

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL Y AMBIENTAL

**DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS Cd (II), Pb (II) y Hg (II)
MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ANÓDICA,
EN AGUAS RESIDUALES MINERAS (DISTRITO MINERO
PORTOVELO – ZARUMA).**

**TÉSIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAGÍSTER
EN AMBIENTAL**

JORGE LUIS TAFUR SALAZAR
JORGETASAL@HOTMAIL.COM

DIRECTOR: Dr. PATRICIO JAVIER ESPINOZA MONTERO

patricio.espinoza@epn.edu.ec

Quito, Enero 8, 2016

DECLARACIÓN

Yo, Jorge Luis Tafur Salazar declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo según lo establecido en la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

JORGE LUIS TAFUR SALAZAR

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Jorge Luis Tafur Salazar, bajo mi supervisión.

Dr. PATRICIO J. ESPINOZA. M.
DIRECTOR DE PROYECTO

AGRADECIMIENTOS

A Dios, que con su bendición me da la oportunidad de mantenerme con salud, conocer nuevos caminos, experiencias y gente admirable.

A mis padres, Dolores y Fernando, a mi hermano Diego y a Verónica por brindarme toda su confianza y apoyo incondicional.

Mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al Dr. Patricio Espinoza, director de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de este tiempo.

Especial reconocimiento, merece el interés mostrado por la Ing. Carola Fierro en mi trabajo, gracias por la confianza en mí depositada.

También me gustaría agradecer la ayuda recibida por parte del Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM) de la Facultad de Ingeniería Civil y Ambiental (FICA) de la Escuela Politécnica Nacional (EPN), por hacer posible la realización de este trabajo, a través de todo su personal técnico y administrativo.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos.

A todos ellos, muchas gracias

DEDICATORIA

A la memoria de Erika Patricia Pintado Tafur

CONTENIDO

DECLARACIÓN	II
CERTIFICACIÓN	III
CONTENIDO.....	VI
RESUMEN	XVI
PRESENTACIÓN	XVIII
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	6
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	6
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	6
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
1.4 ALCANCE.....	7
1.5 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	8
CAPÍTULO 2	10
2 MARCO TEÓRICO	10
2.1 ANTECEDENTES.....	10
2.1.1 DESARROLLO DE LA ELECTROQUÍMICA.....	10
2.2 PRINCIPIOS DE LA ELECTROQUÍMICA ANALÍTICA.....	11
2.2.1 TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS.....	11
2.2.2 CURVA i/E	14
2.3 LEYES DE FARADAY	15
2.4 APORTES EN LA MEDICIÓN DE POTENCIAL Y CORRIENTE.....	17
2.4.1 FENÓMEOS DE TRANSFERENCIA DE MASA.....	18
2.5 VOLTAMETRÍA CÍCLICA	21

2.5.1	ECUACIONES BÁSICAS EN VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA	24
2.6	CRONOAMPEROMETRÍA	28
2.7	VOLTAMETRÍA DE ONDA CUADRADA	33
2.8	ANÁLISIS DE REDISOLUCIÓN	35
2.9	ELECTRODO DE DIAMANTE DOPADO CON BORO	39
2.10	MÉTODOS ANALÍTICOS ADECUADOS A SU PROPÓSITO	41
2.10.1	VALIDACIÓN DE UN MÉTODO	41
2.10.2	LÍMITE DE DETECCIÓN	41
2.10.3	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	42
2.10.4	INTERVALO DE TRABAJO E INTERVALO LINEAL	42
2.10.5	EXACTITUD	42
2.10.6	VERACIDAD	43
2.10.7	PRECISIÓN	43
2.10.8	REPETIBILIDAD	44
2.10.9	LÍMITE DE REPETIBILIDAD “r”	44
2.10.10	REPRODUCIBILIDAD	45
2.10.11	LÍMITE DE REPRODUCIBILIDAD “R”	45
2.10.12	INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN	45
2.10.13	SENSIBILIDAD	46
2.10.14	RECUPERACIÓN	46
2.10.15	ERROR DE MEDICIÓN	47
2.10.16	ERROR ALEATORIO	47
2.10.17	ERROR SISTEMÁTICO	47
2.10.18	ESPECIFICIDAD	47
2.10.19	TRAZABILIDAD	47
	CAPITULO 3	49
3	DISEÑO EXPERIMENTAL	49

