

Verificación del método de determinación de plomo en aguas naturales por espectrofotometría de absorción atómica acoplado a horno de grafito

 Luis Manuel Roque Albelo,  Yoelvis Bolaños Álvarez,  Gleisy Pérez Avilleira,

 Ernesto Alejandro Gálvez Acevedo

Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC). Carretera a Castillo de Jagua, 1,5 km Ciudad Nuclear. CP59350 Cienfuegos, Cuba.

lralbelo@ceac.cu ; yoelvis@ceac.cu

Resumen

El presente estudio ha estado dirigido a la verificación del método de determinación de plomo en muestras de aguas naturales (excepto agua de mar), a través de la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica acoplado a Horno de Grafito. Para tal fin, fueron evaluados los parámetros linealidad, límites de detección y de cuantificación, precisión y veracidad, según expone la norma NC TS 368:2010, Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos y la Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados, comprobándose que son adecuados para la determinación de este analito, lo que indica que el método es capaz de cuantificar concentraciones de plomo en aguas naturales (excepto agua de mar) que se encuentren inferiores a los límites máximos permisibles para este analito según establecen las normativas regulatorias.

Palabras clave: espectroscopia de absorción; plomo; grafito; verificación; recursos hídricos; normas.

Verification of the lead determination method in natural water by atomic absorption spectrophotometry coupled to graphite furnace

Abstract

The present study has been aimed at the verification of the method for the determination of lead in natural water samples (except seawater), through the technique of Atomic Absorption Spectrophotometry coupled to Graphite Furnace. For this purpose, the parameters linearity, limits of detection and quantification, precision and trueness were evaluated, according to NC TS 368:2010, Guide for the validation of chemical test methods for food and the Eurachem Guide: The suitability for use of analytical methods - A laboratory guide for the validation of methods and related topics, and found to be suitable for the determination of this analyte, indicating that the method is capable of quantifying lead concentrations in natural waters (except seawater) that are below the maximum permissible limits for this analyte as established by regulatory standards.

Key words: absorption spectroscopy; lead; graphite; verification; water resources; standards.

Introducción

El plomo es un metal pesado con la capacidad de bioacumularse y está caracterizado por ocasionar efectos tóxicos sobre diferentes órganos del cuerpo humano. Este se encuentra tanto en el aire, en las plantas, en el suelo y en todo tipo de aguas de origen natural [1].

La contaminación de las aguas por metales pesados se ha visto en aumento en los últimos 50 años [1], esto ha llevado a que diferentes agencias internacionales establezcan valores de concentración máxima permisible para elementos como el plomo, y que sirvan de herramienta en la gestión del control de calidad de las

aguas de consumo humano. Para ello, nuestro país ha dispuesto la Norma Cubana NC 827:2010 *Agua Potable - Requisitos Sanitarios*, donde establece un máximo de 0,05 mg de Pb por cada Litro de agua potable [2] y como dato auxiliar los 0,01 mg/L de Pb admisibles, reportados por el Codex Alimentarius CXC 56-2004 *Código de Prácticas Para la Prevención y Reducción de la Presencia de Plomo en los Alimentos* [3].

El Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC) cuenta con la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica acoplada a Horno de Grafito, la cual se emplea para dar cumplimiento al objetivo de este trabajo que es la verificación del método de determinación

de plomo en aguas naturales (excepto agua de mar), la evaluación de cada parámetro de verificación se hará con el apoyo de la Norma Cubana NC TS 368:2010 Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos y la Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos—Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados [4, 5].

Materiales y métodos

El presente estudio fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Ensayos Ambientales (LEA), perteneciente al Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC), el cual posee el equipamiento y condiciones óptimas necesarias para llevar a cabo dicho estudio.

Equipamiento utilizado. Fundamento del método

Para la determinación de plomo se utilizará un Espectrofotómetro de Absorción Atómica novAA 400P (Analytik Jena, Alemania) equipado con un software (ASpect LS, versión 1.5.4.0), sistema de horno de grafito y automuestreador.

