07
6	2,86	2,81	2,85	2,84	0.03	0,9	2.84 ± 0,03
7	3,20	3,25	3,21	3,22	0.03	0,8	3.22 ± 0,03
Promedio		2.8					
DS		0.2					
%CV		7.5					

La **Tabla 10** muestra los valores de desviación estándar y de % CV para las medidas diarias y para todo el conjunto de medidas realizadas a una muestra de cabello de baja concentración. Se observa, que los valores de % CV para el análisis de mercurio son inferiores al 10 % para cada uno de los días, esto muestra que los datos son precisos y que la metodología presenta errores aleatorios que están bajo control. Se puede asegurar que la metodología es

reproducibile entre días, puesto que la desviación estándar es solo de 0,21 y el % CV es inferior al 10 % para todo el conjunto de datos, por tanto la metodología presenta datos precisos para el análisis de mercurio en muestras de cabello de baja concentración.

La **Tabla 11** presenta las concentraciones de mercurio halladas en una muestra de cabello con Hg en alta concentración. Los datos muestran una desviación estándar de 0.33 y un % CV menor del 10 %, esto indica que los datos son precisos y los errores aleatorios para las determinaciones de mercurio en muestras de cabello con su concentración alta se encuentran bajo control. La dispersión en los datos es pequeña para las medidas realizadas en días diferentes indicando que la metodología es reproducible entre días diferentes.

Todos los CV obtenidos tanto para la muestra de baja como para la de alta concentración de Hg , fueron inferiores a los tabulados en la ecuación de Horwitz para rangos de concentración entre 0.1 y 10 $\mu\text{g/g}$ (Véase Anexo E)..

Tabla 11. Medidas de la concentración de mercurio realizadas a una muestra de cabello de alta concentración.

Número de mediciones	Réplica 1 µg/g	Réplica 2 µg/g	Réplica 3 µg/g	Promedio	DS	% CV	Concentración µg/g ± DS
1	7,3	7,31	7,26	7,29	0,03	0,34	7.29 ± 0,03
2	7,3	7,32	7,49	7,37	0,1	1	7.4 ± 0,1
3	8,2	8,22	8,06	8,16	0,09	1	8.16 ± 0,09
4	7,4	7,39	7,2	7,33	0,11	2	7.3 ± 0,1
5	7,6	7,58	7,41	7,53	0,10	1	7.5 ± 0,1
6	7,2	7,14	7,08	7,14	0,06	0,8	7.14 ± 0,06
7	7,2	7,3	7,31	7,27	0,06	0,8	7.27 ± 0,06
Promedio		7,4					
DS		0,3					
% CV		4					

Comparando los datos de las **Tablas 10** y **11** se observa que las determinaciones de mercurio realizadas en muestras de cabello con alta concentración de Hg presentan % CV más bajos que en las determinaciones de baja concentración, esto muestra que la técnica es más precisa para la determinación de mercurio en muestras de cabello con alta concentración y que la variabilidad de las medidas disminuye al aumentar la concentración.

Estos resultados son aplicables para muestras que pueden ser interpoladas en la curva de calibración sin realizar alguna dilución.

4.2.7 Exactitud

La evaluación de la exactitud para la metodología se realizó con el cálculo del porcentaje de recuperación para la medida de tres materiales de referencia certificados con baja, media y alta concentración en mercurio.

Los resultados obtenidos en los tres CRM de cabello muestran porcentajes de recuperación cercanos al 100%. (Véase Tablas 12, 13 y 14), lo que demuestra que la metodología es exacta, con un desempeño eficiente de los procesos de digestión y de detección. y que no existen errores sistemáticos que afecten los resultados para las determinaciones de mercurio en muestras de cabello a diferentes concentraciones.

Tabla 12. Determinaciones de mercurio realizadas a un CRM de cabello de $0.573 \pm 0.039 \mu\text{g/g}$ de mercurio para la evaluación de la exactitud.

Medidas	Concentración	Recuperación*, %
1	0.512	89.35
2	0.513	89.53
3	0.59	102.97
4	0.630	109.95
Promedio	0.56 ± 0.06	98 ± 10

*Valor calculado tomando como valor verdadero la concentración reportada en el certificado del CRM.

Tabla 13. Determinaciones de mercurio realizadas a un CRM de cabello de $4.42 \pm 0.20 \mu\text{g/g}$ de mercurio para la evaluación de la exactitud.

Medidas	Concentración	Recuperación**%
1	4.15	93.89
2	4.46	100.90
3	4.30	97.29
4	4.60	104.07
Promedio	4.4 ± 0.2	99 ± 4

*Valor calculado tomando como valor verdadero la concentración reportada en el certificado del CRM.

Tabla 14. Determinaciones de mercurio realizadas a un CRM de cabello de $23.2 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$ de mercurio para la evaluación de la exactitud.

Medidas	Réplica 1 $\mu\text{g/g}$	Réplica 2 $\mu\text{g/g}$	Réplica 3 $\mu\text{g/g}$	Promedio	DS	Porcentaje de Recuperación *
1	23,5	23,6	23,6	23.5	0.06	101.4
2	22,9	23,1	23,8	23.3	0.5	100.5
3	23,5	23,1	24,1	23.5	0.5	101.5
4	23,3	23.	20,8	22	1.	89.44
5	23,1	23,4	22.4	23	0.5	99.05
\bar{x}			-----			98 ± 5

*Valor calculado tomando como valor verdadero la concentración reportada en el certificado del CRM.

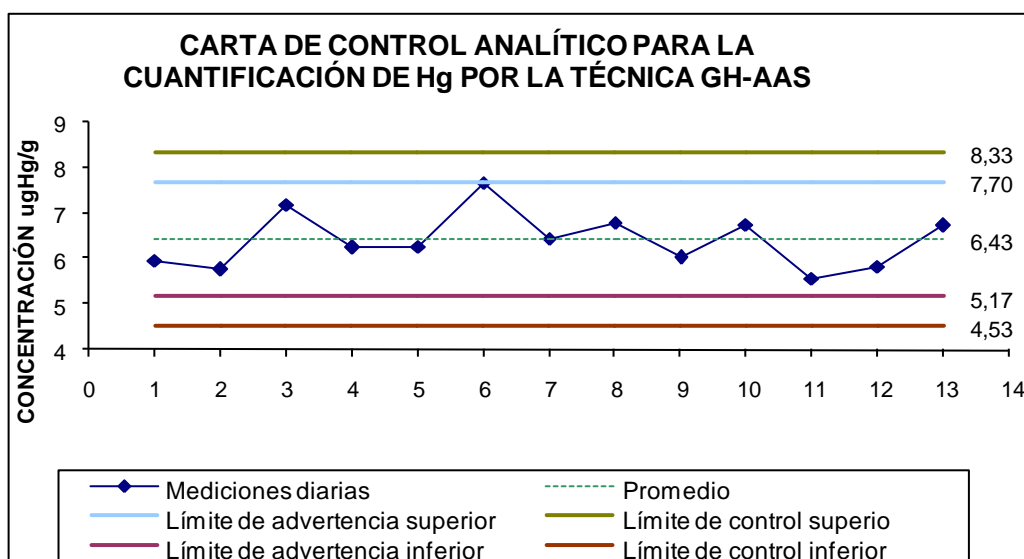
4.2.8. Control de la calidad analítica para la determinación de Hg por la técnica HG-AAS

Para realizar un control analítico a las determinaciones de Hg por la técnica HG-AAS se elaboró una carta de control analítico con las medidas realizadas diariamente a un patrón de 6 µg/L de Hg.

Tabla 15. Medidas realizadas diariamente a un patrón de 6 µg/g de Hg para la elaboración de la carta de control analítico.

Patrón de Hg (6 µg/L)	5.96	5.77	7.2	6.25	6.27	7.68	6.45	6.8	6.04	6.76	5.57	5.84	6.74
Medidas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Figura 8. Carta de control analítico para las determinaciones de Hg por la técnica HG-AAS.



El comportamiento de los análisis de Hg por la técnica de HG-AAS mostrado en la **Figura 8** indica que no existen errores aleatorios inesperados o fuera de control, puesto que los datos varían dentro de los límites de advertencia. El comportamiento de las mediciones es periódico y no existen tendencias marcadas, lo cual indica que la metodología no está sujeta a errores sistemáticos al variar el día de la medida.

4.3 DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA DE GENERADOR DE HIDRUROS

4.3.1 Pesada de las muestras

Se determinó la incertidumbre aportada al pesar las muestras. Se consideraron dos fuentes de incertidumbre, la incertidumbre dada por la división de la escala de la balanza y la incertidumbre en la calibración de la balanza.

4.3.1.1 Incertidumbre estándar en la división de la escala de la balanza

La balanza usada muestra datos con 4 decimales, para la pesada, por tanto, la incertidumbre estándar será: División= 0,0001g $U1 = 0,0001 / \sqrt{3} = 0,000058$

4.3.1.2 Incertidumbre estándar en la calibración de la balanza

El certificado de calibración de la balanza emitido por MetroLabor Ltda. presenta el siguiente valor de incertidumbre.

$U = 2E - 04 + 3,4E - 06w$, donde w es el peso de muestra. Para la metodología se pesaron alrededor de 0.030 grs de muestra, por tanto, la incertidumbre será:

$$U2 = (2E - 04 + 3,4E - 06 * 0,030) / \sqrt{3} = 0,000115$$

4.3.1.3 Incertidumbre combinada en la pesada de las muestras

Se obtiene combinando de forma cuadrática la incertidumbre estándar de la calibración y la incertidumbre estándar de la división de escala de la balanza.

$$U_{c1} = \sqrt{(U1)^2 + (U2)^2} = \sqrt{(0,000058)^2 + (0,000115)^2} = 0,00013$$

4.3.1.4 Incertidumbre estándar relativa para la pesada de las muestras

La incertidumbre estándar relativa para la pesada de las muestras está dada por el cociente entre la incertidumbre combinada U_{c1} y el peso de muestra.

$$U_{ER1} = U_{c1}/0.030 = 0.00016/0.030 = 0.0043$$

4.3.2 Incertidumbre generada en la dilución de las muestras por adición de reactivos en el proceso de digestión

La metodología usada en la etapa de digestión de la muestra implica la adición sucesiva de reactivos, en este proceso, se genera una incertidumbre debida a cada volumen adicionado. Se calculó la incertidumbre estándar relativa para la adición de cada reactivo. Con esto, se calculó la incertidumbre estándar relativa para la dilución final de las muestras.

4.3.2.1 Incertidumbre generada en la adición de 1,25 mL de ácido sulfúrico

Se determinó el aporte de incertidumbre generado por la adición de 1,25 mL de ácido sulfúrico usando una pipeta graduada de 2 mL. Se cuantificaron las contribuciones debidas a la variación de la temperatura durante la medida, la repetibilidad de la pipeta de 2 mL y su tolerancia.

❖ **Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta de 2mL**

En la verificación del material volumétrico se obtuvo la desviación estándar de 10 mediciones de volumen, asumiendo una distribución normal, la incertidumbre está dada por: $U = s / \sqrt{n}$, donde s es la desviación estándar y n el número de medidas.

$$U3 = 0,05 / \sqrt{10} = 0,0158$$

❖ **Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura**

Esta contribución se obtiene multiplicando variación de la temperatura (4°C), el coeficiente de expansión del agua (2E-4) y el volumen del material volumétrico (2 mL) y una distribución rectangular.

$$U4 = (4 * 2E - 4 * 2) / \sqrt{3} = 0,00092$$

❖ **Incertidumbre estándar por la tolerancia de la pipeta de 2 mL**

El fabricante de la pipeta usada para la toma de la alícuota reporta un valor de tolerancia de ± 0.015 mL se presume una distribución rectangular de este reporte, por tanto, la incertidumbre está dada por:

$$U5 = Tolerancia / \sqrt{3} = 0,015 / \sqrt{3} = 0,00870$$

❖ **Incertidumbre combinada de la pipeta de 2 mL**

$$Uc2 = \sqrt{(U3)^2 + (U4)^2 + (U5)^2} = \sqrt{(0,01580)^2 + (0,00092)^2 + (0,00870)^2} = 0,01806$$

❖ Incertidumbre Estándar Relativa en la medida de 1,25 mL

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre U_{c2} y el volumen de la medida (1,25 mL).

$$U_{ER2} = U_{c2}/1,25 = 0,01806/1,25 = 0,01448$$

4.3.2.2 Incertidumbre generada en la adición de 0,5 mL de ácido nítrico

Se determinó el aporte de incertidumbre generado por la adición de 0,5 mL de ácido nítrico usando una pipeta graduada de 1 mL. Se cuantificaron las contribuciones debidas a la variación de la temperatura en la medida, la repetibilidad de la pipeta de 1 mL y la tolerancia de la pipeta.

❖ Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta de 1 mL

En la verificación del material volumétrico se obtuvo la desviación estándar de 10 mediciones de volumen, suponiendo una distribución normal, la incertidumbre está

dada por: $U = s/\sqrt{n}$, donde n es el número de medidas.

$$U_6 = 0,0013/\sqrt{10} = 0,00041$$

❖ Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura

Esta contribución se obtiene multiplicando variación de la temperatura (4°C), el coeficiente de expansión del agua (2E-4) y el volumen del material volumétrico (1 mL) y una distribución rectangular.

$$U_7 = (4 * 2E - 4 * 1)/\sqrt{3} = 0,00046$$

❖ **Incertidumbre estándar por la tolerancia de la pipeta de 1 mL**

El fabricante de la pipeta usada para la toma de la alícuota reporta un valor de tolerancia de ± 0.007 mL y se supone una distribución rectangular, por tanto, la incertidumbre está dada por:

$$U8 = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0,007 / \sqrt{3} = 0,0040$$

❖ **Incertidumbre combinada de la pipeta de 1 mL**

$$Uc3 = \sqrt{(U6)^2 + (U7)^2 + (U8)^2} = \sqrt{(0,0004)^2 + (0,00046)^2 + (0,0040)^2} = 0,004$$

❖ **Incertidumbre estándar relativa en la medida de 0,5 mL**

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre $Uc3$ y el volumen de la medida (0.5 mL).

$$U_{ER3} = Uc3 / 0,5 = 0,004 / 0.5 = 0.0081$$

4.3.2.3 Incertidumbre generada por la adición de 10 mL de agua destilada

Se tiene en cuenta el aporte de incertidumbre en la repetibilidad de la medida de 10 mL, el efecto de la temperatura y la tolerancia de la pipeta de 10 mL.

❖ **Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta de 10 mL**

En la verificación del material volumétrico se obtuvo la desviación estándar de 10 mediciones de volumen para la pipeta de 10 mL, suponiendo una distribución normal, la incertidumbre está dada por: $U9 = s / \sqrt{n}$, donde s es la desviación estándar de las medidas y n es el número de medidas.

$$U9 = 0.0088 / \sqrt{10} = 0.0028$$

❖ **Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura**

Esta contribución se obtiene multiplicando la variación de la temperatura (4°C), el coeficiente de expansión del agua (2E-4) y el volumen del material volumétrico (10 mL) y una distribución rectangular.

$$U_{10} = (4 * 2E - 4 * 10) / \sqrt{3} = 0.00462$$

❖ **Incertidumbre estándar por la tolerancia de la pipeta de 10 mL**

El fabricante de la pipeta usada para la toma de la alícuota reporta un valor de tolerancia de ±0.02 mL y se supone una distribución rectangular, por tanto, la incertidumbre está dada por:

$$U_{11} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0.02 / \sqrt{3} = 0.012$$

❖ **Incertidumbre combinada de la pipeta de 10 mL**

$$U_{c4} = \sqrt{(U_9)^2 + (U_{10})^2 + (U_{11})^2} = \sqrt{(0.0028)^2 + (0.00462)^2 + (0.012)^2} = 0.0132$$

❖ **Incertidumbre estándar relativa de la pipeta de 10 mL**

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre U_{c3} y el volumen de la pipeta (10 mL).

$$U_{ER4} = U_{c4} / 10 = 0.0132 / 10 = 0.00132$$

4.3.2.4 Incertidumbre generada en la adición de 2,5 mL de permanganato de potasio

Se determinó el aporte de incertidumbre generado por la adición de 2,5 mL de permanganato de potasio, usando una pipeta graduada de 5 mL. Se cuantificaron las contribuciones debidas a la variación de la temperatura en la medida, la repetibilidad de la pipeta de 1 mL y la tolerancia de la pipeta.