3.1	REQUISITOS ANALÍTICOS	49
3.2	NECESIDAD ANALÍTICA DE Pb (II), Cd (II) Y Hg (II)	50
3.2.1	FUENTE DE EXPOSICIÓN DE Pb (II)	51
3.2.2	FUENTE DE EXPOSICIÓN DE Cd (II)	52
3.2.3	FUENTE DE EXPOSICIÓN DE Hg (II)	53
3.2.4	OBJETIVOS DE VALIDACIÓN PARA Pb (II), Cd (II) Y Hg (II)	55
3.2.5	PRINCIPIO DEL MÉTODO (SWVAS)	57
3.2.6	CALIBRACIÓN CON ADICIÓN DE ESTÁNDARES	63
3.2.7	DETERMINACIÓN DE PLOMO (II) Y CADMIO (II)	65
3.2.8	EXPLORACIÓN Y AFINACIÓN DE LA TÉCNICA	72
3.2.9	DETERMINACIÓN DE MERCURIO	76
3.2.10	AFINACIÓN DE LA TÉCNICA PARA DETERMINAR Hg (II)	78
3.3	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	81
3.3.1	Pb (II), Cd (II) Y Hg (II)	81
CAPITULO 4		88
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	88
4.1	CARACTERIZACIÓN DEL ELECTRODO DE TRABAJO (BDD)	88
4.1.1	MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM Y c-AFM)	89
4.2	RESPUESTA Y ELECCIÓN DE LA SEÑAL	92
4.2.1	Cd II Y Pb II	92
4.2.2	ESTABILIZACIÓN DE LAS MEDIDAS DE Cd II Y Pb II	94
4.2.3	LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN Cd II Y Pb II	102
4.2.4	SEÑALES DE RESPUESTA E INTERVALO LINEAL PARA Cd (II)	105
4.2.5	ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE (ANOVA) PARA Cd (II)	107
4.2.6	SEÑALES DE RESPUESTA E INTERVALO LINEAL PARA Pb (II)	117
4.2.7	ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE (ANOVA) PARA Pb (II)	119
4.3	RESPUESTA Y ELECCIÓN DE LA SEÑAL	126

4.3.1	MERCURIO Hg (II)	126
4.3.2	ESTABILIZACIÓN DE MEDIDAS	128
4.3.3	LÍMITE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE Hg (II)	133
4.3.4	SEÑALES DE RESPUESTA E INTERVALO LINEAL DE Hg (II).....	134
4.3.5	ANÁLISIS DE VARIANZA (ADEVA) PARA Hg (II).....	135
4.4	MUESTRAS REALES.....	140
4.4.1	DETERMINACIÓN DE Cd (II) Y Pb (II).....	140
4.4.2	DETERMINACIÓN DE Hg (II).....	147
CAPITULO 5		149
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	149
5.1	CONCLUSIONES	149
5.2	RECOMENDACIONES.....	153
BIBLIOGRAFÍA		155
ANEXOS		159

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 2.1 HISTORIA DEL DESARROLLO DE LA ELECTROQUÍMICA	11
TABLA 3.1 OBJETIVOS DE VALIDACIÓN PARA Pb (II), Cd (II) Y Hg (II).....	55
TABLA 3.2 LÍMITES DE DESCARGA A UN CUERPO DE AGUA DULCE	56
TABLA 3.3 COEFICIENTES DE VARIACIÓN (HORWITZ).....	57
TABLA 3.4 RANGO DE VALIDACIÓN PARA Pb (II), Cd (II) Y Hg (II).....	72
TABLA 3.5 PARÁMETROS INICIALES PARA Pb (II) Y Cd (II).....	72
TABLA 3.6 PARÁMETROS DE POTENCIAL PARA Cd (II) y Pb (II).....	75
TABLA 3.7 PARÁMETROS DE PRECONCENTRACION DE Cd (II) Y Pb (II)	76
TABLA 3.8 VARIABLES DE PARTIDA PARA DETERMINAR Hg (II)	78
TABLA 3.9 PARÁMETROS DE DEPOSICIÓN DEL FILM DE Au (III).....	79
TABLA 3.10 ACTIVACIÓN DEL FILM DE Au (III)	80
TABLA 3.11 PARÁMETROS PARA DETERMINAR MERCURIO POR (SWV)	80
TABLA 3.12 NIVELES DE CONCENTRACIÓN A VALIDAR.....	81
TABLA 3.13 PARÁMETROS QUE DEFINEN LA EXACTITUD	84
TABLA 4.2 SELECCIÓN DE LA SEÑAL (ALTURA/ÁREA)	94
TABLA 4.5 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE Cd (II) y Pb (II)	105
TABLA 4.7 CUANTIFICACIÓN DE Cd (II).....	108
TABLA 4.8 TEST DE COCHRAN HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS	109
TABLA 4.9 TEST DE KOLMOGOROV-SMIRNOV (NORMALIDAD).....	110
TABLA 4.10 RESULTADOS DE LA PRUEBA F.....	110
TABLA 4.11 LÍMITE DE REPETIBILIDAD DEL ENSAYO PARA Cd (II)	111
TABLA 4.12 LÍMITE DE REPRODUCIBILIDAD DEL ENSAYO PARA Cd (II)....	111
TABLA 4.13 RESULTADOS DE 3 ppb DE Cd (II) ANALIZADOS POR ICP.....	112
TABLA 4.14 SESGOS PROMEDIOS POR DÍA PARA 3 ppb DE Cd (II).....	112
TABLA 4.15 ANÁLISIS DE SESGO 3 ppb Cd (II)	113
TABLA 4.16 ANÁLISIS DE SESGO 5 ppb Cd (II)	113
TABLA 4.17 INCERTIDUMBRE TÍPICA DE 5 ppb DE Cd (II).....	115
TABLA 4.18 MUESTRA CERTIFICADA DE Cd (II).....	116
TABLA 4.19 CARACTERÍSTICAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL Pb (II).....	119
TABLA 4.21 TEST DE COCHRAN HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Pb (II) 120	
TABLA 4.22 TEST DE KOLMOGOROV-SMIRNOV (NORMALIDAD).....	121
TABLA 4.23 RESULTADOS DE LA PRUEBA F PARA Pb (II)	121
TABLA 4.24 LÍMITE DE REPETIBILIDAD DEL Pb (II)	122
TABLA 4.25 LÍMITE DE REPRODUCIBILIDAD DEL Pb (II).....	122