Esta técnica comprende el estudio de absorción de energía radiante (generalmente en las regiones ultravioletas y visible) por parte de un elemento en estado atómico. En esta modalidad de horno de grafito, el elemento que se determina es reducido a su estado elemental, pasando previamente por etapas de secado, pirólisis y atomización dentro de un tubo de grafito y posteriormente es sometido a un haz de radiación con una longitud de onda que es específica de cada elemento, procedente esta de una lámpara de cátodo hueco. Se mide la atenuación de la intensidad de la energía radiante como resultado de la absorción, siendo la cantidad de radiación absorbida proporcional a la cantidad de átomos del elemento presente. Este procedimiento de análisis instrumental permite bajar los límites de detección al rango de partes por billón (ppb) con una instrumentación relativamente sencilla y sin los esfuerzos y pérdidas de tiempo que conllevan las técnicas de extracción previa [6].

Limpieza de la cristalería

Todo el material de laboratorio empleado para el análisis fue descontaminado previamente. Para ello, se sumergieron en una solución de HNO_3 al 10 % (v/v) a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente se enjuagaron tres veces con agua ultrapura obtenida de un sistema E-Pure™ modelo D4642-33 (Barnstead) con resistividad de $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ a 25°C .

Reactivos y soluciones

El blanco de calibración fue preparado utilizando HNO_3 grado suprapuro al 65 % (Merck) y agua ultrapura tipo 1 procedente del sistema purificador de agua E-Pure™. Los estándares de trabajo (10; 50 y $100 \mu\text{g/L}$ de Pb) empleados para la calibración se prepararon a partir de una solución patrón de Pb (1000 mg/L trazable a NIST en HNO_3 $0,5 \text{ mol/L}$) (Merck Certipur®). Se empleó

una disolución de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ al 1 % como modificador químico de matriz para el análisis con horno de grafito.

Condiciones de medición aplicadas al método

Durante la verificación, se emplearon las condiciones analíticas y programa de temperaturas propuestos por el Software (tablas 1 y 2).

Tabla 1. Condiciones analíticas del espectrofotómetro de absorción atómica

Lámpara	Lámpara de cátodo hueco de Pb
Tipo de tubo	Tubo de grafito con cubierta pirolítica y con plataforma
Longitud de onda	$283,3 \text{ nm}$
Ancho de la ranura	$0,8 \text{ nm}$
Corriente de lámpara	2 mA
Corrección de background	Lámpara de deuterio
Modo de medida	Área del pico

Tabla 2. Programa de temperaturas empleado durante la medición

Etapas	Temperatura final ($^\circ\text{C}$)	Tiempo de Rampa ($^\circ\text{C/s}$)	Tiempo de retención (s)
Inyección	-	-	-
Secado 1	80	6	20
Secado 2	90	3	20
Secado 3	110	5	10
Pirólisis	350	50	20
Pirólisis	800	300	10
AZ'	800	0	6
Atomización	1900	1400	4
Limpieza	2450	500	4

Para la curva de calibración, se empleó un rango de trabajo de 5 a $100 \mu\text{g/L}$ de Pb, realizando tres réplicas y utilizando 10 niveles de concentración conocidos (5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 100) $\mu\text{g/L}$ de Pb, preparados por el equipo a partir de los estándares de trabajo.