❖ Incertidumbre estándar por la repetibilidad de la pipeta de 5mL

En la verificación del material volumétrico se obtuvo la desviación estándar de 10 mediciones de volumen con la pipeta de 5 mL, suponiendo una distribución normal, la incertidumbre está dada por: $U = s/\sqrt{n}$, donde n es el número de medidas.

$$U_{12} = 0,0091/\sqrt{10} = 0,00288$$

❖ Incertidumbre estándar por el efecto de la temperatura

Esta contribución se obtiene multiplicando la variación de la temperatura (4°C), el coeficiente de expansión del agua (2E-4) y el volumen del material volumétrico (5 mL) y una distribución rectangular.

$$U_{13} = (4 * 2E - 4 * 5) / \sqrt{3} = 0,00231$$

❖ Incertidumbre estándar por la tolerancia de la pipeta de 5 mL

El fabricante de la pipeta usada para la toma de la alícuota reporta un valor de tolerancia de ± 0.015 mL y se supone una distribución rectangular, por tanto, la incertidumbre está dada por:

$$U_{14} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0,015 / \sqrt{3} = 0,00866$$

❖ **Incertidumbre combinada de la pipeta de 5 mL**

$$U_{c5} = \sqrt{(U12)^2 + (U13)^2 + (U14)^2} = \sqrt{(0,00288)^2 + (0,00231)^2 + (0,00866)^2} = 0,00941$$

❖ **Incertidumbre estándar relativa en la medida de 2,5 mL**

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre U_{c5} y el volumen de la medida (2,5 mL).

$$U_{ER5} = U_{c5} / 2,5 = 0,00073 / 2,5 = 0,000292$$

4.3.2.5 Incertidumbre generada en la adición de 1 mL de persulfato de potasio

Se determinó el aporte de incertidumbre generado por la adición de 1 mL de persulfato de potasio usando una pipeta graduada de 1 mL. Se cuantificaron las contribuciones debidas a la variación de la temperatura en la medida, la repetibilidad de la pipeta de 1 mL y la tolerancia de la pipeta de 1 mL como se realizó en el numeral 4.3.2.2.

❖ **Incertidumbre estándar relativa en la medida de 1 mL**

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre U_{c3} y el volumen de la medida (1 mL).

$$U_{ER6} = U_{c3} / 1 = 0,004 / 1 = 0,004$$

4.3.2.6 Incertidumbre generada en la adición de 0,66 mL de cloruro de hidroxilamina

Se determinó el aporte de incertidumbre generado por la adición de 0,66 mL de cloruro de hidroxilamina usando una pipeta graduada de 1 mL. Se cuantificaron las contribuciones debidas a la variación de la temperatura en la medida, la repetibilidad de la pipeta de 1 mL y la tolerancia de la pipeta, para calcular la incertidumbre combinada de la pipeta de 1 mL como se realizó en el numeral 4.3.2.2.

❖ Incertidumbre estándar relativa en la medida de 0,66 mL

La incertidumbre estándar relativa está dada por el cociente entre U_{c3} y el volumen de la medida (0,66 mL).

$$U_{ER7} = U_{c3} / 0,66 = 0,004 / 0,66 = 0,0061$$

4.3.2.7 Incertidumbre combinada para la dilución de las muestras por adición de reactivos

Se combinan de forma cuadrática cada una de las incertidumbres estándar relativas calculadas para la adición de cada uno de los reactivos.

$$U_{c6} = \sqrt{(U_{ER2})^2 + (U_{ER3})^2 + (U_{ER4})^2 + (U_{ER5})^2 + (U_{ER6})^2 + (U_{ER7})^2}$$

$$U_{c6} = \sqrt{(0,014448)^2 + (0,0081)^2 + (0,00132)^2 + (0,00377)^2 + (0,004)^2 + (0,0061)^2} = 0,023$$

4.3.2.8 Incertidumbre estándar relativa para la dilución de las muestras a 15,91 mL

Esta incertidumbre está dada por el cociente entre la incertidumbre combinada y el volumen de dilución.

$$U_{ER8} = Uc6/15.91 = 0.0186/15.91 = 0.0012$$

4.3.3 Incertidumbre debida a la precisión en la medida de las muestras

Teniendo en cuenta que la precisión en la metodología se evaluó a dos niveles de concentración, es conveniente determinar la desviación estándar ponderada como una expresión de la incertidumbre debida a la medida repetitiva de las muestras.

De la **Tabla 16**, se obtienen los valores de los promedios, la desviación estándar y el CV %, para las medidas a dos niveles de concentración.

Tabla 16. Desviación estándar ponderada para el análisis de las muestras de cabello por la técnica HG-AAS.

Muestras de cabello	Concentración	
	Baja (µg/g)	Alta (µg/g)
Promedio	2	7.4
SD	0.3	0.3379
% CV	0.09	0.0454
SD ponderada	0.0407	

4.3.4 Incertidumbre generada en la elaboración de la curva de calibración

En esta etapa se combinó la incertidumbre generada en la preparación de los patrones con la incertidumbre generada en la lectura de los patrones en el equipo para la construcción de la curva de calibración.

4.3.4.1 Incertidumbre generada en la preparación de las soluciones patrón

Se calcularon la incertidumbre aportada por el Certipur de 1000 mg/L de mercurio del cual se prepararon las soluciones patrón, la incertidumbre generada en factor de dilución usado en la elaboración de los patrones y la incertidumbre debida a la dilución por adición de reactivos.

❖ Incertidumbre debida al primer factor de dilución (Preparación de la solución madre en la curva de calibración)

Como se mencionó en la metodología, para preparar los patrones de la curva de calibración, primero, se preparó una solución madre de 100 µg/L a partir del Certipur de 1000 mg/L midiendo 10 µL del Certipur y llevando a un aforo a 100 mL. Para el cálculo de la incertidumbre se tuvo en cuenta el aporte debido al uso de la micropipeta de 100 µL y al balón de 100 mL

❖ Incertidumbre generada por la micropipeta de 100 µL (alícuota)

Se tuvo en cuenta el efecto de la variación de la temperatura y la tolerancia de la pipeta calculados como se describe a continuación:

La contribución debida a la variación de la temperatura se obtiene multiplicando: variación de la temperatura (4°C), el coeficiente de expansión del agua (2E-4) y el volumen del material volumétrico (100 µL = 0.1mL) y una distribución rectangular.

$$U_{15} = (4 * 2E - 4 * 0.1) / \sqrt{3} = 0.00005$$

Finalmente el fabricante de la micropipeta usada para la toma de la alícuota reporta un valor de tolerancia del 0.16 % es decir $\pm 0.16 \mu\text{L}$. Se asume una distribución rectangular, por tanto la incertidumbre esta dada por:

$$U_{16} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 1.6 \times 10^{-4} / \sqrt{3} = 0.0001$$

Con los anteriores valores se calculó la incertidumbre combinada para la micropipeta de 100 μL

$$U_{c7} = \sqrt{(U_{15})^2 + (U_{16})^2} = \sqrt{(0.00005)^2 + (0.0001)^2} = 0.0001$$

La incertidumbre estándar relativa esta dada por el cociente entre U_{c7} y el volumen de la alícuota (0.01 mL).

$$U_{ER9} = U_{c7} / 0.1 = 0.0001 / 0.01 = 0.01$$

❖ Incertidumbre generada por el balón de 100 mL (aforo)

En la verificación del material volumétrico se obtuvo la desviación estándar de 10 mediciones de volumen con el balón aforado de 100 mL y con este valor se calculó el aporte de incertidumbre generado por la repetibilidad del balón aforado de 100 mL. Asumiendo una distribución normal, la incertidumbre estándar esta dada por: $U = s / \sqrt{n}$ Donde n es el número de medidas.

$$U_{17} = 0.0167 / \sqrt{10} = 0.0053$$

La incertidumbre generada por la variación de la temperatura se obtiene multiplicando: la variación de temperatura (4°C), el coeficiente de expansión del agua (2E-4) y el volumen del balón (100 mL) y una distribución rectangular.

$$U_{18} = (4 * 2E - 4 * 100) / \sqrt{3} = 0.0462$$

El fabricante del balón aforado reporta un valor de tolerancia de ± 0.1 mL y se asume una distribución rectangular, por tanto la incertidumbre estándar debida a la tolerancia del balón esta dada por:

$$U_{19} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0.1 / \sqrt{3} = 0.0577$$

Con los anteriores valores se calculó la incertidumbre combinada del balón de 100 mL.

$$U_{c8} = \sqrt{(U_{17})^2 + (U_{18})^2 + (U_{19})^2} = \sqrt{(0.0053)^2 + (0.0462)^2 + (0.0577)^2} = 0.0741$$

La incertidumbre estándar relativa esta dada por el cociente entre U_{c8} y el volumen del aforo (100 mL).

$$U_{ER10} = U_{c8} / 100 = 0.0741 / 100 = 0.0007$$

❖ Incertidumbre estándar relativa del primer factor de dilución

Se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa de la micropipeta de 100 μ L (U_{ER9}) y la incertidumbre estándar relativa del balón de 100 mL (U_{ER10})

$$U_{ER11} = \sqrt{(U_{ER9})^2 + (U_{ER10})^2} = \sqrt{(0.011)^2 + (0.0007)^2} = 0.011$$

❖ Incertidumbre debida a la segunda dilución (preparación de los patrones a partir de la “solución madre”). Dilución por adición de reactivos

Ya con la solución madre preparada se prosiguió a evaluar la incertidumbre generada durante la segunda de dilución, en donde a partir de la solución madre se tomaron las diversas alícuotas con una bureta de 25 mL, que adicionadas con los volúmenes de los diferentes reactivos permitieron obtener los patrones de la concentración deseada en mercurio.

❖ **Incertidumbre generada por uso de la bureta de 25 mL (adición de alícuotas de “solución madre” y adición de agua para completar 10 mL)**

Se tienen en cuenta los tres aportes para el material volumétrico: repetibilidad de la bureta, efecto de la temperatura y tolerancia de la bureta.

La incertidumbre estándar por la repetibilidad de la bureta de 25 mL se obtuvo en la verificación del material volumétrico. Se calculó la desviación estándar de 10 mediciones de volumen con la bureta de 25 mL, a la cual se le calculó la incertidumbre estándar. Se asumió una distribución normal de los datos.

$$U_{20} = s / \sqrt{n} \text{ Siendo } n \text{ el número de mediciones. } U_{20} = 0.026 / \sqrt{10} = 0.0082$$

La incertidumbre estándar por el efecto en la variación temperatura obtiene multiplicando: La variación de la temperatura (4°C), el coeficiente de expansión del agua (2E-4) y el volumen de la bureta (25 mL) y una distribución rectangular.

$$U_{21} = (4 * 2E - 4 * 25) / \sqrt{3} = 0.0115$$

El fabricante de la bureta de 25 mL usada para la toma de las alícuotas reporta un valor de tolerancia de ±0.05 mL. Asumiendo una distribución rectangular se calcula la Incertidumbre estándar debida a la tolerancia de la bureta de 25 mL con la siguiente ecuación.

$$U_{22} = \text{Tolerancia} / \sqrt{3} = 0.05 / \sqrt{3} = 0.02887$$

Se combinaron las incertidumbres estándar de la bureta de 25 mL de acuerdo con la ley de propagación de errores

$$U_{c9} = \sqrt{(U_{20})^2 + (U_{21})^2 + (U_{22})^2} = \sqrt{(0.0082)^2 + (0.0115)^2 + (0.02887)^2} = 0.03214$$

Y por tanto, la incertidumbre estándar relativa de la bureta de 25 mL está dada por el cociente entre U_{c9} y el volumen de aforo (25 mL).

$$U_{ER12} = U_{c9} / 25 = 0.03214 / 25 = 0.00129$$

Este valor lo tenemos en cuenta dos veces, uno para la medida de las alícuotas de solución madre y otro para la adición de agua desionizada para completar 10 mL para cada alícuota.

❖ **Incertidumbre estándar relativa en el segundo factor de dilución. Dilución por adición de reactivos a los patrones usados en la elaboración de la curva de calibración**

Se combinaron las contribuciones realizadas por la pipeta de 2 mL usada en la medida de 1.25 mL de ácido sulfúrico, la pipeta de 1 mL usada en la medida de 0.5 mL de ácido nítrico, la bureta de 25 mL usada en la medida de las alícuotas de solución madre y agua desionizada, la pipeta de 5 mL usada en la medida de 2.5 mL de permanganato de potasio, la pipeta de 1 mL usada en la medida de 1 mL de persulfato de potasio, la pipeta de 1 mL usada en la medida de 0,66 mL de cloruro de hidroxilamina. Dichas contribuciones fueron calculadas en el numeral **4.3.2**

Con los valores descritos se calculó la incertidumbre combinada para la dilución por adición de reactivos a los patrones.

$$U_{ER13} = \sqrt{(U_{ER2})^2 + (U_{ER3})^2 + (U_{ER12})^2 + (U_{ER5})^2 + (U_{ER6})^2 + (U_{ER7})^2}$$

$$U_{ER13} = \sqrt{(0.01448)^2 + (0.0081)^2 + (2 \times (0.00129)^2) + (0.00377)^2 + (0.004)^2 + (0.0061)^2}$$

$$U_{ER13} = 0.0186$$

❖ **Incertidumbre estándar debida al material de referencia certificado con el cual se preparó la curva de calibración**

El material de referencia certificado tiene asociado un valor de incertidumbre relacionado con la concentración. El certificado reporta un valor de incertidumbre en la concentración de ± 2 mg/L. Suponiendo una distribución rectangular. La incertidumbre estándar estará dada por:

$$U_{23} = U_{\text{exp}}/\sqrt{3} = 2/\sqrt{3} = 1.1547$$

La incertidumbre estándar relativa se obtiene dividiendo la incertidumbre estándar por el valor de concentración del material de referencia certificado.

$$U_{ER14} = U_{23}/1000 = 0.00115$$

❖ Incertidumbre estándar relativa debida a la preparación de los patrones usados en la curva de calibración

La incertidumbre estándar relativa debida a la preparación de los patrones se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa del primer factor de dilución, del segundo factor de dilución y del material de referencia certificado.

$$U_{ER15} = \sqrt{(U_{ER11})^2 + (U_{ER13})^2 + (U_{ER14})^2} = \sqrt{(0.00133)^2 + (0.0186)^2 + (0.00115)^2} = 0.0187$$

4.3.4.2 Incertidumbre estándar debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones

Para una ecuación de tipo $\gamma = m\alpha + b$

Despejamos la componente que corresponde a la concentración como se muestra en la ecuación.

α = Concentración de masa

γ = Respuesta del instrumento

b = La ordenada al origen

m = La pendiente calculada

$$\alpha = \frac{\gamma - b}{m}$$

En la **Tabla 17** se muestra un diseño típico experimental .para la estimación de la incertidumbre, se realizó una curva de calibración con i concentraciones y j repeticiones con lo que se hace un arreglo α_i, γ_j .

Tabla 17. Diseño experimental elaborado para la curva de calibración.