TABLA 4.26 RESULTADOS DE 3 ppb DE PLOMO POR ICP	122
TABLA 4.27 SESGOS PROMEDIOS POR DÍA PARA 3 ppb DE Pb (II)	123
TABLA 4.28 ANÁLISIS DE SESGO 3 ppb Pb (II).....	123
TABLA 4.29 RESULTADOS DE 5 ppb DE PLOMO POR ICP	123
TABLA 4.30 SESGOS PROMEDIOS POR DÍA PARA 5 ppb DE Pb (II)	123
TABLA 4.31 ANÁLISIS DE SESGO 5 ppb Pb (II).....	124
TABLA 4.32 INCERTIDUMBRE TÍPICA DE 5 ppb DE Pb (II)	124
TABLA 4.33 DETERMINACIÓN DE Pb (II) EN MUESTRA CERTIFICADA	125
TABLA 4.34 VARIACIÓN DE INTENSIDAD DE CORRIENTE DEL Hg (II).....	127
TABLA 4.35 VARIABLES PARA LA FORMACIÓN DE PICO Hg (II).....	128
TABLA 4.37 LÍMITE DE DETECCIÓN DEL Hg (II).....	133
TABLA 4.38 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE Hg II.....	133
TABLA 4.39 CARACTERÍSTICAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL Hg (II)	135
TABLA 4.40 CONCENTRACIONES DE Hg II	136
TABLA 4.41 TEST DE COCHRAN (HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS)	136
TABLA 4.42 TEST DE KOLMOGOROV-SMIRNOV (NORMALIDAD).....	136
TABLA 4.43 RESULTADOS DE LA PRUEBA F Hg (II).....	137
TABLA 4.44 LÍMITE DE REPETIBILIDAD DEL Hg (II).....	137
TABLA 4.45 LÍMITE DE REPRODUCIBILIDAD DEL Hg (II)	138
TABLA 4.46 INCERTIDUMBRE TÍPICA DE 5 ppb DE Hg (II).....	138
TABLA 4.47 DETERMINACIÓN DE Hg (II) EN MUESTRA CERTIFICADA.....	139
TABLA 4.48 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR Cd (II)	142
TABLA 4.49 ANÁLISIS DE Cd (II) EN EL SISTEMA DE COLUMNAS.....	143
TABLA 4.50 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA PLOMO Pb (II).....	144
TABLA 4.51 CONCENTRACIÓN MUESTRAS REALES DE Pb (II).....	145
TABLA 4.52 CUANTIFICACIÓN DE Cd II Y Pb II EN MUESTRAS REALES.....	147
TABLA 4.53 CURVA DE CALIBRACIÓN DEL Hg (II)	148
TABLA 5.1 Ld Y Lc DE Cd (II), Pb (II) y Hg (II).....	150
TABLA 5.2 INCERTIDUMBRE DE Cd (II), Pb (II) y Hg (II).....	151
TABLA 5.3 CUANTIFICACIÓN DE Cd (II), Pb (II) y Hg (II)	152