Antes de considerar adecuados los datos experimentales se comprobó su idoneidad para descartar cualquier valor anómalo. Para ello se implementó el Test de Grubbs donde se comparan los estadígrafos $G_{\text{experimental}}$ y $G_{\text{crítico}}$ siguiendo las siguientes hipótesis [7].

$$H_0: \text{No existen valores burdos, } G_{\text{exp}} < G_{\text{crítico}}$$

$$H_1: \text{Existen valores burdos, } G_{\text{exp}} \geq G_{\text{crítico}}$$

Linealidad

Para evaluar la linealidad de los datos se tuvieron en cuenta varios aspectos como el coeficiente de correlación lineal el cual se complementó con un análisis t de Student ($n-1$ grados de libertad y 95 % de confianza) para comprobar su significación estadística, teniendo que si el valor de $t_{\text{exp}} > t_{\text{crítica}}$, se rechaza H_0 indicando así la existencia de correlación entre la concentración y la absorbancia [8, 9].

$$H_0: \text{No existe correlación entre la concentración y la absorbancia.}$$

$$H_1: \text{Existe correlación entre la concentración y la absorbancia.}$$

Se realiza el test de Falta de Ajuste (*LOF* por sus siglas en inglés) y un análisis de los residuales para proporcionar mayor veracidad al análisis de linealidad. El test de *LOF* compara el estadígrafo $F_{\text{calculado}}$ con el valor $F_{\text{crítico}}$ para $c-2$ y $n-c$ grados de libertad con un nivel de confianza del 95 %, donde n es el número total de observaciones y c es el número de niveles de concentración utilizados en la curva de calibración [10].

Si $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{crítico}}$ entonces se acepta la H_0 concluyendo que se trata de un modelo lineal.

H_0 : El modelo es lineal H_1 : El modelo no es lineal

- Intervalos de confianza de la pendiente y el intercepto

Los intervalos de confianza para la pendiente y el intercepto serán $b \pm t \cdot S_b$ y $a \pm t \cdot S_a$, respectivamente, donde S_b y S_a son las desviaciones estándar para los estimados de la pendiente e intercepto y t es el valor *t*-Student para $n-2$ grados de libertad y nivel de confianza del 95 %.

- Significación estadística de la pendiente

H_0 : pendiente = 0 H_1 : pendiente \neq 0

Si $t_{\text{exp}} > t_{\text{crítica}}$ (para $n-1$ y 95 % de confianza) se rechaza la H_0 y se considera que la pendiente es significativamente diferente de cero.

- Significación estadística del intercepto

H_0 : intercepto = 0 H_1 : intercepto \neq 0

Si $t_{\text{exp}} > t_{\text{crítica}}$ (para $n-1$ y 95 % de confianza) se rechaza H_0 y como criterio se establece que el intercepto es significativamente diferente de cero.

Límites de Detección y Cuantificación

La determinación del límite de detección (*LD*) y el límite de cuantificación (*LC*) se realizó analizando 10 muestras de blanco que fueron preparados como se describe en el epígrafe "Reactivos y Soluciones".

$$LD = 3 * SD/m \qquad LC = 10 * SD/m$$

donde:

SD: desviación estándar

m: pendiente

Precisión

El análisis de repetibilidad del método se realizó mediante la lectura de 3 soluciones estándar de plomo a diferentes concentraciones (bajo, medio, alto), preparadas por el equipo. Se realizaron diez réplicas de cada punto en un mismo día empleando un solo analista. Se determinó la media de las concentraciones, la desviación estándar y el correspondiente coeficiente de variación de repetibilidad (RSD_r). Si el valor de RSD_r resulta inferior que los rangos permisibles para el coeficiente de variación teórico según la ecuación de Horwitz ($PRSD_R$), el método se considera repetible [11].

La precisión intermedia se analizó de manera similar a la repetibilidad, pero esta vez el analista preparó manualmente cinco réplicas de cada punto (bajo, medio, alto) y fueron medidas en 2 días diferentes para lograr la mayor variación en el método. Se calculó la desviación

estándar entre días (*S* entre días) y el coeficiente de variación entre días (RSD_R entre días), así como el valor de $PRSD_R$. Si el valor de RSD_R entre días resulta inferior a los rangos permisibles según Horwitz, se considera que el método es preciso [11].