Curvas de calibración					
	γ_1	γ_2	γ_j
α_1	α_1, γ_1				
α_2					
...					
...					
α_i					α_i, γ_j

Fuente: Guía Eurachem/CITAC, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement

Para este arreglo se realizó la regresión lineal y se calculó m y b , por medio de un ajuste de mínimos cuadrados.

Tenemos. $m = 0.0053$ y $b = 0.0003$

Con los datos obtenidos, en la elaboración de la ecuación de la curva de calibración, se estimó la incertidumbre, en la concentración del elemento químico a medir " α ", con base al cálculo de regresión lineal de la curva de calibración con una respuesta " γ ". Como se muestra en la ecuación.

$$U\gamma = \frac{S}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\gamma - \bar{\alpha}_{MRC})^2}{S_{xx}}}$$

$U\gamma$	Incertidumbre del mensurado obtenida con el instrumento calibrado
S	Desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal
m	Pendiente calculada
p	El número de réplicas de la muestra en estudio
n	Número de puntos en la curva de calibración, multiplicada por el número de réplicas "i*j".
α	La concentración en estudio
$\bar{\alpha}_{MRC}$	Valor medio de las concentraciones en los patrones de la calibración
S_{xx}	Suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones

Remplazando:

$$U_{24} = \frac{9.7885 \times 10^{-3}}{0.0053} \sqrt{\frac{1}{7} + \frac{1}{30} + \frac{(10 - 9.33)^2}{661.33}} = 1.675$$

La desviación estándar residual esta dada por:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (\gamma_j - (m\alpha + b))^2}{n-2}} = 9.7885 \times 10^{-3} \quad \text{y} \quad S_{xx} = \sum_{j=1}^n (\alpha_i - \bar{\alpha})^2 = 661.33$$

Donde:

γ_j	Las j lecturas observadas
$m\alpha + b$	Las j lecturas ajustadas
α_i	Las i concentraciones usadas en la curva de calibración
$\bar{\alpha}$	Concentración media en la curva de calibración

El procedimiento de ajuste por mínimos cuadrados asume que la incertidumbre de los valores de la abscisa son pequeños en comparación con los valores de la

ordenada. Este procedimiento refleja la incertidumbre de los valores de absorbancia y no la incertidumbre de los estándares de calibración. Se escogió el valor de concentración como representativo de las lecturas

❖ **Incertidumbre estándar relativa debida a la respuesta del equipo al leer la absorbancia de los patrones**

Se obtuvo dividiendo la incertidumbre estándar debida a la curva de calibración entre el valor más alto de concentración en la curva de calibración con el fin de involucrar todos los valores de concentración en la curva, (30 µg/L)

$$U_{ER16} = U_{24}/30 = 1.675/30 = 0.0560$$

4.3.4.3 Incertidumbre estándar relativa debida a la curva de calibración

La incertidumbre estándar relativa debida a la curva de calibración se obtuvo combinando la incertidumbre estándar relativa debida a la preparación de los patrones con la incertidumbre estándar relativa debida a la lectura de los patrones.

$$U_{ER17} = \sqrt{(U_{ER15})^2 + (U_{ER16})^2} = \sqrt{(0.0187)^2 + (0.0560)^2} = 0.059$$

4.3.5 Incertidumbre combinada del método

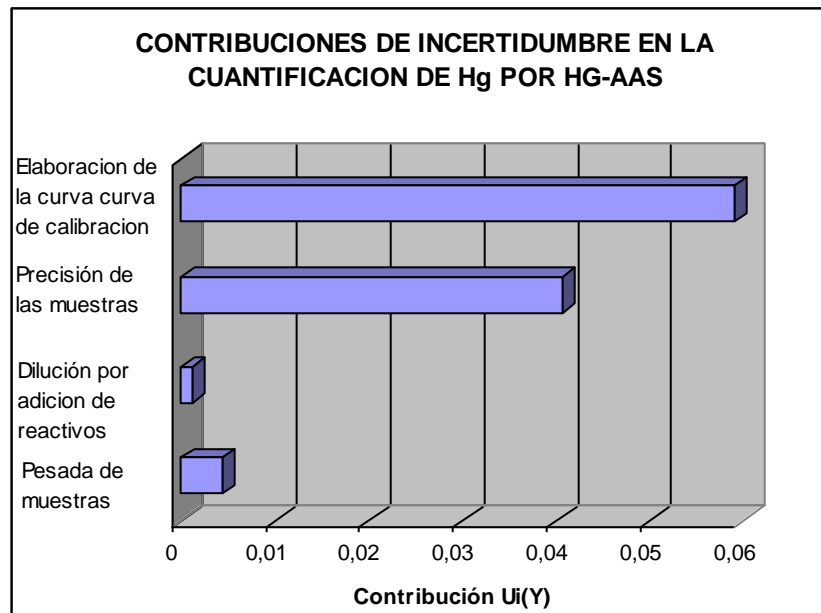
Esta se obtiene combinando la incertidumbre estándar relativa debida a:

- 1 Pesada de las muestras.
- 2 Dilución de las muestras por adición de reactivos.
- 3 Repetibilidad en la lectura de las muestras
- 4 Elaboración de la curva de calibración.

$$U_{c_{\text{método}}} = \sqrt{(U_{ER1})^2 + (U_{ER8})^2 + (SDP_{\text{ponderada}_{\text{muestras}}})^2 + (U_{ER17})^2}$$

$$U_{c_{\text{método}}} = \sqrt{(0.0043)^2 + (0.0012)^2 + (0.0407)^2 + (0.059)^2} = 0.0720$$

Figura 9. Contribución de incertidumbre calculada en la cuantificación de Hg por la técnica HG-AAS



Fuente: Luz Helena Sánchez Rodríguez, autora del presente proyecto

La curva de calibración hace la mayor contribución en incertidumbre a la metodología como se muestra en la **Figura 9**, esto es debido a que la elaboración de la curva de calibración involucra diversos pasos que van desde la medida de volúmenes hasta la lectura de absorbancias. La digestión de las muestras de cabello implica la dilución de la muestra por adición de reactivos, aunque se manejan diferentes volúmenes, el aporte en la incertidumbre para la metodología

en esta etapa es muy pequeña, debido a que se manejan volúmenes pequeños y el material usado es de tipo A.

4.4 INCERTIDUMBRE EXPANDIDA

Se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada del método por k (el factor de cobertura).

$$U_{\text{expmet}} = \pm U_{\text{cdel método}} \times K = \pm 0.0720 \times 2 = \pm 0.115 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

4.4.1 Cálculo de la incertidumbre expandida en la concentración del analito

Se obtiene multiplicando la incertidumbre expandida por la concentración determinada en la metodología.

$$U = C \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \times U_{\text{expmet}}$$

En donde C es el valor de la concentración de mercurio en una muestra analizada por la metodología descrita.

4.4.2 Expresión del resultado

Expresión del resultado: $C \pm U \mu\text{g/g}$.

4.5 PREVALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DIFERENCIAL DE ZEEMAN CON PIROLIZADOR

4.5.1 Verificación de equipos

4.5.1.1 Calibración de la balanza

La empresa Metrolabor Ltda. realizó la calibración de la balanza METTLER TOLEDO **AG285** con la emisión del respectivo certificado de calibración (Ver **Anexo F**).

4.5.1.2 Equipo de absorción atómica diferencial con efecto Zeeman con pirolizador

- **Dependencia del coeficiente de calibración A con el tiempo de calentamiento de la unidad adjunta. RP- 91C**

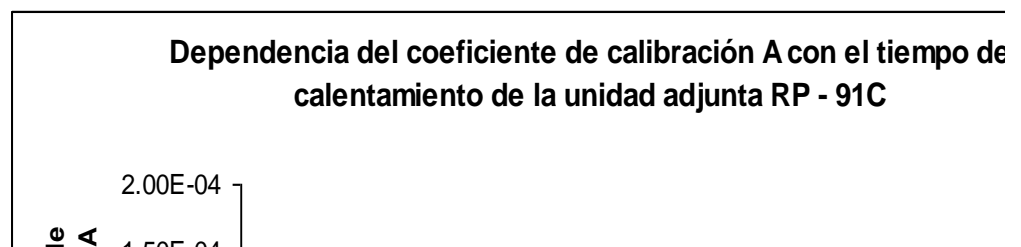
En la **Figura 10** se muestra como el coeficiente de calibración A, determinado para el acoplamiento RA-915+/ RP- 91C. (Véase **Ecuación 4**,) cambia con el tiempo de calentamiento del aditamento de pirolisis.

Experimentalmente se observa un aumento del coeficiente de calibración A, durante los primeros 120 minutos de calentamiento del pirolizador. A partir de este momento la respuesta del detector se estabiliza indicando que el aditamento de pirolisis alcanzó su temperatura máxima (800°C).

Este hecho se explica con base en dos aspectos: 1) la disminución de la densidad del aire dentro de la celda analítica con el aumento de la temperatura en el pirolizador, teniendo en cuenta que el flujo de aire que arrastra el vapor de mercurio hacia la celda analítica es constante durante todas las mediciones

(1L/min). 2) La dependencia de la respuesta del detector con la densidad de átomos de mercurio presentes en la celda analítica. Cuando se analizan muestras, el aire que entra al pirolizador, se combina con el vapor de mercurio generado gradualmente durante el proceso de pirólisis de las muestras de cabello. Esta mezcla gaseosa, que se encuentra a la temperatura del pirolizador, es conducida hacia la celda analítica donde el mercurio es detectado. A medida que la temperatura aumenta con el tiempo, la densidad de la mezcla aire mercurio disminuye dentro de la celda analítica hasta cuando la temperatura alcanza su valor máximo. En este momento la densidad de la mezcla gaseosa es casi constante, lo cual hace que la respuesta del detector sea también constante estabilizándose el coeficiente de calibración.

Figura 10. Dependencia del coeficiente de calibración A con el tiempo de calentamiento de la unidad adjunta. RP- 91C (pirolizador).



- **Determinación del intervalo dentro del cual se deben pesar la muestras de cabello a analizar por la técnica ZAAS**

Se registraron las señales para cada uno de los pesos escogidos, como se muestra en la **Tabla 18**. Se observa que después de 10 mg la señal del PMT cae por debajo de 8000 lo que indica que dichas mediciones carecen de exactitud y precisión. Por tanto se debe pesar menos de 10 mg de cabello para ser analizado por el acoplamiento RA-915⁺/ RP- 91C para obtener resultados precisos y exactos.

Tabla 18. Determinación del rango óptimo de pesada para muestras de cabello.

Peso de muestra	Área (A), cuentas	Máximo	Señal del PMT
2,15	14900	5010	≥8000
2,09	14600	5002	≥8000
2,15	13800	4430	≥8000
5,02	33200	7530	≥8000
5,12	33300	7450	≥8000
5,15	34900	7730	≥8000
7,54	49900	9460	≥8000
7,59	51800	12000	≥8000
7,46	48500	8070	≥8000
10,13	65700	13400	2000
9,97	64300	13300	4000
10,08	64200	13800	2000

Fuente: Luz Helena Sánchez Rodríguez. Autora del presente proyecto

4.6 VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO POR LA TÉCNICA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DIFERNCIAL DE ZEEMAN CON PIROLIZADOR

Se calcularon las figuras de mérito analíticas y se establecieron los parámetros de operación del analizador RA-915⁺ acoplado al aditamento RP-91C para el análisis de mercurio en muestras de cabello.

4.6.1 Límite de detección

Para la determinación del límite de detección se midió la masa de mercurio contenida en una muestra de cabello, que presumiblemente tenía una concentración baja de Hg, tal como se describió en 3.5.1. Se analizó 7 veces la muestra, para lo cual se pesó 5mg de cabello en cada determinación.

Tabla 19 Determinación del limite de detección realizado sobre una muestra de cabello de baja concentración de Hg.

Medidas	Masa de Hg, ng
1	0.02
2	-0.02
3	0.16
4	0.10
5	0.14
6	0.17
7	0.12
Promedio	0.10
Desviación estándar	0.07

Con los datos se determinó el límite de detección calculando la desviación estándar y el promedio de las medidas, aplicando la **Ecuación 2**

$$LD = 0.1 + 3 * 0.073 \quad LD = 0.32ng$$

Este valor nos indica que el analizador de mercurio RA-915⁺/RP-91C es capaz de detectar cantidades iguales o superiores a 0.32ng de mercurio en muestras de cabello para un peso de 5 mg.

4.6.2 Límite de cuantificación

Se aplicó la **Ecuación 3** y se usó el promedio y la desviación estándar de los análisis realizados para calcular el límite de detección.

$$LC = 0.1 + 10 * 0.073 \quad LC = 0.83 ng$$

El límite de cuantificación nos especifica la cantidad de mercurio que el analizador RA-915⁺/RP-91C es capaz de cuantificar. El analizador es capaz de generar una señal precisa y exacta en cantidades superiores o iguales a 0.74ng de mercurio en una muestra de cabello con un peso de muestra 5 mg. Como límite superior de cuantificación, se tomó el valor más alto de masa de mercurio leído por el equipo en la curva de calibración preparada para cuantificar muestras de concentraciones altas de Hg (222.76 ng de Hg, ver **Tabla 20**). Áreas reportadas por el equipo y ubicadas por fuera de los límites de cuantificación, no presentan características de exactitud y precisión que den validez al resultado.

4.6.3 Intervalo de validación y Curva de calibración

Se elaboraron las curvas de calibración para el análisis de cabellos de concentraciones inferiores a 5 µg/g de mercurio. En este caso se pesó entre 1 mg y 10 mg del CRM de 0.573 ± 0.039 µg/g y entre 1 mg y 7.5 mg del CRM de 4.4 ± 0.2 µg/g.

Se escogieron aleatoriamente 5 curvas de calibración elaboradas con masas iguales de Hg y leídas en días diferentes. Se calculó el promedio de las áreas registradas que corresponde a cada masa de Hg y con los promedios se elaboró la curva de calibración de la metodología.

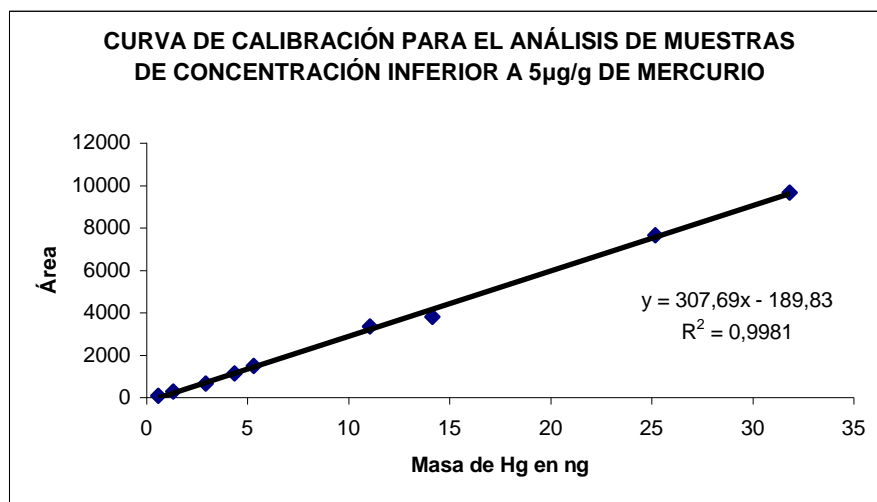
Tabla 20. Datos usados en la elaboración de la curva de calibración para la cuantificación de muestras de baja y media concentración de mercurio.