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS	12
FIGURA 2.2 PERTURBACIONES EN SISTEMAS ELECTROACTIVOS	13
FIGURA 2.3 POLARIZACION DE ELECTRODOS.....	15
FIGURA 2.4 TIPOS DE TRANSPORTE DE MASA HACIA EL ELECTRODO	19
FIGURA 2.5 APLICACIÓN TRIANGULAR DE POTENCIAL	22
FIGURA 2.6 VOLTAMPEROGRAMA CÍCLICO	23
FIGURA 2.7 IMPOSICIÓN DE POTENCIAL EN LA VOLTAMETRÍA CÍCLICA....	24
FIGURA 2.8 VOLTAMETRÍA CÍCLICA DE (a) O ₂ Y (b) 2-NITROPROPANO.	28
FIGURA 2.9 VARIACIÓN DE POTENCIALES CON EL TIEMPO	30
FIGURA 2.10 BARRIDO CRONOAMPEROMÉTRICO	30
FIGURA 2.11 VOLTAMETRÍA DE ONDA CUADRADA (SWV).....	33
FIGURA 2.12 VOLTAMPEROGRAMA DE ONDA CUADRADA (SWV)	35
FIGURA 2.13 SWVAS DE Cd (II), Pb (II), Y Cu (II)	36
FIGURA 2.14 CATIONES EN SOLUCIÓN ANTES DEL ANÁLISIS (ASV)	37
FIGURA 2.15 PARTÍCULAS PRECONCENTRADAS EN EL ELECTRODO	37
FIGURA 2.16 SELECTIVIDAD DEL ELECTRODO DE TRABAJO	38
FIGURA 2.17 OXIDACIÓN DEL ANALITO.....	38
FIGURA 2.18 MICROGRAFÍA POR AFM DE BDD	40
FIGURA 3.1 TIPOS DE MÉTODOS A VALIDAR	50
FIGURA 3.3 PERFIL DE VOLTAJE DE LA SWV	59
FIGURA 3.4 DIFERENCIA DE CORRIENTES ANÓDICA Y CATÓDICA.....	60
FIGURA 3.5 PROCESO DE SWVAS	61
FIGURA 3.6 VERIFICACIÓN DIARIA DEL POTENCIOSTATO	68
FIGURA 3.7 PARÁMETROS DE VOLTAMETRÍA CÍCLICA.....	69
FIGURA 3.8 VOLTAMETRÍA CÍCLICA DE FERRICANURO DE POTASIO.....	70
FIGURA 4.2 IMÁGENES DEL AFM Y c-AFM DEL ELECTRODO DE BDD	91
FIGURA 4.3 IMAGEN EN 3D DE LA DISTRIBUCIÓN DE BORO Y DIAMANTE....	92
FIGURA 4.4 GENERACIÓN DE SEÑAL INSTRUMENTAL	93
FIGURA 4.5 SELECCIÓN DEL TIEMPO DE PRECONCENTRACIÓN.....	96
FIGURA 4.7 MODULACIÓN DEL INCREMENTO DE POTENCIAL	98
FIGURA 4.9 SELECCIÓN DE LA FRECUENCIA.....	100

FIGURA 4.10 INTERFERENCIA DE Zn (II) EN LA SEÑAL DE Cd (II).....	101
FIGURA 4.12 VENTANA DE TRABAJO DEL ELECTRODO DE BDD	103
FIGURA 4.13 SEÑAL GENERADA POR 0.1 ppb DE Cd II y Pb II.....	104
FIGURA 4.16 FUENTES DE INCERTIDUMBRE DE MEDIDA DE Cd (II).....	114
FIGURA 4.22 DEPOSICIÓN DE UN FILM DE ORO SOBRE BDD	126
FIGURA 4.23 ACTIVACIÓN DEL FILM DE ORO EN HCl 0.06 N	127
FIGURA 4.25 INCREMENTO DE VOLTAJE DEL Hg (II)	129
FIGURA 4.26 AMPLITUD DE VOLTAJE DEL Hg (II)	130
FIGURA 4.32 MUESTRA CERTIFICADA DE Hg (II).....	140
FIGURA 4.33 SISTEMA DE COLUMNAS DAS.....	141
FIGURA 4.34 SEÑALES DE CORRIENTE DE DETECCIÓN Cd (II)	142
FIGURA 4.35 CURVA DE INTERPOLACIÓN DEL Pb (II).....	144
FIGURA 4.36 SEÑALES DE CORRIENTE DE Cd (II) Y Pb (II)	145
FIGURA 4.37 INTERPOLACIÓN DE Cd (II) Y Pb (II).....	146
FIGURA 4.38 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICAR Hg (II)	148