Veracidad

Para analizar la veracidad del método se tomaron como referencia los valores de concentración obtenidos de la medición de 3 soluciones estándar interno de Pb con los que se determinó el porcentaje de recuperación (*R* %) en cada punto [5]. Los valores de *R* % se compararon con el 100 % utilizando una prueba *t*-Student para $n-1$ grados de libertad y 95 % de nivel de confianza. Si resulta $t_{\text{exp}} \leq t_{\text{crítica}}$, se acepta H_0 y se considera que no existen diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 %, lo que demuestra la adecuada veracidad del método [12, 13].

H_0 : $R = 100$ %

H_1 : $R \neq 100$ %

Resultados y discusión

En la figura 1 se muestra la curva de calibración correspondiente para el rango de trabajo establecido (5 – 100 $\mu\text{g/L}$). El coeficiente de correlación lineal para las tres curvas de calibración resultó mayor que 0,99, indicando que existe una buena correlación entre las variables analizadas según informa la prueba *t* empleada ($t_{\text{exp}} > t_{\text{crítica}}$) [14], los valores obtenidos se representan en la tabla 3.

El test de *LOF* arrojó que el valor $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, demostrando así que el modelo lineal se ajusta perfectamente a los datos experimentales.

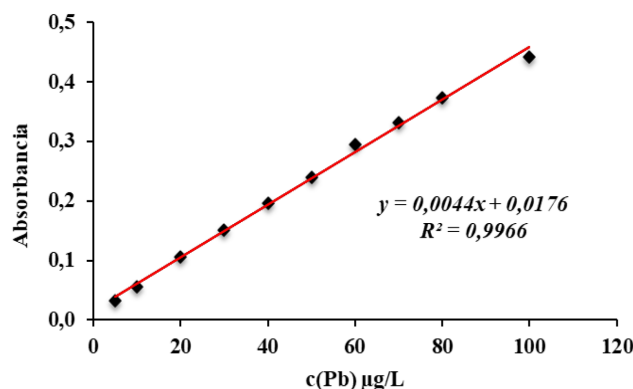


Figura 1. Curva de calibración para rango de trabajo establecido

La pendiente resultó significativamente diferente de cero para un 95 % de confianza y 29 grados de libertad al ser $t_{\text{exp}} > t_{\text{crítica}}$. Sin embargo, la significación estadística para el intercepto demostró que el mismo es igual a cero, incluyendo así este valor en su intervalo de confianza.

Para el *LD* se obtuvo un valor de 0,77 $\mu\text{g/L}$ y para el *LC* el valor calculado fue de 2,57 $\mu\text{g/L}$. Al encontrarse estos valores inferiores al primer punto de la curva de calibración, nos permite detectar y cuantificar correc-

tamente niveles de Pb inferiores a los valores máximos permisibles expuestos en las normas regulatorias.

Tabla 3. Valores obtenidos para comprobación de la linealidad

Parámetros	Valores obtenidos	Criterio
Coefficiente de correlación	0,9919	$R > 0,99$
Prueba LOF	$F_{exp} = 0,6478$ $F_{critico} = 2,4470$	$F_{exp} < F_{critico}$
Intervalo de confianza del intercepto	0,084	Incluye al cero
Intervalo de confianza de la pendiente	$0,0044 \pm 0,003$	No incluye al cero

Análisis de la Repetibilidad y Reproducibilidad del método

Los resultados del análisis de estos parámetros se muestran en la tabla 4. Todos los valores de coeficientes de variación obtenidos en la práctica para repetibilidad (RSD_r) como para precisión intermedia (RSD_R), se encuentran inferiores a los rangos permisibles para los coeficientes teóricos según Horwitz ($PRSD_R$). Por tal motivo se considera que la cuantificación de Pb es repetible y presenta una adecuada precisión intermedia bajo las condiciones de los ensayos realizados.