Masa de CRM(mg)	Masa de Hg en ng	Área					Promedio
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	
1*	0.573	86	88	82	90	74	85
2.3*	1.3179	275	270	278	275	267	273
5.1*	2.9223	649	647	643	641	650	646
7.6*	4.3548	1125	1126	1129	1130	1125	1130
1.2**	5.304	1477	1470	1480	1482	1457	1510
2.5**	11.05	3349	3350	3330	3344	3359	3400
3.2**	14.144	3793	3791	3799	3788	3801	3830
5.7**	25.194	7649	7630	7635	7650	7636	7640
7.2**	31.824	9650	9670	9660	9648	9654	9710

* Masas correspondientes al CRM de 0.573 ± 0.039 µg/g.

**Masas correspondientes al CRM de 4.42 ± 0.2 µg/g.

Figura 11. Curva de calibración usada en el análisis de muestras de cabello de concentración inferior a 5 µg/g de mercurio.



Fuente: Luz Helena Sánchez Rodríguez, autora del presente proyecto

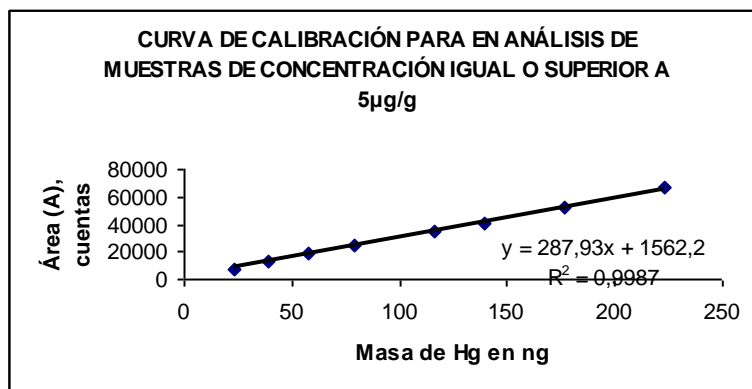
Para el análisis de muestras de cabello de concentración igual o superior a 5 µg/g de mercurio se elaboró una curva de calibración pesando entre 1 y 9 mg de un CRM de $23.2 \pm 0,8$ µg/g. En la **Tabla 20** se muestran los resultados de la elaboración de 5 curvas preparadas en días diferentes, para lo cual se pesó la misma cantidad de CRM. La **Figura 12** relaciona la masa de mercurio versus el área registrada por el equipo.

Tabla 21. Datos usados en la elaboración de la curva de calibración para la cuantificación de muestras de alta concentración de mercurio.

Masa de CRM(mg)	Masa de Hg en ng	Área, unidades					
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Promedio*
1.0	23.2	7370	7381	7377	7373	7381	7376
1.7	39.44	13084	13389	13079	13080	12792	13085
2.5	58	19148	19147	19138	19130	19140	19141
3.4	78.88	25240	25210	25193	25200	25157	25200
5.0	116	34300	34340	34330	34322	34335	34325
6.0	139.2	41070	41088	41070	41084	41134	41089
7.6	176.32	51869	51879	51870	51866	51857	51868
96	222.72	66240	66252	66230	66233	66235	66238

* Datos relacionados en la **Figura 12.**

Figura 12. Curva de calibración para concentraciones superior a 5 µg/g de Hg.



Fuente: Luz Helena Sánchez Rodríguez, autora del presente proyecto

Las curvas de calibración presentan un coeficiente de correlación cercano a 1 lo que indica que la cantidad de mercurio presente en la muestra es directamente proporcional a la señal registrada por el equipo (área) en el rango de concentración en el cual se elaboró la curva.

4.6.4 Rango dinámico lineal

En la elaboración de las curvas de calibración se generaron las respectivas rectas de mínimos cuadrados en las cuales se relacionan mediante una función de línea recta los valores de masa de Hg con los valores de área reportados por el equipo. Se demostró la proporcionalidad existente entre la masa de mercurio analizada y el área registrada, mediante una prueba de t de *student*, para lo cual se utilizó la **Ecuación 3**.

Intervalo 1: Curva de calibración usada en la determinación de Hg en muestras de concentración inferior a 5 µg/g.

Hipótesis nula: No existe correlación entre X y Y.

t_{cal} : 103.71 Calculado con la **Ecuación 3** en donde $n = 9$ y $r = 0.999$

t_{tab} : 2.36 Con un 95% de confianza y 7 grados de libertad, ver **Anexo B**.

Como $t_{cal} > t_{tab}$ la hipótesis se rechaza y se concluye que existe una correlación significativa entre X y Y en el intervalo evaluado.

Intervalo 2: Curva de calibración usada en la determinación de Hg en muestras de concentración igual o superior a 5 µg/g.

Hipótesis nula: No existe correlación entre X y Y.

t_{cal} : 96.01 Calculado con la **Ecuación 3** en donde $n = 8$ y $r = 0.999$

t_{tab} : 2.45 Con un 95% de confianza y 6 grados de libertad, ver **Anexo B**.

Como $t_{cal} > t_{tab}$ la hipótesis se rechaza y se concluye que existe una correlación significativa entre X y Y en el intervalo evaluado.

La aplicación de la anterior prueba en los intervalos de validación trabajados indica que el coeficiente de correlación es significativo para el número de datos usados en la elaboración de las curvas de calibración, en tanto la metodología es lineal en rango de validación escogido.

4.6.5 Sensibilidad

La sensibilidad de la metodología se estimó con la pendiente de las curvas de calibración, elaboradas para cada uno de los rangos de concertación. Para muestras de concentración de mercurio inferior a 5 $\mu\text{g/g}$ se encontró una sensibilidad de 307,69 ng^{-1} . Para muestras de concentración de mercurio igual o superior a 5 $\mu\text{g/g}$, se encontró una sensibilidad de 287.93 ng^{-1} .

4.6.6 Precisión

La precisión de las determinaciones de Hg por la técnica ZAAS se evaluó mediante el cálculo del % CV de las determinaciones realizadas a tres CRM de Hg. Se determinó la precisión intra-ensayo al variar el peso de muestra analizada manteniendo constantes las demás condiciones de análisis, (día, equipo, analista, etc.) ver **Tabla 22, 23 y 24**. Los resultados muestran que la metodología es precisa bajo estas condiciones, es decir, la variabilidad en la cuantificación de Hg por la técnica ZAAS no está condicionado por la cantidad de muestra pesada, puesto que los coeficientes de variación calculados para los análisis de los tres CRM son inferiores al 5%. Vale la pena mencionar que el rango óptimo de pesada va desde 1 mg hasta 10 mg.

Tabla 22. Determinación de la precisión intra-ensayo utilizando el CRM IAEA 086 ($0.57 \pm 0.039 \mu\text{g/g}$).

Cantidad (mg)	n	Promedio \pm DS	% CV
5	7	0.547 ± 0.01	2
7,5	7	0.60 ± 0.01	2
10	7	0.58 ± 0.02	4

Tabla 23. Determinación de la precisión intra-ensayo utilizando el CRM NIES 13 ($4.42 \pm 0.20 \mu\text{g/g}$).

Cantidad (mg)	n	Promedio \pm DS	% CV
5	3	4.5 ± 0.1	3
7,5	3	4.53 ± 0.02	0.5
10	3	4.50 ± 0.06	1

Tabla 24. Determinación de la precisión intra-ensayo utilizando el CRM IAEA 085 ($23.2 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$).

Cantidad (mg)	n	Promedio \pm DS	% CV
5	3	22.8 ± 0.4	1.9
7.5	3	23.2 ± 0.6	2.9
10	3	22.7 ± 0.2	1.0

Posteriormente se determinó la precisión inter-ensayo, al variar el día en el cual se realizó la determinación. En esta ocasión se mantuvo constante el peso de muestra analizado y las demás condiciones de trabajo necesarias para desarrollar

la metodología (equipo, analista, balanza, etc.). Los resultados obtenidos en este ensayo muestran % CV inferiores al 10 %, esto indica que las determinaciones de Hg por la técnica ZAAS son precisas incluso al variar el día en el cual se realiza la medida ver **Tablas 25, 26, 27 y 28**.

Los resultados de los ensayos propuestos para evaluar la precisión muestran que la variabilidad en las cuantificaciones de Hg por la técnica ZAAS en muestras de cabello es baja y con una dispersión de los datos pequeña, lo que indica que los errores aleatorios presentes en el análisis de Hg se encuentran controlados.

Tabla 25. Determinación de la precisión inter-ensayo utilizando el CRM IAEA 086 ($0,57\pm 0,039$ mg/kg)

Cantidad (mg)	n	Promedio \pm DS	% CV
5	3	0.56 \pm 0.02	6.6
5	5	0.59 \pm 0.05	8.1
5	5	0.56 \pm 0.02	7.8
5	3	0.56 \pm 0.03	7.0
5	5	0.59 \pm 0.03	6.4

Tabla 26. Determinación de la precisión inter-ensayo utilizando el CRM IAEA 086 ($0,57\pm 0,039$ mg/kg)

Cantidad (mg)	n	Promedio \pm DS	% CV
7.5	7	0.60 \pm 0.01	1.0
7,5	5	0.56 \pm 0.02	4.1
7,5	6	0.57 \pm 0.02	2.9

Tabla 27. Determinación de la precisión inter-ensayo utilizando el CRM IAEA 085 (23.2±0,8 mg/kg)

Cantidad (mg)	n	Promedio ± DS	% CV
5	3	23.6±0.3	1.2
5	3	23.4±0.5	2.1
5	3	23.2±0.8	1.7

Tabla 28. Determinación de la precisión inter-ensayo utilizando el CRM IAEA 085 (23.2±0,8 mg/kg)

Cantidad (mg)	N	Promedio ± DS	% CV
7.5	3	23.5±0.6	2.6
7.5	3	23.1±0.8	3.4
7.5	3	23.2±0.6	2.6

Considerando la magnitud de la desviación estándar, se puede afirmar que el acoplamiento RA-915⁺/RP-91C genera datos precisos para la cuantificación de Hg en muestras de cabello, ya que no se presentaron variaciones considerables en este parámetro en todo el rango de concentraciones trabajado. Los CV estuvieron dentro del valor permitido para este rango de concentraciones, según la ecuación de Holwitz (Véase Anexo E)

4.6.7 Exactitud

La exactitud de la metodología se determinó mediante el cálculo del porcentaje de recuperación realizado a tres CRM de baja, media y alta concentración de mercurio ver **Tabla 29**. Los resultados muestran que los porcentajes de recuperación son muy cercanos al 100 %. La anterior observación pone de manifiesto que el acoplamiento RA-915⁺/RP-91C genera datos muy exactos para las cuantificaciones de Hg en muestras de cabello. La posibilidad de introducir errores sistemáticos en las mediciones realizadas por la técnica ZAAS es mínima, gracias a la poca manipulación que las muestras sufren antes de ser analizadas.

El comportamiento de las mediciones es similar en todo el rango de concentraciones trabajado, lo cual indica que no existen interferencias debidas a la matriz. Esto se explica en el hecho que cuando la muestra es sometida al proceso de pirólisis toda la materia orgánica es reducida a CO₂ y H₂O los cuales no interfieren en la detección de Hg. Es importante mencionar que este efecto se mantiene sólo hasta un peso de muestra de aproximadamente 10 mg, para el caso de muestras de cabello, si se introduce una masa de muestra superior los productos de pirólisis interfieren en la determinación, lo cual genera datos con una baja precisión y exactitud.

Tabla 29. Evaluación de la exactitud realizada mediante el cálculo del porcentaje de recuperación.

CRM de cabello	Cantidad (mg)	N	Concentración de Hg µg/g	Concentración nominal de Hg µg/g	% de recuperación
	5	7	0.547±0.01	0.573 ± 0.039	95.46
	7,5	7	0.599±0.01		104.54
	10	7	0.581±0.02		101.40
	5	3	0.557±0.02		97.21
	5	5	0.588±0.048		102.62
	5	5	0.563±0.023		98.25
	5	3	0.563±0.039		98.25
	5	5	0.588±0.037		102.62
	7.5	7	0.599±0.01		104.54
	7,5	5	0.563±0.02		98.25
7,5	6	0.570±0.02	99.48		
Promedio	-----				100 ± 3.07
	5	3	4.49±0.14	4.42±0.2	101.58
	7,5	3	4.53±0.02		102.49
	10	3	4.50±0.06		101.81
Promedio					102.0 ± 0.47
	5	3	22.8±0.44	23.2±0.8	98.41
	7.5	3	23.2±0.60		100.09
	10	3	22.70±0.22		97.63
	5	3	23.6±0.3		101.72
	5	3	23.4±0.5		100.86
	5	3	23.2±0.8		100
	7.5	3	23.5±0.6		101.29
	7.5	3	23.1±0.8		99.57
	7.5	3	23.2±0.6		100
Promedio					100 ± 1.3

4.7 CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE

4.7.1 Cálculo de la incertidumbre para el análisis de cabellos de concentración inferior a 5µg/g de mercurio por la técnica de ZAAS

4.7.1.1 Pesada de las muestras

Se determinó la incertidumbre aportada al pesar las muestras. Se consideraron dos fuentes de incertidumbre, la incertidumbre dada por la división de la escala de la balanza y la incertidumbre en la calibración de la balanza.

4.7.1.2 Incertidumbre estándar en la división de la escala de la balanza

La balanza usada muestra datos con 5 decimales, para la pesada, por tanto la incertidumbre estándar será: División= 0,00001g $U1 = 0,00001/\sqrt{3} = 0,0000058$

4.7.1.3 Incertidumbre estándar en la calibración de la balanza

El certificado de calibración de la balanza emitido por MetroLabor presenta el siguiente valor de incertidumbre.

$U = 1,0016 \times 10^{-4} + 1,309 \times 10^{-6} w$ Donde w es el peso de muestra. Para la metodología se pesó alrededor de 0.005 gramos de muestra, por tanto la incertidumbre será:

$$U2 = (1,0016 \times 10^{-4} + 1,309 \times 10^{-6} * 0,005) / \sqrt{3} = 0,0000578$$

4.7.1.3 Incertidumbre combinada en la pesada de las muestras

Se obtiene combinando de forma cuadrática la incertidumbre estándar de la calibración y la incertidumbre estándar de la división de escala de la balanza.

$$U_{c1} = \sqrt{(U1)^2 + (U2)^2} = \sqrt{(0,0000058)^2 + (0,0000580)^2} = 0,0000580$$

4.7.1.4 Incertidumbre estándar relativa para la pesada de las muestras

La incertidumbre estándar relativa para la pesada de las muestras esta dada por el cociente entre la incertidumbre combinada U_{c1} y el peso de muestra.

$$U_{ER1} = U_{c1}/0.005 = 0.000058/0.005 = 0,0116$$

4.7.1.5 Incertidumbre debida a la precisión en la medida de las muestras

La incertidumbre generada en la lectura de las muestras se calculó como la desviación estándar ponderada para lo cual se usó dos CRM de cabello. Se pesó 5 mg del CRM de 0,573 $\mu\text{g/g}$ de Hg y se cuantificó 7 veces, dichas determinaciones se ubicaron cercanas al límite inferior de la curva de calibración. Se analizó 3 veces el CRM de 4,42 $\mu\text{g/g}$ de Hg, para lo cual se pesó 5 mg de muestra, los resultados para estas determinaciones se ubicaron cercanos al límite superior de la curva de calibración. Los anteriores datos se muestran en la **Tabla 30** y con ellos se calculó la desviación estándar ponderada de la lectura de las muestras en la curva de calibración.

Tabla 30. Desviación estándar ponderada para el análisis de las muestras de cabello por la técnica ZAAS.

	CRM 0,573 µg/g	CRM 4,42 µg/g
Promedio	0,5	5
SD	0,01	0,1
% CV	2	3
SD ponderada	0,0191	

4.7.1.6 Incertidumbre generada en la elaboración de la curva de calibración

En la elaboración de la curva de calibración se tuvo en cuenta la incertidumbre generada en la pesada de los CRM y la incertidumbre generada por el equipo al leer los CRM para elaborar la curva de calibración.