SIMBOLOGÍAS Y ABREVIATURAS

AFM	microscopía de fuerza atómica
c-AFM	Microscopía de fuerza atómica conductiva
Al-Hg	Alquilmercurio
AMD	Drenaje Ácido de Mina
ANOVA	Análisis de Varianza
APHA	American Public Health Association
BDD	Boron Doped Diamond
CICAM	Centro de Investigaciones y Control Ambiental
CE	Contraelectrodo
CV	Cyclic Voltammetry
CV	Coefficiente de Variación
DAS	Sustrato Alcalino Disperso
DCM _B	Diferencias Cuadráticas Medias Entre Grupos
DCM _T	Diferencias Cuadráticas Totales
DCM _W	Diferencias Cuadráticas Medias Dentro de Grupos
DME	Drop Mercury Electrode
DPV	Differential Pulse Voltammetry
ϵ	Equivalente Electroquímico
E _{pa}	Potencial de Pico Anódico
E _{pc}	Potencial de Pico Catódico
ER	Electrodo de Referencia
ET	Electrodo de Trabajo
FICA	Facultad de Ingeniería Civil y Ambiental
H _i	Hipótesis Alternativa
H _o	Hipótesis Nula
i _c	Corriente Capacitiva
IEC	International Electrochemical Commission
i _d	Corriente de Difusión
ISO	International Organization for Standardization
LoD	Límite de Detección

LoQ	Límite de Cuantificación
MA	Masa Atómica
Me-Hg	Metil-Mercurio
MRC	Material Certificado de Referencia
MT	Metalotioneínas
n	Número de Electrones
NPV	Normal Pulse Voltammetry
SAE	Sistema de Acreditación Ecuatoriano
SCT	Sumatoria de Cuadrados Totales
SDC _T	Suma de Diferencias Cuadráticas Totales
SDC _w	Suma de Diferencias Cuadráticas Dentro de Grupos
SWASV	Square Wave Anodic Stripping Voltammetry
SWV	Square Wave Voltammetry
ppb	Partes Por Billón
Hg	Mercurio
Pb	Plomo
Cd	Cadmio

RESUMEN

En este trabajo de investigación se llevó a cabo la cuantificación de metales pesados [Cd(II), Pb(II) y Hg(II)] mediante voltamperometría de onda cuadrada por redisolución anódica (SWVAS, por sus siglas en inglés), en aguas estancadas de minas abandonadas (Distrito Minero Portovelo–Zaruma) utilizando un electrodo de trabajo de diamante dopado con boro (BDD, por sus siglas en inglés)

Se realizó la caracterización del electrodo de BDD mediante AFM (Atomic Force Microscopy) y c-AFM (conductiva), es evidente que una limpieza superficial del electrodo de BDD nuevo es necesario antes de que éste sea utilizado en cualquier tipo de estudio electroanalítico debido a un aumento de sensibilidad de corriente eléctrica pudiendo detectar niveles de corriente en pA (pico amperios).

Se llevó a cabo la validación de la cuantificación de metales pesados [(Cd(II), Pb(II) y Hg(II)] mediante ASV (voltametría de redisolución anódica) en cuatro niveles de concentración (5, 10, 15 y 20 ppb), utilizando como electrodo de trabajo el BDD.

Para cada nivel de concentración de cada metal se realizaron cuantificaciones diarias de cada analito, por triplicado durante cinco días, con el fin de conocer la variabilidad del método.

En la validación de la metodología, ASV, para la cuantificación de Cd(II), Pb(II) y Hg(II) se determinaron los siguientes parámetros: la selectividad, los límites de detección (0.69, 0.86 y 2.01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), los límites de cuantificación (1.45, 1.97 y 3.28 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), la veracidad (el sesgo es aceptable para los tres metales al comparar sus concentraciones con otra metodología validada), la repetibilidad (< 15 % del CV), la reproducibilidad (<20 % del CV), y la exactitud como incertidumbre de medida (± 36.63 , ± 28.53 , ± 28.85 %) para el Cd(II), Pb(II) y Hg(II) respectivamente.

Una vez validados los tres metales por ASV, se cuantificó una muestra certificada por la Analytical Quality Control Services, donde el sesgo respecto a los valores

declarados en el certificado es menor al 20%, de acuerdo a la campana de Horwitz es una variación aceptable.

La linealidad como coeficiente de correlación (r) de los tres metales, en los cuatro niveles de concentración estudiados, aproximadamente 0.99. La varianza de la repetibilidad y la reproducibilidad en los cuatro niveles de concentración para Cd(II), Pb(II) y Hg(II) es homogénea y se ajustan a una distribución normal según la prueba de Kolmogórov - Smirnov. Los resultados de la prueba de Fisher nos indica que no existe diferencia significativa entre tratamientos por efecto del día de análisis, por lo que, se aceptó la hipótesis nula del diseño experimental.