Tabla 4. Resultados del análisis de Repetibilidad y Precisión Intermedia

		Repetibilidad			
c(Pb) µg/L		$PRSD_R$	0,2* $PRSD_R$	0,3* $PRSD_R$	RSD_r
Nivel bajo	10	32,00	6,40	9,60	3,91
Nivel medio	50	25,12	5,02	7,53	0,72
Nivel alto	80	23,40	4,68	7,02	1,22
		Precisión Intermedia			
c(Pb) µg/L		$PRSD_R$	0,2* $PRSD_R$	RSD_R	
Nivel bajo	10	32,00	6,40	5,69	
Nivel medio	50	25,11	5,02	1,01	
Nivel alto	80	23,40	4,68	1,11	

Veracidad

El análisis estadístico de este parámetro demuestra que el valor de t_{exp} es inferior al valor de $t_{critica}$ para un nivel de confianza del 95 % y $n - 1$ grados de libertad, lo que sugiere que la recuperación no difiere significativamente del 100 %, según la respectiva prueba de hipótesis, indicando así la adecuada veracidad del método.

Por otro lado, la figura 2 muestra un gráfico de recobrado con las concentraciones de los tres estándares internos empleados para evaluar este parámetro, los mismos se muestran dentro del rango de por ciento de recobrado establecido para las concentraciones a las que se trabaja [11].

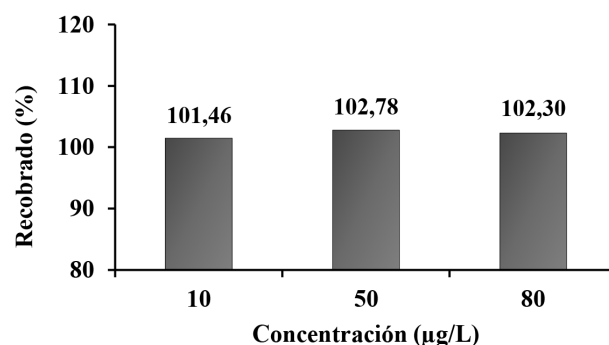


Figura 2. Gráfico de recobrado para estándares internos

Evaluación del plan de verificación del método

El método verificado presenta una adecuada linealidad, comprobada por el test de LOF y valores de R superiores a 0,99. Un LD y LC inferiores al primer punto de la curva de calibración, demuestran la sensibilidad del método para cuantificar los niveles de concentración del analito. Se considera repetible y con una adecuada precisión intermedia con valores de $RSD_{(r \text{ o } R)}$ inferiores a los rangos permisibles para $PRSD_R$. El $R\%$ no difiere significativamente del 100 %, indicando la veracidad del método. Se cumplen todos los parámetros del plan de verificación y queda establecido un método que permite monitorear el control de calidad de aguas naturales (excepto agua de mar) respecto a la contaminación por Pb, cumpliendo con los valores máximos permisibles normados.

Conclusiones

Al evaluar los parámetros de linealidad, LD, LC, precisión y veracidad, se puede afirmar que el presente método es capaz de cuantificar y discernir concentraciones de plomo en aguas naturales (excepto agua de mar), cumpliendo con los requisitos establecidos en la Norma Cubana NC 827:2010.

Referencias bibliográficas

- [1]. RUBIO C, GUTIÉRREZ AJ, MARTÍN IZQUIERDO RE, et. al. El plomo como contaminante alimentario. Rev. Toxicol. Asoc. Española Toxicol. 2004; 21(2-3): 72-80.
- [2]. Oficina Nacional de Normalización (ONN). Agua Potable - Requisitos Sanitarios. Norma Cubana (NC) 827:2010. 1ra Edición. La Habana, diciembre 2010.
- [3]. Organización Mundial de la Salud (OMS) /Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Código de Prácticas Para la Prevención y Reducción de la Presencia de Plomo en los Alimentos. CODEX ALIMENTARIUS. CAC/RCP 56-2004. 2004. Disponible en: file:///C:/Users/miriam/Downloads/CXP_056s.pdf
- [4]. Oficina Nacional de Normalización (ONN). Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos norma cubana (NC) TS 368: 2010. 1ra Edición. La Habana, mayo 2010.
- [5]. MORILLAS PP, et. al. Guía Eurachem: la adecuación al uso de los métodos analíticos - Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados Eurolab España, 2016. 1a ed.