4.7.1.7 Incertidumbre estándar generada en la pesada de los CRM

El cálculo de esta fuente de incertidumbre se realizó como en el numeral 4.7.1. En éste caso para el cálculo de la incertidumbre estándar relativa se dividió entre 10 mg que es el valor máximo de la pesada de los CRM.

$$U_{ER3} = 0,00581$$

4.7.1.8 Incertidumbre estándar generada al leer los patrones en el equipo RA-915+/RP-91C

La estimación de esta fuente de incertidumbre se calculó como en el numeral 4.4.4.2. Además se utilizaron los datos de la elaboración de la curva de calibración, ver **Tabla 20**. El cálculo de esta fuente de incertidumbre se realizó en el límite superior de la curva de calibración puesto que la probabilidad de un aumento en la variabilidad de la medida en este sector de la curva es alta, bajo

estas circunstancias se analizó 3 veces un peso de 7,5 mg del CRM de 4.42. Se obtuvo una masa de Hg de 33,98.

❖ Se calculó la suma de cuadrados de los residuales

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (\alpha_j - \bar{\alpha})^2 = 213046$$

Donde S_{xx} es la suma de cuadrados de los residuales.

α_j las j masa de Hg usadas en la construcción de la curva de calibración.

$\bar{\alpha}$ * la masa media en la curva de calibración.

❖ Se calculó la desviación estándar residual para la curva de calibración

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (\gamma_j - (m\alpha + b))^2}{n-2}} = 160,85$$

Donde S es la desviación estándar residual.

γ_j La j área observada

$m\alpha + b$ El valor ajustado.

$n - 2$ Grados de libertad

❖ Se calculó la incertidumbre estándar para la respuesta del equipo al realizar la lectura de los CRM para elaborar la curva de calibración.

$$U\gamma = \frac{S}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{\alpha}_{MRC} - \alpha)^2}{S_{xx}}}$$

Donde:

$U\gamma$ es el valor de incertidumbre estándar.

S La desviación estándar residual

m La pendiente de la curva de calibración

p El número de medidas realizadas al CRM

n El número total de datos

α La masa en estudio

$\bar{\alpha}_{MRC}$ La masa media en la curva de calibración.

Reemplazando tenemos:

$$U_3 = \frac{160,85}{307,69} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{45} + \frac{33,98 - 10,74^2}{213046}} = 0,4080$$

La incertidumbre estándar relativa generada por la lectura de la curva de calibración esta dada por el cociente entre U_3 y la masa de Hg en estudio (33.98 ng).

$$U_{ER4} = U_3 / 33,98 = 0,4080 / 33,98 = 0,012$$

4.7.1.9 Incertidumbre estándar relativa generada en la elaboración de la curva de calibración

Se combinan de acuerdo con la ley de propagación de errores, la incertidumbre estándar relativa de la pesada de los patrones y la incertidumbre estándar relativa de la lectura de los patrones por la técnica ZAAS.

$$U_{ER5} = \sqrt{(U_{ER3})^2 + (U_{ER4})^2} = \sqrt{(0,0058)^2 + (0,012)^2} = 0,01333$$

4.7.1.10 Incertidumbre combinada del método

Se combinaron las fuentes de incertidumbre individuales para la medida de Hg por

técnica ZAAS.

$$U_{\text{metodo}} = \sqrt{(U_{ER1})^2 + (SD_{\text{ponderada}}(U_{ER5}))^2} = \sqrt{(0,0116)^2 + (0,0191)^2 + (0,01333)^2} = 0,0260$$

En donde:

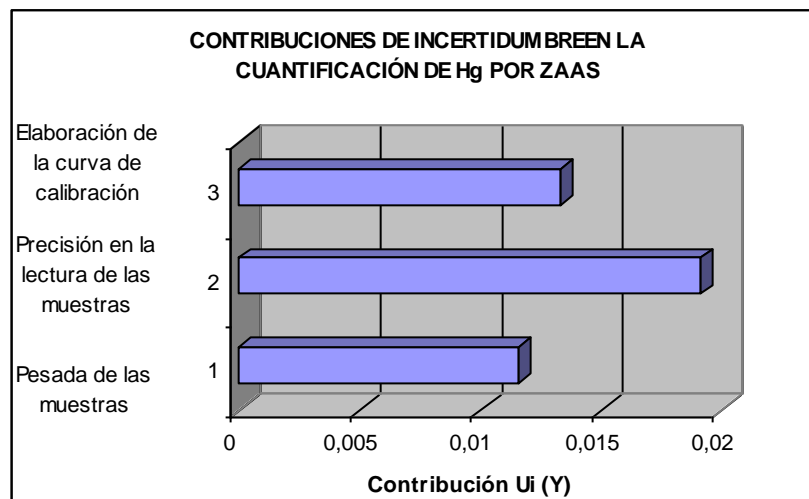
U_{ER1} es la incertidumbre estándar relativa generada en la pesa de las muestras

$SD_{\text{ponderada}}$ es la incertidumbre ponderada determinada con la precisión de las medidas.

U_{ER5} es la incertidumbre estándar relativa generada en la elaboración de la curva de calibración.

Se graficó en un diagrama de barras cada una de la contribuciones individuales de incertidumbre ver **Figura 13** en donde se puede observar que la mayor fuente de incertidumbre en las cuantificaciones de Hg en muestras de cabello por la técnica ZAAS esta dada por la precisión en el análisis de las muestras, seguida de la elaboración de la curva de calibración, finalmente se encuentra la pesada de las muestras.

Figura 13. Contribución de incertidumbre para cada fuente calculada en la cuantificación de Hg por la técnica ZAAS.



4.7.1.11 Incertidumbre expandida

Se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada del método por k (el factor de cobertura).

$$U_{\text{expmet}} = \pm U_{\text{cdelmeétalo}} \times K = \pm 0,0260 \times 2 = \pm 0.052 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

4.7.1.12 Cálculo de la incertidumbre expandida en la concentración del analito

Se obtiene multiplicando la incertidumbre expandida por la concentración determinada en la metodología.

$$U = C \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \times U_{\text{expmet}}$$

En donde C es el valor de la concentración de mercurio en una muestra analizada por la metodología descrita.

4.7.1.13 Expresión del resultado

Expresión del resultado: $C \pm U \mu\text{g/g}$.

4.7.2 Cálculo de la incertidumbre para el análisis de cabellos de concentración superior a $5\mu\text{g/g}$ de mercurio por la técnica de ZAAS

4.7.2.1 Pesada de las muestras

Se determinó la incertidumbre aportada al pesar las muestras como se realizó en el numeral 4.7.1 en donde se obtuvo la incertidumbre estándar relativa para la

pesada de las muestra para un peso de 5 mg, siendo este un peso habitual para la metodología

$$U_{ER1} = 0,0116$$

4.7.2.2 Incertidumbre debida a la precisión en la medida de las muestras

La incertidumbre generada en la lectura de las muestras se calculó como la desviación estándar ponderada para lo cual se usó una muestra de cabello. Se pesaron 5 mg y se cuantificó 4 veces, dichas determinaciones se ubicaron cercanas al límite inferior de la curva de calibración. Se analizó 3 veces el CRM de Hg (23,2 µg/g), para lo cual se pesaron 7,5 mg de muestra, los resultados para estas determinaciones se ubicaron cercanos al límite superior de la curva de calibración. Los anteriores datos se muestran en la **Tabla 31** y con ellos se calculó la desviación estándar ponderada de la lectura de las muestras en la curva de calibración.

Tabla 31. Desviación estándar ponderada para el análisis de las muestras de cabello por la técnica ZAAS.

	Muestra de cabello	CRM 23,2 µg/g
Promedio	5,00	22,8
SD	0,18	0,44
% CV	3,62	1,93
SD ponderada		0,0278

4.7.2.3 Incertidumbre generada en la elaboración de la curva de calibración

En la elaboración de la curva de calibración se tuvo en cuenta la incertidumbre generada en la pesada de los CRM y la incertidumbre generada por el equipo al leer los CRM para elaborar la curva de calibración como se realizó en el **numeral 4.7.1**

4.7.2.4 Incertidumbre estándar generada en la pesada de los CRM

El cálculo de esta fuente de incertidumbre se realizó como en el **numeral 3.7.1**. En éste caso para el cálculo de la incertidumbre estándar relativa se dividió entre 10 mg que es el valor máximo de la pesada de los CRM.

$$U_{ER2} = 0,00581$$

4.7.2.5 Incertidumbre estándar generada al leer los patrones en el equipo RA-915+/RP-91C

La estimación de esta fuente de incertidumbre se calculó como en el numeral **4.7.1.2**. Además se utilizaron los datos de la elaboración de la curva de calibración, ver **Tabla 21**. El cálculo de esta fuente de incertidumbre se realizó en el límite superior de la curva de calibración puesto que la probabilidad de un aumento en la variabilidad de la medida en este sector de la curva es alta, bajo estas circunstancias se analizó 3 veces un peso de 7,5 mg del CRM de 23,2 µg/g de Hg. Se obtuvo una masa de Hg de 147,15 ng de Hg.

- 4 Se calculó la suma de cuadrados de los residuales

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (\alpha_j - \bar{\alpha})^2 = 13164274$$

- 5 Se calculó la desviación estándar residual para la curva de calibración

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (y_j - (m\alpha + b))^2}{n-2}} = 778,17$$

- 6 Se calculó la incertidumbre estándar para la respuesta del equipo al realizar la lectura de los CRM para elaborar la curva de calibración.

$$U\gamma = \frac{S}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{\alpha}_{MRC})^2}{S_{xx}}}$$

Remplazando tenemos:

$$U1 = \frac{778,17}{287,93} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{40} + \frac{(147,15 - 106,72)^2}{13164274}} = 1,6456$$

La incertidumbre estándar relativa generada por la lectura de la curva de calibración esta dada por el cociente entre $U3$ y la masa de Hg en estudio (147,15 ng).

$$U_{ER3} = U3/147,15 = 1,6456/147,15 = 0,01118$$

4.7.2.6 Incertidumbre estándar relativa generada en la elaboración de la curva de calibración

Se combinan de acuerdo a la ley de propagación de errores, la incertidumbre estándar relativa de la pesada de los patrones y la incertidumbre estándar relativa de la lectura de los patrones por la técnica ZAAS.

$$U_{ER4} = \sqrt{(U_{ER2})^2 + (U_{ER3})^2} = \sqrt{(0,0058)^2 + (0,01118)^2} = 0,01260$$

4.7.2.7 Incertidumbre combinada del método

Se combinaron las fuentes de incertidumbre individuales para la medida de Hg por técnica ZAAS.

$$U_{cmetodo} = \sqrt{(U_{ER1})^2 + (SD_{ponderada})^2 + (U_{ER4})^2} = \sqrt{(0,0116)^2 + (0,02775)^2 + (0,01260)^2} = 0,0326$$

En donde:

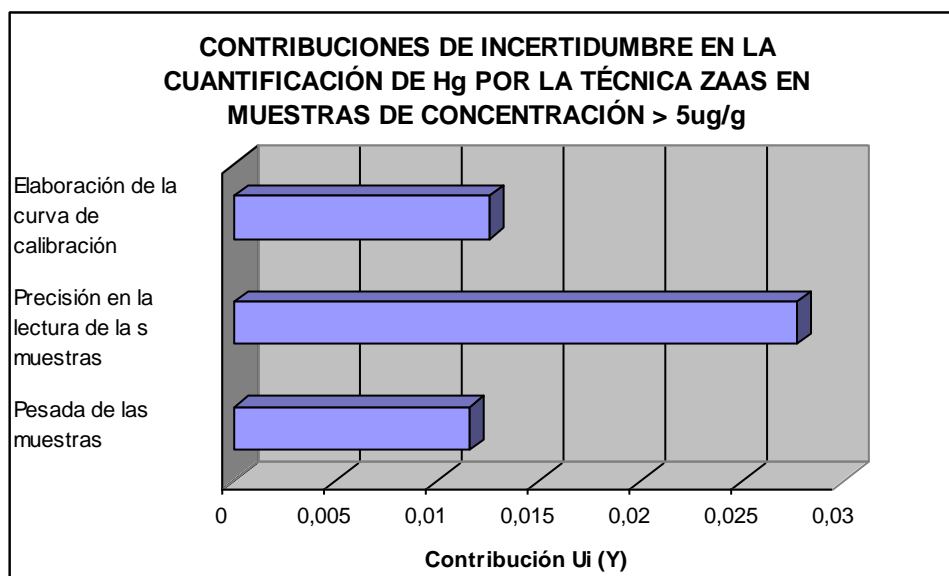
U_{ER1} es la incertidumbre estándar relativa generada en la pesa de las muestras

$SD_{ponderada}$ es la incertidumbre ponderada determinada con la precisión de las medidas.

U_{ER4} es la incertidumbre estándar relativa generada en la elaboración de la curva de calibración.

Se ilustró en un diagrama de barras cada una de las principales contribuciones de incertidumbre ver **Figura 14** en donde se puede observar que la mayor fuente de incertidumbre en las cuantificaciones de Hg en muestras de cabello de alta concentración por la técnica ZAAS esta dada por la precisión en el análisis de las muestras, seguida de la elaboración de la curva de calibración. Se observa que la pesada de las muestras aporta incertidumbre en cantidad comparable a la elaboración de la curva de calibración.

Figura 14. Contribución de incertidumbre para cada fuente calculada en la cuantificación de Hg por la técnica ZAAS.



4.7.2.8 Incertidumbre expandida

Se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada del método por k (el factor de cobertura).

$$U_{expmet} = \pm U_{cdelmeétalo} \times K = \pm 0,0326 \times 2 = \pm 0.0652 \frac{\mu g}{g}$$

4.7.2.9 Cálculo de la incertidumbre expandida en la concentración del analito

Se obtiene multiplicando la incertidumbre expandida por la concentración determinada en la metodología.

$$U = C \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \times U_{\text{expmet}}$$
 En donde C es el valor de la concentración de mercurio en una muestra analizada por la metodología descrita.

4.7.2.10 Expresión del resultado

Expresión del resultado: $C \pm U \mu\text{g/g}$.

4.8 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

En los resultados de las 50 muestras de cabello analizadas, la concentración más baja obtenida, para la misma muestra por las dos metodologías fue de 0,32 $\mu\text{g/g}$ de Hg. La concentración más alta cuantificada por la técnica ZAAS fue de 52,08 $\mu\text{g/g}$ de Hg, la misma muestra analizada por el método HG-AAS fue de 46,28. Se observó que la variabilidad de las medidas en concentraciones altas era mayor que en concentraciones bajas. Lo anterior, se puede deber a que por la técnica de HG-AAS, en el análisis de muestras de alta concentración se requiere de un factor de dilución que introduce error en la medida, que se refleja en un aumento en la variabilidad de los resultados. Por la técnica de ZAAS el análisis de muestras de alta concentración requiere disminuir la masa de muestra sometida al análisis, esto aumenta el error en la pesada y en consecuencia incrementa el error en el cálculo de la concentración encontrada.