Una vez validado y certificado el método de cuantificación, de Cd(II), Pb(II) y Hg(II) por ASV, se lo utilizó en la determinación de metales pesados en muestras de agua de minas abandonadas de la zona de Zaruma (muestras reales). Las concentraciones promedio de las muestras reales de aguas del sector de Zaruma fueron: Cd (II) = $149.42 \mu\text{g.L}^{-1} \pm 36.63\%$, Pb (II) = $309.35 \mu\text{g.L}^{-1} \pm 28.53\%$ y Hg (II) = $708.99 \mu\text{g.L}^{-1} \pm 28.55\%$

Las metodologías electroquímicas son tecnologías muy prometedoras debido a su bajo costo, procedimientos de operación sencillos, alta sensibilidad (límite detección del orden de los ppb e incluso ppt), además permite con facilidad realizar mediciones en campo en muestras reales.

PRESENTACIÓN

En este trabajo de investigación se realizó la implementación de una tecnología muy sensible ($< 2 \mu\text{g.L}^{-1}$) y barata (ASV) para la cuantificación de Cd (II), Pb (II) y Hg (II), en agua. Como aplicación se estudió aguas de minas abandonadas del cantón Zaruma provincia de El Oro.

Para lo cual, se llevó a cabo una caracterización del electrodo de trabajo (BDD) mediante AFM. Posteriormente se validó la técnica ASV para la cuantificación de los tres metales. Una vez validado el método se comprobó utilizando una muestra certificada por la Analytical Quality Control Services. Finalmente, se utilizó la metodología en la determinación de estos tres metales en aguas de minas abandonadas de la provincia El Oro, cantón Zaruma.

En este trabajo de investigación se utilizó ASV, debido que es una técnica electroanalítica de alta sensibilidad, rápida y de bajo costo, con límites de detección muy bajos (LD de 0.69 ppb para Cd(II); 0.86 ppb para Pb(II) y 2.01 ppb para el Hg(II), por esta técnica) con respecto a otras técnicas electroquímicas como: polarografía normal, voltamperometría normal e incluso la voltamperometría diferencial de pulsos (Schiewe et al., 1997).

Se utilizó un electrodo de trabajo de BDD, debido a que presenta propiedades únicas y favorables (baja corriente capacitiva, una gran estabilidad química, muy buena reproducibilidad de señales analíticas, etc.) para poder detectar concentraciones muy bajas de analitos (del orden de los ppb) (Pleskov, Krotova, Elkin, & Ekimov, 2015).

La estructura de la tesis está dividido en cinco capítulos: **capítulo I**; introducción, formulación del problema, los objetivos y el alcance del estudio, **capítulo II**; revisión bibliográfica, **capítulo III**; diseño experimental, **capítulo IV**; resultados y discusiones, **capítulo V** conclusiones y recomendaciones de éste trabajo de investigación.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La explotación minera ha evolucionado con el pasar de los años y se ha convertido en una de las actividades más rentables en la industria.

Sin embargo, se sabe que la minería a gran escala sería capaz de satisfacer las demandas actuales en minerales sin poner en peligro el medio ambiente y las necesidades de las generaciones futuras, es decir sin provocar graves trastornos ambientales y complejos impactos en las comunidades asentadas en zonas mineras y en la población en general (Amezaga et al., 2011).

El concepto de minería responsable fue promovido por diversos gobiernos del mundo, quienes estaban en ese entonces interesados en la explotación minera, desde finales de los años noventa. En esta época, grandes empresas transnacionales mineras, en el marco de la Iniciativa Minera Global (Global Mining Initiative), se asociaron para responder a la preocupación creciente provocada por las grandes contaminaciones derivadas de la actividad minera en el mundo.

En la actualidad, el gobierno del presidente Rafael Correa retoma ese discurso y promueve los conceptos de extracción y explotación responsable, especialmente a través de su Plan Nacional de Desarrollo del Sector Minero 2011-2015.

A pesar del potencial económico y social la minería siempre ha estado ligada a la producción de grandes volúmenes de residuos sólidos, líquidos y gaseosos que han provocado la contaminación del suelo, aire y aguas subterráneas.

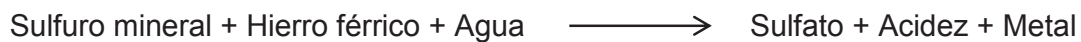
La minería a cielo abierto es una de las explotaciones más factibles y la más utilizada, sin embargo, genera diez veces más desechos que las minas subterráneas. El material “estéril” del proceso de extracción minera es depositado en terrenos donde se encuentra en contacto con la atmósfera y el agua, la presencia

conjunta de estos elementos favorecen al proceso de oxidación de los minerales presentes en estos suelos removidos como es el caso de sulfuros de hierro, y la presencia de ciertas bacterias pueden acelerar la formación del drenaje ácido de roca, provocando la contaminación de suelos y aguas subterráneas.