- [6]. MAÑAY N, CLAVIJO G & DÍAZ L. Absorción atómica con horno de grafito. En: IBEROARSEN: Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos. pp. 79-92. CYTED, 2009.
- [7]. HARVEY D. Modern analytical chemistry. 1st ed. vol. 3. 1993. doi: 10.1016/c2013-0-01305-9.
- [8]. MILLER JN. & MILLER JC. Estadística y quimiometría para química analítica. 4ta Ed. Madrid: Pearson Educación. S.A., 2002.
- [9]. SU JQ. and WEI L J. A lack-of-fit test for the mean function in a generalized linear model. J. Am. Stat. Assoc. 1991; 86(414): 420-426. doi: 10.1080/01621459.1991.10475059.
- [10]. KUTNER MH. Applied linear statistical models. 5ta ed. New York: McGraw-Hill/Irwin, 2005. doi: 10.1080/00224065.1997.11979760.
- [11]. GUSTAVO GONZÁLEZ A. & ÁNGELES HERRADOR M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. TrAC Trends Anal. Chem. 2007; 26(3): 227-238. doi: 10.1016/j.trac.2007.01.009.
- [12]. RODRÍGUEZ A, SILVA P & REYES M. Determinación de sulfato por el método turbidimétrico en aguas y aguas residuales. Validación Del Método. Rev. Cuba. Química. 2010; vol. XXII(3): 39-44.
- [13]. LÓPEZ VEGA ME, RAMÍREZ GONZÁLEZ S & MÁS RAMOS A. Internal verification of a method for the determination of arsenic in waters through its. Rev. Cuba. Química. 2023; 35(3): 425-442.
- [14]. Instituto de Salud Pública de Chile. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos. Santiago, 2010.

Recibido: 18 de septiembre de 2024

Aceptado: 31 de octubre de 2024

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses en la realización, ni la comunicación del presente trabajo.

CRedit / Conceptualización: Yoelvis Bolaños Álvarez, Luis Manuel Roque Albelo. **Fuentes:** Yoelvis Bolaños Álvarez, Luis Manuel Roque Albelo, Gleisy Pérez Avilleira, Ernesto Alejandro Gálvez Acevedo. **Curación de datos:** Yoelvis Bolaños Álvarez, Luis Manuel Roque Albelo. **Software:** Yoelvis Bolaños Álvarez, Luis Manuel Roque Albelo. **Análisis formal:** Yoelvis Bolaños Álvarez, Luis Manuel Roque Albelo. **Supervisión:** Yoelvis Bolaños Álvarez. **Adquisición de fondos:** Yoelvis Bolaños Álvarez. **Validación:** Yoelvis Bolaños Álvarez, Luis Manuel Roque Albelo. **Investigación:** Yoelvis Bolaños Álvarez, Luis Manuel Roque Albelo, Gleisy Pérez Avilleira, Ernesto Alejandro Gálvez Acevedo. **Visualización:** Yoelvis Bolaños Álvarez, Luis Manuel Roque Albelo. **Metodología:** Yoelvis Bolaños Álvarez, Luis Manuel Roque Albelo. **Administración de proyecto:** Yoelvis Bolaños Álvarez. **Escritura – borrador original:** Yoelvis Bolaños Álvarez, Luis Manuel Roque Albelo, Gleisy Pérez Avilleira, Ernesto Alejandro Gálvez Acevedo. **Redacción – revisión y edición:** Yoelvis Bolaños Álvarez, Luis Manuel Roque Albelo, Gleisy Pérez Avilleira, Ernesto Alejandro Gálvez Acevedo.