4.8.1 Prueba de normalidad

Las pruebas de normalidad resultaron significativas para ambos métodos (ZAAS Shapiro-Wilk=0.720, $p=0,000$; HG-AAS Shapiro-Wilk=0.731; $p=0,000$) por lo cual

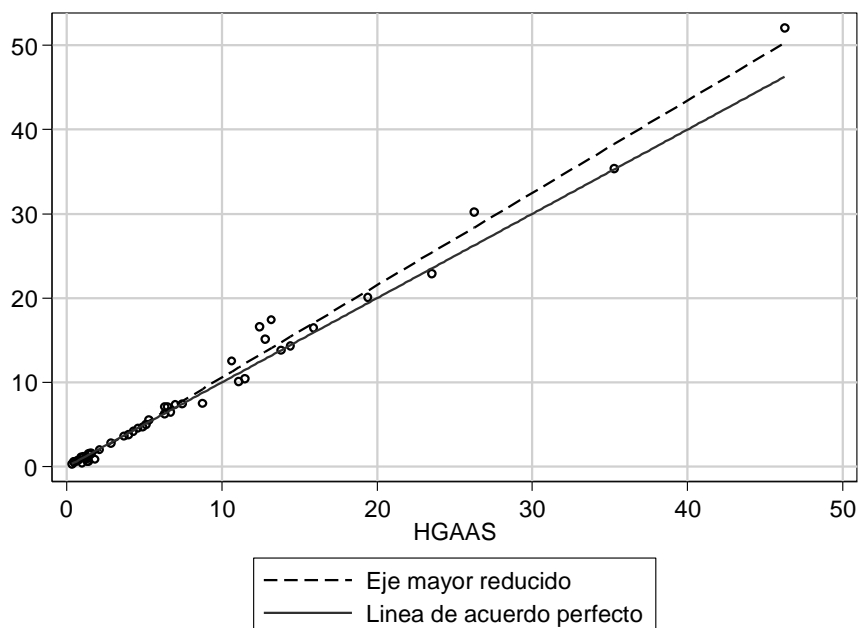
no sería adecuado utilizar pruebas paramétricas para comparación de los dos métodos. Sin embargo al explorar la transformación logarítmica de los datos se encontró un buen ajuste de datos a la distribución normal y será con los datos transformados con los que proseguiremos el análisis.

4.8.2 Comparación estadística de los métodos

Tanto la observación del intervalo de confianza del 95% para la diferencia, como la prueba t indican que no hay evidencia de diferencias significativas entre las mediciones obtenidas con cada uno de los métodos en estudio ($t = -1,38$, Valor $P=0,172$; $L_{Inf}=-0,052$, $L_{Sup}=0,009$).

Adicionalmente los datos nos indicaron la presencia de una fuerte y significativa correlación lineal entre las variables ($r=0,985$, $p=0,000$), ver **Figura 15**. De lo anterior tenemos que desde el punto de vista de la concentración no habría diferencias importantes entre los dos métodos.

Figura 15. Correlación lineal

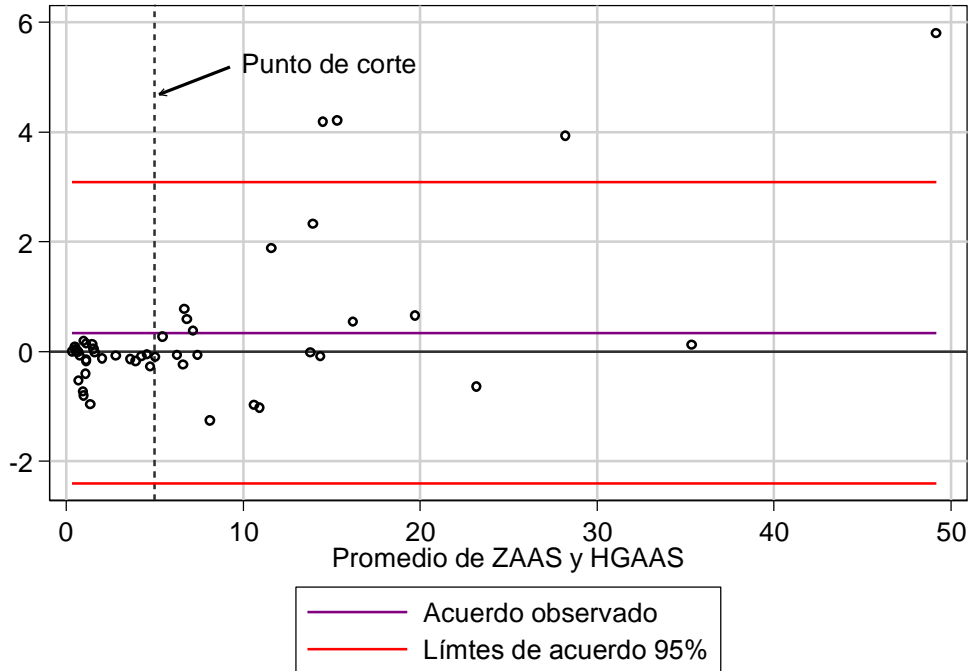


4.8.5 Prueba de Bland & Altman

Se realizó la prueba de Bland & Altman a los resultados obtenidos por cada una de las metodologías comparadas y se elaboró la **Figura 16**, en donde se muestra que existe una alta concordancia individual.

Para valores menores a 5 µg/g la concordancia individual de los resultados es mucho mayor, por encima de este valor se observa una disminución de la concordancia. Esto no significa que dichos valores no sean comparables, puesto que se encuentran dentro de los límites de acuerdo.

Figura 16. Diferencia contra promedio.



y=0 es la línea de acuerdo promedio perfecto

5. CONCLUSIONES

- ❖ La validación interna permitió cuantificar y evaluar experimentalmente las figuras de mérito que dan confianza a los métodos analíticos ZAAS y HG-AAS. El límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, sensibilidad, precisión, exactitud e incertidumbre, permitieron demostrar que las metodologías pueden ser usadas para la cuantificación de Hg en muestras de cabello.
- ❖ Los resultados obtenidos por las metodologías ZAAS y HG-AAS muestran una alta concordancia individual. Para concentraciones menores a 5 µg/g de Hg la concordancia entre los datos es mayor que para los datos de concentraciones superiores a este valor, sin embargo dichas mediciones son comparables, puesto que se encuentran dentro de los límites de acuerdo.
- ❖ La determinación de mercurio por el método de ZAAS requiere un tiempo de análisis corto, comparado con la determinación por HG-AAS, por lo tanto se puede considerar como una prueba diagnóstica rápida.
- ❖ Debido a lo complicado del manejo de residuos químicos, y en especial los que contienen mercurio, la determinación por el método ZAAS en cabello, se constituye en la mejor alternativa ambiental porque no utiliza reactivos químicos durante el análisis, ni genera residuos.
- ❖ Teniendo en cuenta que la cantidad de muestra que requiere el método ZAAS es pequeña, facilita la toma de muestra principalmente en personas que tengan poco cabello.

- ❖ Debido a que la técnica ZAAS no requiere una digestión química de la muestra, hay menos riesgo de contaminación de la misma o pérdida del mercurio.
- ❖ Los costos por prueba por el método HG-AAS son aproximadamente 3.5 veces mas altos que por el método ZAAS. (Véase Anexo F)
- ❖ Del cálculo de la incertidumbre se puede concluir que la mayor fuente de incertidumbre en la cuantificación de Hg en cabello por la técnica de HG-AAS está asociada a la construcción y lectura de la curva de calibración. Para la técnica de ZAAS la mayor fuente de incertidumbre esta asociada a la precisión en la lectura de las muestras.

6. RECOMENDACIONES

Para estudios epidemiológicos que requieren gran cantidad de determinaciones, la técnica de ZAAS se constituye en una alternativa que aporta resultados confiables, a bajo costo, en corto tiempo y con mínimo impacto ambiental, ya que obvia el tratamiento de la muestra, que es una de las principales dificultades que presentan los métodos analíticos para la determinación de mercurio en las diferentes matrices.

Para el análisis de cabello por la técnica de HG-AAS en donde se requiera pesar una masa de muestra superior a 40 mg, es aconsejable adicionar unas gotas de un agente antiespumante, para evitar que la espuma formada en la cámara de reacción ascienda por la manguera de transporte del vapor de mercurio, hacia la celda de lectura y se generen mediciones imprecisas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud, **El Mercurio en el Sector de la Salud**. 2005.
Ref Type: Catalog
2. WHO. Environmental Health Criteria 118. Inorganic Mercury. 1991.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
3. Olivero, J., Johnson, B. & Arguello, E. Human exposure to mercury in San Jorge river basin, Colombia (South America). *Sci. Total Environ.* **289**, 41-47 (2002).
4. Olivero, J., Mendoza, C. & Mestre, J. [Hair mercury levels in different occupational groups in a gold mining zone in the north of Colombia]. *Rev. Saude Pública* **29**, 376-379 (1995).
5. Carrasquero, A. Comparación de métodos para el análisis de mercurio en suelos procedentes del Callao, Estado Bolívar, Venezuela. *Interciencia* **27**, 191-194 (2002).
6. Nuttall, K. L. Interpreting hair mercury levels in individual patients. *Ann. Clin. Lab Sci.* **36**, 248-261 (2006).
7. Valko, M., Morris, H. & Cronin, M. T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* **12**, 1161-1208 (2005).
8. Fitzgerald, W. F. *et al.* Modern and historic atmospheric mercury fluxes in northern Alaska: Global sources and Arctic depletion. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 557-568 (2005).
9. Myers, G. J. *et al.* Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *Lancet* **361**, 1686-1692 (2003).
10. Boogaard, P. J., Houtsma, A. T., Journee, H. L. & Van Sittert, N. J. Effects of exposure to elemental mercury on the nervous system and the kidneys of workers producing natural gas. *Arch. Environ. Health* **51**, 108-115 (1996).
11. McGoldrick, T. A., Lock, E. A., Rodilla, V. & Hawksworth, G. M. Renal cysteine conjugate C-S lyase mediated toxicity of halogenated alkenes in primary cultures of human and rat proximal tubular cells. *Arch. Toxicol.* **77**, 365-370 (2003).

12. Zalups, R. K. Basolateral uptake of mercuric conjugates of N-acetylcysteine and cysteine in the kidney involves the organic anion transport system. *J. Toxicol. Environ. Health A* **55**, 13-29 (1998).
13. Piotrowski, J. K., Trojanowska, B. & Sapota, A. Binding of cadmium and mercury by metallothionein in the kidneys and liver of rats following repeated administration. *Arch. Toxicol.* **32**, 351-360 (1974).
14. Zalups, R. K., Barfuss, D. W. & Kostyniak, P. J. Altered intrarenal accumulation of mercury in uninephrectomized rats treated with methylmercury chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **115**, 174-182 (1992).
15. Cherian, M. G. & Clarkson, T. W. Biochemical changes in rat kidney on exposure to elemental mercury vapor: effect on biosynthesis of metallothionein. *Chem. Biol. Interact.* **12**, 109-120 (1976).
16. Grandjean, P., Cardoso, B. & Guimaraes, G. Mercury poisoning. *Lancet* **342**, 991 (1993).
17. Grandjean, P. Mercury risks: controversy or just uncertainty? *Public Health Rep.* **114**, 512-515 (1999).
18. Apostoli, P. *et al.* [Evaluation of the dose of mercury in exposed and control subjects]. *Med. Lav.* **93**, 159-175 (2002).
19. Grandjean, P. & Jorgensen, P. J. Measuring mercury concentration. *Epidemiology* **16**, 133 (2005).
20. Smith, J. C. & Farris, F. F. Methyl mercury pharmacokinetics in man: a reevaluation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **137**, 245-252 (1996).
21. Legrand, M., Passos, C. J., Mergler, D. & Chan, H. M. Biomonitoring of mercury exposure with single human hair strand. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 4594-4598 (2005).
22. Grandjean, P., White, R. F., Weihe, P. & Jorgensen, P. J. Neurotoxic risk caused by stable and variable exposure to methylmercury from seafood. *Ambul. Pediatr.* **3**, 18-23 (2003).
23. Sandoval, Y. & Cote M. Evaluación de las alteraciones neurológicas producidas por la exposición al mercurio en mineros de oro de Segovia Antioquia. 2005. Universidad Nacional de Colombia.
Ref Type: Thesis/Dissertation
24. Tarloff J & Lash L *Toxicology of the Kidney*. Boca Raton (2005).

25. Olivero, J., Solano, B. & Acosta, I. Total mercury in muscle of fish from two marshes in goldfields, Colombia. *Bull. Environ. Contam Toxicol.* **61**, 182-187 (1998).
26. Olivero, J. *et al.* Mercury levels in muscle of some fish species from the Dique Channel, Colombia. *Bull. Environ. Contam Toxicol.* **58**, 865-870 (1997).
27. Anneroth, G. *et al.* Comprehensive medical examination of a group of patients with alleged adverse effects from dental amalgams. *Acta Odontol. Scand.* **50**, 101-111 (1992).
28. Español, S. Toxicología del mercurio. Actuaciones preventivas en sanidad laboral y ambiental. Programa para las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. 2001.
Ref. Type: Magazine Article
29. Idrovo, A. J., Romero, W. M., Silva, E., Villamil de, G. G. & Ortiz, J. E. [Mercury determination in prehispanic Colombian biological samples: first experiences and investigation perspectives]. *Biomedica.* **22**, 67-70 (2002).
30. CETME. Poconé Project Annual Report. 210. 1989. Centro de Tecnología Mineral - Rio de Janeiro, Brasil.
Ref Type: Report
31. Tubbs, R. R. *et al.* Membranous glomerulonephritis associated with industrial mercury exposure. Study of pathogenetic mechanisms. *Am. J. Clin. Pathol.* **77**, 409-413 (1982).
32. DuBrow, R. & Gute, D. M. Cause-specific mortality among Rhode Island jewelry workers. *Am. J. Ind. Med.* **12**, 579-593 (1987).
33. Gutiérrez, M. Efectos tóxicos del mercurio. *Revista de la Facultad de Medicina UNAL* **45**, 139-143 (1997).
34. Ramirez, A. Biomarkers used to monitor heavy metal exposure in metallurgy. *An. Fac. Med.* **67**, 49-58 (2006).
35. Muramatsu, Y. & Parr, R. M. Concentrations of some trace elements in hair, liver and kidney from autopsy subjects--relationship between hair and internal organs. *Sci. Total Environ.* **76**, 29-40 (1988).
36. Hac, E., Krzyzanowski, M. & Krechniak, J. Total mercury in human renal cortex, liver, cerebellum and hair. *Sci. Total Environ.* **248**, 37-43 (2000).