El drenaje ácido de mina (DAM) es la consecuencia de la oxidación de algunas formas de sulfuro ferroso (pirita, pirrotita, marcasita, etc.) cuando entran en contacto con el oxígeno del aire y agua, se produce la siguiente reacción general (Pamo, Aduvire, & Baretino, 2002)



También otros oxidantes como hierro férrico pueden reemplazar al oxígeno del aire en la reacción y en algunos casos al oxígeno del agua según la siguiente reacción:



A una mina abandonada se la puede catalogar como la obra resultante del conjunto de excavaciones e instalaciones superficiales y subterráneas que se realizaron para la investigación y la explotación y procesamiento de un yacimiento mineral cuyos recursos se agotaron y no tienen dueño, teniendo un deterioro progresivo en el tiempo, lo cual representa actualmente un riesgo al medio ambiente, a la salud de las personas, a la calidad del ecosistema en general y al entorno de la misma (García, 2012).

Al abandonar las minas luego de la explotación (en especial las de cielo abierto) pueden ocurrir estos dos escenarios:

- 1) Que el lugar afectado por la minería a cielo abierto sea recolonizado por la vegetación naturalmente recuperándose el medio natural.

- 2) Problemas de carácter edáfico o problemas de contaminación que restringen el establecimiento de la vegetación por décadas o siglos.

Los drenajes ácidos de mina además de su bajo pH contienen una gran cantidad de sólidos en suspensión con un alto contenido de sulfato y metales disueltos (Fe, Al, Mn, Zn, Cu, Pb, Hg, Cd, Ni), del orden de varios cientos de miligramos por litro.

Tal efecto puede durar décadas y hasta cientos de años, con la posibilidad de que sean transportados por la lluvia o escurrimientos a lugares que representen un riesgo para el equilibrio ecológico del medio ambiente y la salud de la población en general.

La mayoría de los iones metálicos son carcinógenos y conducen a problemas graves de salud. Por lo tanto, la detección rápida y precisa de los iones metálicos se ha convertido en un tema crítico. Diversos iones metálicos como arsénico, cadmio, plomo, mercurio y cromo se considera que son de alta toxicidad.

Para detectar estos iones metálicos se ha creado biosensores electroquímicos con interfaces tales como microorganismos, enzimas, nanomateriales de oro, nanopartículas de plata y se ha desarrollado una extensa variedad de óxidos metálicos. A los nanomateriales se los considera prometedores debido a su fuerte adsorción, elevada cinética de transferencia de electrones y alta compatibilidad con diversas superficies. El acoplamiento de técnicas electroquímicas con nanomateriales ha mejorado la sensibilidad, límite de detección y robustez de los métodos de ensayo (Gumpu, Sethuraman, Krishnan, & Rayappan, 2015).

La mayoría de métodos analíticos para la determinación de metales pesados en muestras ambientales implican; ya sea métodos espectroscópicos o cromatográficos, en los cuales se requiere un tratamiento adecuado de la muestra, equipos costosos, personal de laboratorio entrenado, lo que implicaría costos relativamente elevados y tiempo de respuesta considerables (Davis & Higson, 2013). Es por esto que, en el presente trabajo de investigación se propone una

metodología que en nuestro país es nueva y barata, y se puede utilizar incluso en campo para medidas en tiempo real de la concentración de metales pesados.

La determinación de metales pesados a niveles de trazas y de ultratrazas es una necesidad importante en todas las ramas de las ciencias ambientales y en procesos clínicos, debido a su toxicidad en concentraciones sobre ciertos límites del umbral permitido. Mucha atención se dedica al mercurio, cadmio y plomo que son particularmente perjudiciales, incluso en concentraciones bajas. Las técnicas analíticas más utilizadas en la actualidad para la cuantificación de los metales pesados son: espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GF-AAS, por sus siglas en inglés), espectrometría de absorción atómica de llama (AAS de llama, por sus siglas en inglés), espectrometría de absorción atómica de vapor frío (CV-AAS, por sus siglas en inglés), la espectrometría atómica de fluorescencia de vapor frío (CV-AFS, por sus siglas en inglés), la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS, por sus siglas en inglés), y algunas técnicas cromatográficas acopladas con métodos espectrométricos. Todas estas técnicas requieren de instrumentación costosa y sofisticada, además de un proceso minucioso en la preparación de las muestras. Por el contrario, los métodos voltamperométricos de redisolución presentan una alternativa interesante para la determinación de metales pesados debido a su sensibilidad, flexibilidad y bajos costos.