37. Suzuki, T. *et al.* The hair-organ relationship in mercury concentration in contemporary Japanese. *Arch. Environ. Health* **48**, 221-229 (1993).
38. WHO. Environmental Burden of Disease Series, No. 16. Mercury Assessing the environmental burden of disease at national and local levels. Public Health and the Environment. 2008.
Ref Type: Catalog
39. Batzevich, V. A. Hair trace element analysis in human ecology studies. *Sci. Total Environ.* **164**, 89-98 (1995).
40. Swartout, J. & Rice, G. Uncertainty analysis of the estimated ingestion rates used to derive the methylmercury reference dose. *Drug Chem. Toxicol.* **23**, 293-306 (2000).
41. Grandjean, P. *et al.* Attenuated growth of breast-fed children exposed to increased concentrations of methylmercury and polychlorinated biphenyls. *FASEB J.* **17**, 699-701 (2003).
42. Haxton, J. *et al.* Duplicate diet study on fishing communities in the United Kingdom: mercury exposure in a "critical group". *Environ. Res.* **18**, 351-368 (1979).
43. Akagi, H., Grandjean, P., Takizawa, Y. & Weihe, P. Methylmercury dose estimation from umbilical cord concentrations in patients with Minamata disease. *Environ. Res.* **77**, 98-103 (1998).
44. Yamaguchi, S., Matsumoto, H., Kaku, S., Tateishi, M. & Shiramizu, M. Factors affecting the amount of mercury in human scalp hair. *Am. J. Public Health* **65**, 484-488 (1975).
45. Yamamoto, R. & Suzuki, T. Effects of artificial hair-waving on hair mercury values. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **42**, 1-9 (1978).
46. Yasutake, A., Matsumoto, M., Yamaguchi, M. & Hachiya, N. Current hair mercury levels in Japanese: survey in five districts. *Tohoku J. Exp. Med.* **199**, 161-169 (2003).
47. Ohba, T. *et al.* Permanent waving does not change mercury concentration in the proximal segment of hair close to scalp. *Tohoku J. Exp. Med.* **214**, 69-78 (2008).
48. Podlesky, E. Determinación de trazas de metales en muestras biológicas y ambientales. 1992. Bogotá D.C., Instituto Nacional de Salud.
Ref. Type: Catalog

49. Olivero, V. & Restrepo, J. El lado gris de la minería del oro: la contaminación con el mercurio en el norte de Colombia. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 1-3. 2002. Universidad de Cartagena. Ref. Type: Magazine Article
50. Huang R, Z. Z. R. Y. H. Y. W. R. L. F. An analytical study of bioaccumulation and the binding forms of mercury in rat body using thermolysis coupled with atomic absorption spectrometry. *Analytical Chim Act* **538**, 313-321 (2005).
51. Yan, X. P., Yin, X. B., Jiang, D. Q. & He, X. W. Speciation of mercury by hydrostatically modified electroosmotic flow capillary electrophoresis coupled with volatile species generation atomic fluorescence spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 1726-1732 (2003).
52. Dolan, S. P., Nortrup, D. A., Bolger, P. M. & Capar, S. G. Analysis of dietary supplements for arsenic, cadmium, mercury, and lead using inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1307-1312 (2003).
53. Oskarsson, A. *et al.* Total and inorganic mercury in breast milk in relation to fish consumption and amalgam in lactating women. *Arch. Environ. Health* **51**, 234-241 (1996).
54. Vesterberg, O. Automatic method for quantitation of mercury in blood, plasma and urine. *J. Biochem. Biophys. Methods* **23**, 227-235 (1991).
55. Corns, W. T., Stockwell, P. B. & Jameel, M. Rapid method for the determination of total mercury in urine samples using cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Analyst* **119**, 2481-2484 (1994).
56. Buneaux, F., Buisine, A., Bourdon, S. & Bourdon, R. Continuous flow quantification of total mercury in whole blood, plasma, erythrocytes, and urine by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. *J. Anal. Toxicol.* **16**, 99-101 (1992).
57. Kalamegham, R. & Ash, K. O. A simple ICP-MS procedure for the determination of total mercury in whole blood and urine. *J. Clin. Lab Anal.* **6**, 190-193 (1992).
58. Bruhn, C. G. *et al.* [Mercury in the hair of pregnant and lactating Chilean mothers]. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* **119**, 405-414 (1995).
59. Pereira, E. & Rodriguez, J. Modification of a Reaction Vessel for the Determination of Total Mercury in Hair by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry. *Biological Trace Element Re* **130**, 210-217 (2009).

60. Diez, S. & Bayona, J. M. Determination of methylmercury in human hair by ethylation followed by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-cold-vapour atomic fluorescence spectrometry. *J. Chromatogr. A* **963**, 345-351 (2002).
61. Miekeley, N., as Carneiro, M. T. & da Silveira, C. L. How reliable are human hair reference intervals for trace elements? *Sci. Total Environ.* **218**, 9-17 (1998).
62. Abugassa, I., Sarmani, S. B. & Samat, S. B. Multielement analysis of human hair and kidney stones by instrumental neutron activation analysis with the k0-standardization method. *Appl. Radiat. Isot.* **50**, 989-994 (1999).
63. Diez, S., Montuori, P., Querol, X. & Bayona, J. M. Total mercury in the hair of children by combustion atomic absorption spectrometry (Comb-AAS). *J. Anal. Toxicol.* **31**, 144-149 (2007).
64. Lumex. Attachment for mercury analyzer RA-915+. Lumex. 2005.
Ref Type: Catalog
65. Bin, C., Xiaoru, W. & Lee, F. Pyrolysis coupled with atomic absorption spectrometry for the determination of mercury in Chinese medicinal materials. *Analytical Chemical Act* **447**, 161-169 (2001).
66. Sholupov S & Pogarev S, R. V. M. N. S. A. Zeeman atomic absorption spectrometer RA-915+ for direct determination of mercury in air and complex matrix simples. *Fuel. Proces. Techn.* **85**, 473-485 (2004).
67. Muñoz, F., Delgado, J. & Stashenko, E. Determinación del mercurio en suelos de Bucaramanga utilizando un pirolizador acoplado a un detector de mercurio basado en espectroscopia de Absorción Atómica diferencial de Zeeman. 1-209. 2006. Universidad Industrial de Santander.
Ref Type: Thesis/Dissertation
68. United States Environment Protection Agency. Innovative technology verification report. 2004. Ohio, Lumex.
Ref. Type: Catalog
69. Henao, L. E. Estandarización de un método espectrofotométrico. 1999. Bogotá D.C., Instituto de Hidrología, Metrología y Estudios Ambientales.
Ref. Type: Report
70. Boque, R. El límite de detección de un método analítico. 2001. España, Universitat Rovira i Virgili Tarragona.
Ref Type: Report

71. Jaimes, M. Estandarización y validación de algunos parámetros físico-químicos en suelos para uso agrícola. 19-32. 2005. Bucaramanga - Colombia, Universidad Industrial de Santander.
Ref. Type: Thesis/Dissertation
72. Ortiz, J., Peñaranda, S., Palma, R., Pardo, D. & Puentes, W. 5to Curso-Taller validación de métodos analíticos. 9-39. 2007. Bogotá D.C, Programa de vigilancia de la calidad del agua potable, metales y no metales de interés de Salud Pública.
Ref Type: Report
73. Taverniers, I., De Loose, M. & Van Bockstaele, E. Trends in quality in the analytical laboratory. *Trends Anal. Chem.* **23**, 535-552 (2004).
74. Riu, J., Boque, R., Maroto, A. & Rius, X. Exactitud y trazabilidad. 2001. España, Universitat Rovira i Virgili Tarragona.
Ref Type: Report
75. Ellison, S. L. Quantifying Uncertainty in analytical chemistry. 2000. U.S.A, Eurochem/Citac.
Ref. Type: Report
76. Maroto, A. Estrategias para el cálculo de la incertidumbre. 2001. España, Universitat Rovira i Virgili Tarragona.
Ref. Type: Report
77. Miller, J. N. & Miller, J. C. *Estadística y quimiometría para química analítica*. (2002).
78. Villamizar, M. P. Estandarización de métodos analíticos usados para el análisis de agua en el laboratorio del centro de estudios e investigaciones ambientales - CEIAM. 2008. Universidad Industrial de Santander.
Ref. Type: Thesis/Dissertation
79. Wolfgang, A., Schmid, A. & Lazos, R. Guía para estimar la incertidumbre de la medición. 2000. México, Centro Nacional de Metrología - CENAM.
Ref. Type: Report
80. Rivas, H. & Fernández, P. Estimación de incertidumbre para medición de Zn por espectrofotometría de absorción atómica - flama. 2006. México, Simposio de Metrología.
Ref. Type: Report
81. Consultores, C. A. Incertidumbre de la medición: Teoría y Práctica. 2004. Bogotá D.C.
Ref Type: Catalog

82. Bland, J. M. & Altman, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* **1**, 307-310 (1986).
83. Bland, J. M. & Altman, D. G. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat. Methods Med. Res.* **8**, 135-160 (1999).
84. Orozco, L. C. *Medición en Salud: Un manual critico más allá de lo básico*. (2009).

8. ANEXOS

ANEXO A

Volumen ocupado por 1.000g de agua pesada en aire contra pesas de acero inoxidable.*

Temperatura, T, °C	En T	Volumen, mL Corregida a 20°C
10	1.0013	1.0016
11	1.0014	1.0016
12	1.0015	1.0017
13	1.0016	1.0018
14	1.0018	1.0019
15	1.0019	1.0020
16	1.0021	1.0022
17	1.0022	1.0023
18	1.0024	1.0025
19	1.0026	1.0026
20	1.0028	1.0028
21	1.0030	1.0030
22	1.0033	1.0032
23	1.0035	1.0034
24	1.0037	1.0036
25	1.0040	1.0037
26	1.0043	1.0041
27	1.0045	1.0043
28	1.0048	1.0046
29	1.0055	1.0048
30	1.0054	1.0052

* Se han aplicado correcciones por flotación (pesas de acero inoxidable)

ANEXO B

Valores de la distribución t de student para un 95 % de confianza.

GI	95%	gl	95%	gl	95%	gl	95%
1	12,71	11	2,20	21	2,08	50	2,01
2	4,30	12	2,18	22	2,07	□	1,96
3	3,18	13	2,16	23	2,07		
4	2,78	14	2,14	24	2,06		
5	2,57	15	2,13	25	2,06		
6	2,45	16	2,12	26	2,06		
7	2,36	17	2,11	27	2,05		
8	2,31	18	2,10	28	2,05		
9	2,26	19	2,09	29	2,05		
10	2,23	20	2,09	30	2,04		

gl: grados de libertad

ANEXO C

Procedimiento de manejo del equipo de absorción atómica con generador de hidruros

Se enciende el espectrofotómetro, el computador y el generador de hidruros, se inicia el programa de comando "Solar" y se carga el método para mercurio. Se enciende la lámpara de mercurio y la lámpara de deuterio, se ensambla la celda en el cabezote del mechero y se retira del camino óptico. Se realiza una configuración óptica y se alinea el haz de luz sobre mechero, se acomoda la celda sobre el mechero y se ajusta para obtener el mínimo valor de absorbancia. Se realiza una configuración óptica del equipo y se realiza un autocero de absorbancia. Posteriormente se enciende la bomba peristáltica y pasados 3 minutos se empieza la lectura de los patrones y las muestras.

Ajuste de las condiciones de trabajo del equipo generador de hidruros VP100

En el equipo generador de hidruros, la muestra previamente preparada es introducida en una cabina de reacción en donde se mezcla con ácido clorhídrico y borhidruro de sodio en NaOH al 0.5%; el cambio de pH del borhidruro de sodio en la mezcla de reacción, genera hidruros volátiles que reaccionan con el mercurio en estado oxidado, generando hidruros de mercurio los cuales son arrastrados a una celda de lectura de absorbancia por una corriente de un gas inerte, la absorbancia de la mezcla gaseosa es leída con un haz de luz de 253.7nm. Se identificaron como variables en la lectura de las muestras, la velocidad de la bomba peristáltica que controla los flujos de adición de los reactivos en la celda de reacción, el flujo

de gas de arrastre, la concentración el agente reductor, y la concentración de ácido.

Se probaron diferentes velocidades de bomba y flujo del gas de arrastre con el fin de encontrar las condiciones óptimas de trabajo; esto se realizó de acuerdo a lo indicado por el fabricante, el cual recomienda ajustar el equipo con el fin de aumentar la sensibilidad al encontrar el mayor valor de absorbancia para un patrón de 6µg/L de Hg.

El procedimiento desarrollado se describe a continuación:

- 1 Se preparó un patrón de 6 µg/L de mercurio el cual fue leído en el equipo en el modo de disolución única. Se midió la absorbancia del patrón variando la velocidad de la bomba en un intervalo comprendido entre 30 y 60 rpm. Se escogió la velocidad de la bomba en la cual la absorbancia fue mayor.
- 2 Se varió el flujo del gas de arrastre desde 70 hasta 130 mL/min y se leyó la absorbancia de un patrón de 6 µg/L de Hg. Se escogió el flujo de gas de arrastre en el cual el patrón de 6 µg/L de Hg presentó la mayor absorbancia.
- 3 Se midió la absorbancia de un patrón de de 6 µg/L de Hg usando el agente reductor a diferentes concentraciones que variaron desde 0.5% hasta 3%, en NaOH al 0.5%.
- 4 Se usó una concentración de ácido clorhídrico al 50% para todas las determinaciones de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

ANEXO D

Procedimiento de manejo del RA-915+/RP91C

1. Encendido general del analizador RA-915+

Encender el analizador RA-915+ oprimiendo el botón rojo o *power*. Esperar hasta que el bombillo verde correspondiente a *charged* se encienda permanentemente.



Foto 4. Encendido del RA-915+

Una vez el bombillo verde permanece encendido, se debe proceder a encender la lámpara de ignición. Para ello se oprime sostenidamente, durante 8 segundos aproximadamente, el botón negro denominado *Lamp ignition*. (Véase **Fotografía 4.**), de esta manera se garantizará que la lámpara de mercurio se encienda correctamente.

Después de los pasos anteriores se deben esperar 15 minutos para que haya estabilidad en el equipo y posteriormente poder realizar el test de verificación.



Foto 5. Fijación de posición III del puente óptico y celda Test, Septiembre de 2008. Laboratorio de Cromatografía, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander

Después de los 15 minutos, se procede a fijar en III la posición del puente óptico (ubicado ver parte posterior del analizador). Seguidamente la celda de test, ubicada en la parte lateral derecha del equipo, debe girarse cambiando de posición *on* a *off* por lo menos 4 veces. (Véase **Fotografía 5**)

2. Operación del software para la realización del test de verificación.

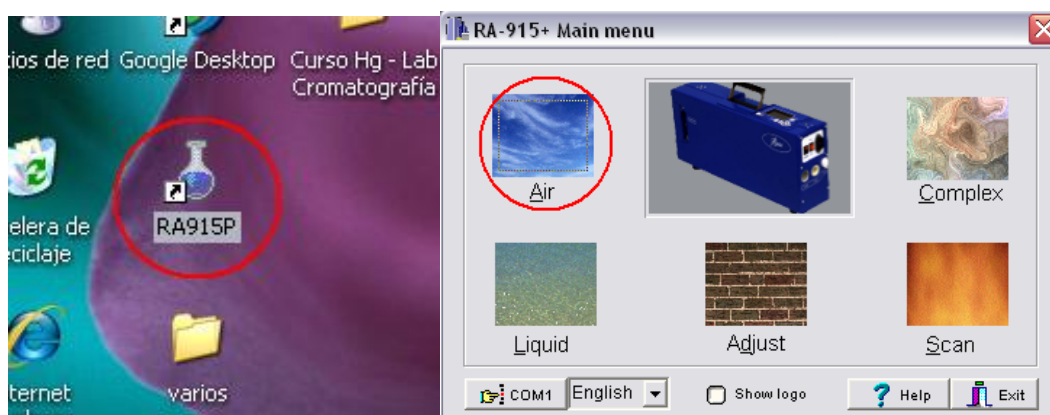


Foto 6. Visualización del software, Septiembre de 2008. Laboratorio de Cromatografía, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander

Inicialmente se da clic sobre el icono del software como se ve en la imagen de la izquierda (RA915P). En la ventana que se abre se da clic sobre “Air”, como se observa en la imagen de la derecha. (Véase **Fotografía 6**). Posteriormente se abre una ventana y se da clic sobre “Mode” y se selecciona la opción “Test”. Cuando se seleccione “Test” se escuchará un sonido diferente característico de que el equipo esta preparándose para el proceso y además aparecerá en pantalla una imagen del progreso de dicha preparación. (Véase **Fotografía 7**)

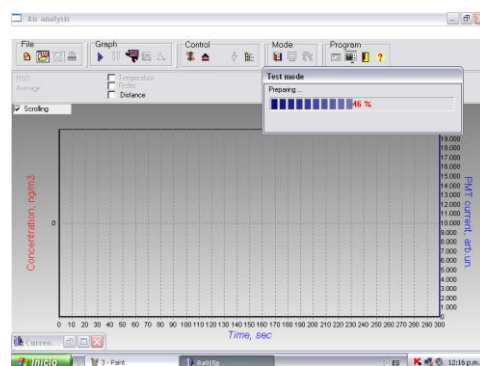


Foto 7. Visualización del Modo test en el software. Septiembre de 2008. Laboratorio de Cromatografía, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander.

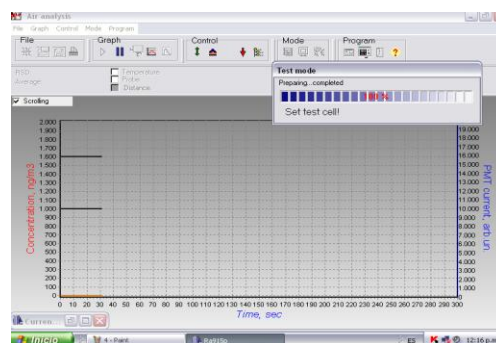


Foto 8. Visualización del mensaje “set test cell” Septiembre de 2008. Laboratorio de Cromatografía, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander

Al terminar el proceso de preparación aparecerá en pantalla el mensaje “set test cell!” que indica que la posición de la celda de *Test* (ubicada en el lado derecho del equipo) debe ubicarse en *On*. (Véase **Fotografía 8**) Cuando este paso se lleve a cabo se observará un aumento en la señal de color rojo como se observa a continuación:

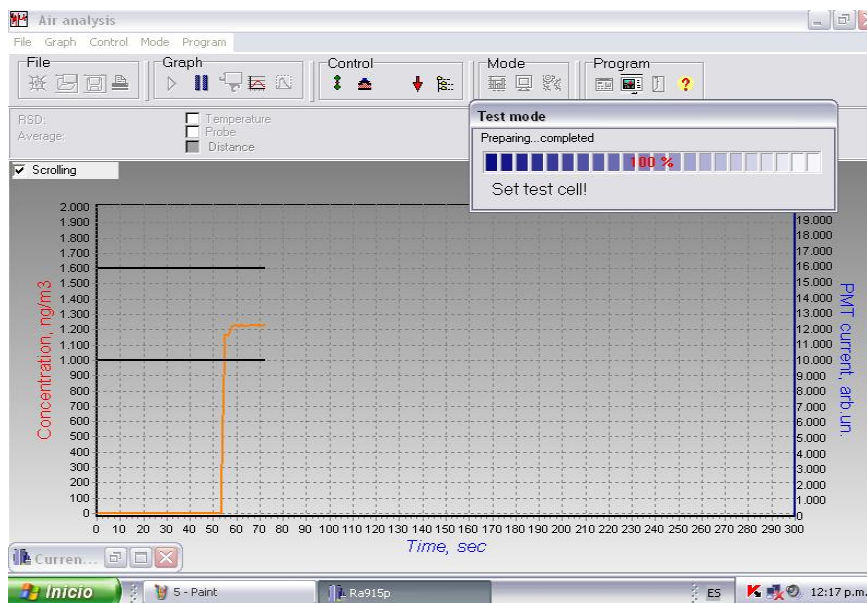


Foto 9. Visualización del aumento en la señal mostrada en color rojo. Septiembre de 2008. Laboratorio de Cromatografía, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander

Si la señal roja cae dentro de las dos líneas negras que se observan en pantalla el equipo estará en condiciones adecuadas de operarse. (véase **fotografía 9**). Este proceso debe durar aproximadamente 2 minutos de tal manera que la señal roja estabilice.

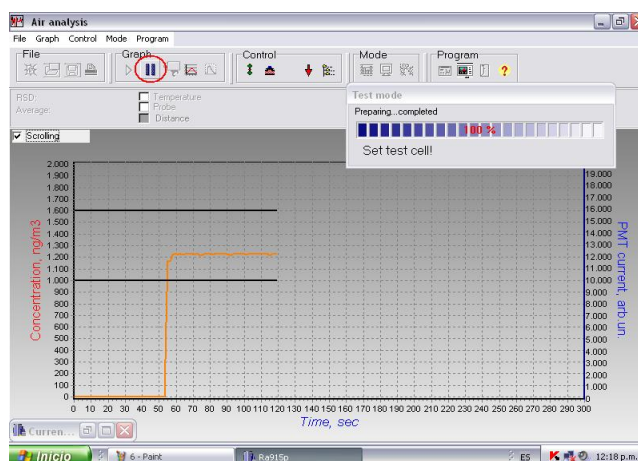


Foto 10. Imagen del software indicando el icono de pausa. Septiembre de 2008. Laboratorio de Cromatografía, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander

Después de que la señal roja se ha estabilizado se oprime el icono de pausa (encerrado en el círculo rojo en la **Fotografía 10**) y seguidamente se hace click en el icono de guardar, que se muestra en la **Fotografía 11**:

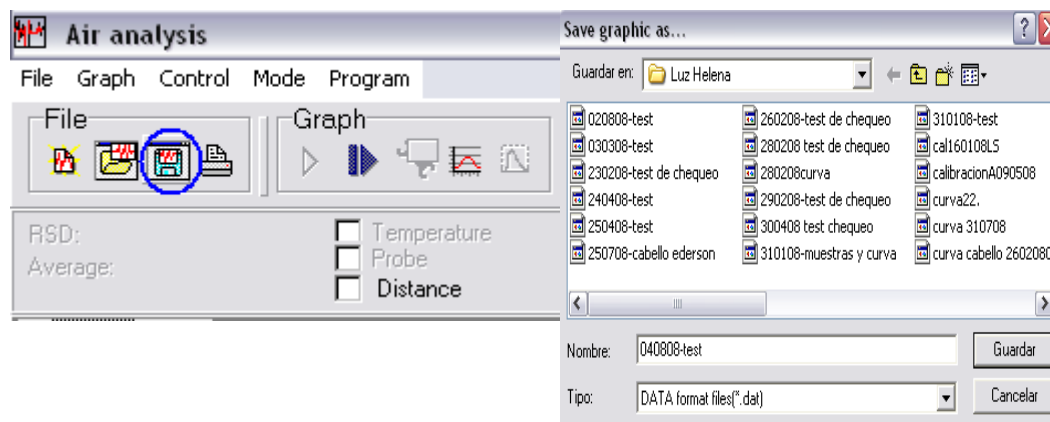


Foto 11. Selección del icono guarda. Septiembre de 2008. Laboratorio de Cromatografía, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander

En pantalla se observará una ventana, como la que aparece en la **fotografía 12**, en donde se aconseja nombrar el archivo de verificación con la fecha del día de uso.

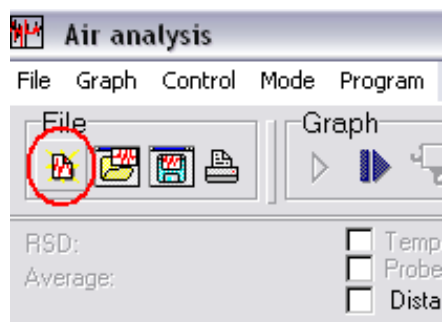


Foto 12. Ventana con el Icono de guardar. Septiembre de 2008. Laboratorio de Cromatografía, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander

Finalmente para terminar el *test* de verificación se oprime el icono “nuevo”, que aparece señalado en color rojo en la **fotografía 13**, después de esto aparecerá el mensaje: “*Remove test cell!*” indicando que la posición de la celda de *test* (ubicada en la parte lateral derecha del equipo) debe cambiarse a *off*. Después de cambiar la posición de la celda se debe hacer el clic sobre el mensaje en color rojo “*Remove test cell!*” y finalmente sobre el icono de salida (encerrado en color azul) que permitirá volver al menú principal.

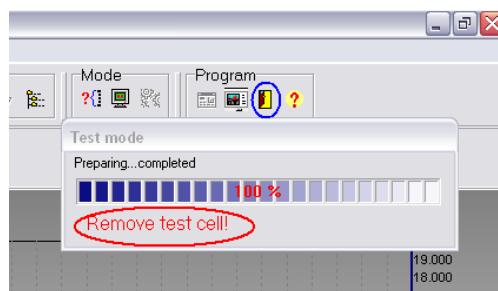


Foto 13. Imagen señalando la finalización del test de verificación. Septiembre de 2008. Laboratorio de Cromatografía, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander

Una vez realizado el encendido general y el test de verificación se procede a realizar las conexiones correspondientes al acoplamiento RA-915+/RP-91C.



Foto 14. Conexiones del RA-915+/RP-91C. Septiembre de 2008. Laboratorio de Cromatografía, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander

Inicialmente la unidad de pirólisis se inserta en la entrada ubicada en la parte lateral izquierda del equipo RA-915+ como lo muestra la foto 14. Una vez instalada la unidad de pirólisis se procede a conectar la fuente a las diferentes partes del acoplamiento y se ubica en la posición del puente óptico.



Foto 15. Conexión del pirolizador. Septiembre de 2008. Laboratorio de Cromatografía, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander

Posteriormente se enciende la unidad de bombeo. Con este paso el pirolizador también queda encendido.

Con la unidad de bombeo encendida se prosigue a ajustar el flujo de aire, hasta obtener un flujo de 1L/min.

A continuación se deben verificar las condiciones del pirolizador. Para ello se debe correr el *software* en modo *complex* haciendo clic sobre el icono.

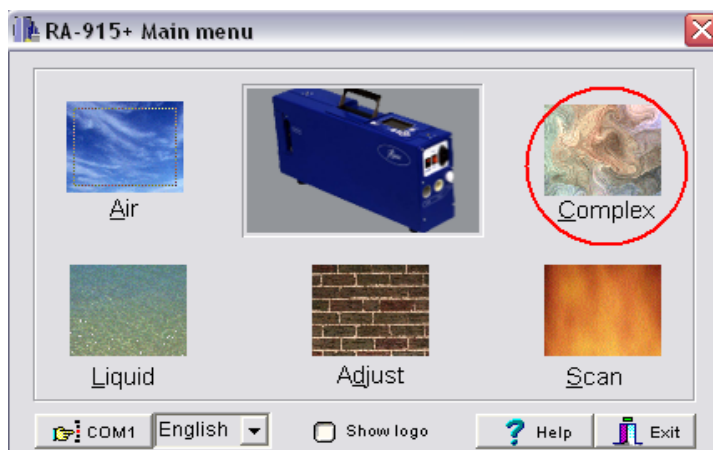


Foto 15. Visualización del Software en modo complex, Septiembre de 2008. Laboratorio de Cromatografía, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander

Seguidamente se oprime *run* y se observa la señal del PMT (*Photo-Multiplier Tube*) en la parte superior de la pantalla (señal azul) como se muestra a continuación:

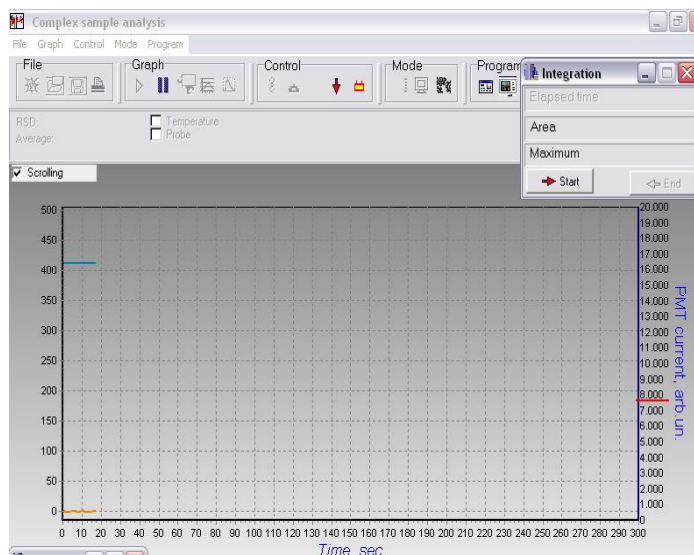


Foto 16. Visualización de la señal del PMT Septiembre de 2008. Laboratorio de Cromatografía, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander

Si la señal se encuentra por encima de 8000 (ver foto 16) el pirolizador se encuentra apto para la cuantificación, de lo contrario es necesario apagar la unidad de bombeo y la fuente de energía, esperar a que el pirolizador este suficientemente frío, si pasó mucho tiempo desde que se encendió, y finalmente desmontarlo del equipo para hacerle el mantenimiento respectivo pues lo más probable es que las ventanas de cuarzo se encuentren sucias.

Después de pasadas dos horas, se corre de nuevo el *software* en modo *complex*. Nuevamente se oprime *run* y se espera un minuto aproximadamente a que el icono *start* se habilite.

Una vez el icono *start* esté habilitado se comienza por pasar los portamuestras vacíos con el fin de eliminar posible contaminación por mercurio.

Esto se realiza de la siguiente manera:

1. Se oprime el icono *start*.
2. Se introduce la celda vacía lo más rápido posible.
3. Se espera hasta que en el contador de tiempo haya pasado un minuto (60 segundos).
4. Una vez en la pantalla se visualice 60 segundos se oprime el icono *end*.
5. Se retira la celda del pirolizador y se espera hasta que este a temperatura ambiente.

Este procedimiento se repite con cada una de las celdas que estén disponibles para trabajar. Cuando ya se haya realizado con todas y éstas se encuentren frías se puede empezar por cuantificar en la muestra.

La muestra que va a ser cuantificada debe estar completamente seca, de lo contrario el tiempo de trabajo del equipo que está establecido como de máximo 8 horas (2 de calentamiento y 6 de trabajo) se verá considerablemente reducido por el decaimiento de la señal del PMT (señal azul). También es importante homogenizar suficientemente la muestra y hacer cuarteo de la misma.

ANEXO E

Requisitos de precisión a diferentes concentraciones basados en la ecuación de Horwitz/Thompson

Table 2. Precision requirement at different concentrations based on the Horwitz/Thompson equation.

	Thompson	Horwitz equation ($2C^{-0.1505}$)							
Concentration ratio (C)	$< 10^{-7}$	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	1
Concentration unit	< 0.1 mg/kg	0.1 mg/kg	1 mg/kg	10 mg/kg	0.1 g/kg	1 g/kg	10 g/kg	100 g/kg	1000 g/kg
PRSD _R (%)	22	22	16	11	8	6	4	3	2
RSD _R ≤ 2 · PRSD _R (%)	≤ 44	≤ 44	≤ 32	≤ 22	≤ 16	≤ 12	≤ 8	≤ 6	≤ 4

PRSD_R = predicted value for relative standard deviation of reproducibility.

RSD_R = found value for the relative standard deviation of reproducibility in a collaborative study.

Table 4: Method criteria for MLs at increasing orders of magnitude.

ML unit	0.001 mg/kg	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	1 g/kg	10 g/kg
Concentration ratio of ML (C _{ML})	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Minimum applicable Range	From 0.0006 to 0.0014 (mg/kg)	From 0.006 to 0.014 (mg/kg)	From 0.03 to 0.17 (mg/kg)	From 0.52 to 1.48 (mg/kg)	From 6.6 to 13.3 (mg/kg)	From 76 to 124 (mg/kg)	From 0.83 to 1.2 (g/kg)	From 8.8 to 11 (g/kg)
LOD (≤ mg/kg)	0.0002	0.002	0.01	0.1	1	10	100	1000
LOQ (≤ mg/kg)	0.0004	0.004	0.02	0.2	2	20	200	2000
RSD _R (≤ %)	44	44	44	32	22	16	12	8
Recovery (%) *	40 - 120	60 - 115	80 - 110	80-110	80 - 110	90 - 107	95 - 105	97 - 103

* Other guidelines are available for expected recovery ranges in specific areas of analysis. In cases where recoveries have been shown to be a function of the matrix other specified requirements may be applied.

Fuente: Joint FAO/WHO Food Standards programme Codex committee on general principles. Twenty-fifth Session. Paris, France, 30 March – 3 April 2009