Dentro de los métodos electroquímicos, la voltamperometría de redisolución anódica (ASV) es la técnica más sensible y reproducible en la actualidad, esta consiste en la reducción de un metal M^{n+} sobre un electrodo adecuado (electroreducción), simultáneamente se reduce al mercurio presente en la solución (agregado intencionalmente) para formar una amalgama. Para que esto ocurra se impone un valor de potencial adecuado durante un periodo de tiempo (conocido como etapa de preconcentración del analito de interés), a este periodo se le denomina etapa de preconcentración del analito de interés. Luego se procede a oxidar el metal contenido en la amalgama, durante la etapa de la redisolución mediante un barrido de potencial de oxidación, el metal se oxida a su ión más estable desprendiéndose del electrodo a un potencial característico, dando una señal (pico de corriente)

proporcional a la concentración del metal en estudio presente en la disolución con sensibilidades del orden de ng/L (Zárate & Mendoza, 2009).

Los métodos electroquímicos ofrecen una solución en la detección de varios metales pesados sin la necesidad de grandes cantidades de muestra y de tratamientos complejos de las mismas.

La voltamperometría de redisolución anódica (ASV) ha sido uno de los métodos más antiguos utilizados en electroanalítica para la determinación de metales modernizado la voltamperometría y han reavivado el interés por la misma, para analizar contaminantes y metales en concentraciones del orden de los ppb (partes por billón) y hasta ppt (partes por trillón) entre otras aplicaciones (Zárate & Mendoza, 2009). Por ej. se ha utilizado ASV para la detección de: plomo (Arantes, Sardinha, R. Baldan, H. Cristovan, & G. Ferreira, 2014), plomo y cadmio (Daher, 1995), mercurio (Laffont et al., 2015), zinc (Langeloth, Chiku, & Einaga, 2010), plata y arsénico (Gumpu et al., 2015) y voltamperometría de redisolución catódica para la detección de: hierro (van den Berg, 2006), plomo (Kinard & Propst, 1974), etc. Es por ello que en el presente trabajo de investigación se propone la implementación (validación y certificación) de esta tecnología en el Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM) para la determinación de metales pesados como: Cd(II), Pb(II) y Hg(II) en muestras reales de agua de diferente origen, ej. aguas estancadas de una mina abandonada en el cantón Zaruma provincia de El Oro.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La detección y cuantificación de metales pesados a niveles traza en medio acuoso, has sido siempre un gran problema en los países en vías de desarrollo debido a que se requiere equipamiento muy costoso (GF-AAS, AAS-Flame, CV-AAS, CV-AFS, ICP-MS) (Zárate & Mendoza, 2009). Es por ello que, se hace necesario implementar tecnologías mucho más baratas de alta sensibilidad y que se puedan utilizar directamente en campo. Los metales pesados son los contaminantes más

peligrosos para el ser humano cuando se encuentran disueltos en agua, o contenidos en alimentos (Gumpu et al., 2015). En la explotación minera sin tomar las precauciones ambientales adecuadas, como es el caso del cantón Zaruma provincia de El Oro, dichos metales generan gran preocupación debido a su potencial toxicidad química. Incluso, debido a las propiedades tóxicas de algunos de estos metales (arsénico, cadmio, plomo mercurio, cobre, etc.) (Trzeciakowski, Gardiner, & Parrish, 2014) muchos de ellos se los ha empleado para diseñar pesticidas y antisépticos para uso agrícola en décadas pasadas (Benvenuto Mark, Ahuja, Duncan Timothy, Noonan Gregory, & Roberts-Kirchhoff Elizabeth, 2014).

Para resolver la problemática de la cuantificación de estos metales se crea una necesidad analítica en el CICAM de la Facultad de Ingeniería Civil y Ambiental (FICA) de la Escuela Politécnica Nacional (EPN), de validar y certificar mediante ASV la cuantificación de Cd(II), Pb(II) y Hg(II) y su aplicación en muestras reales de origen minero mediante este trabajo.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿La técnica de voltamperometría de redisolución anódica (ASV) cumplirá con los parámetros técnicos y de calidad preestablecidos por el Centro de Investigaciones y Control Ambiental en la determinación de Cd(II), Pb(II) y Hg(II) en el agua de drenaje de una mina abandonada del cantón Zaruma en la provincia de El Oro?

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar metales pesados (Cd(II), Pb(II) y Hg(II)) mediante voltamperometría de redisolución anódica (ASV), en aguas residuales de minas abandonadas (Distrito Minero Portovelo – Zaruma).

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el electrodo de BDD mediante micrografías por AFM y c-AFM.
- Validar el método de determinación de metales pesados (Cd(II), Pb(II) y Hg(II)), mediante voltamperometría de redisolución anódica (ASV), utilizando electrodos de diamante dopados de boro (BDD, por sus siglas en inglés).
- Estudiar las posibles interferencias que podría existir en muestras compuestas por diferentes metales en el electrodo de (BDD) y certificar la metodología (ASV) utilizando una muestra de los metales en estudio que sea trazable.
- Determinar la concentración de metales pesados (Cd(II), Pb(II) y Hg(II)), en aguas de una mina abandonada del Distrito Minero Portovelo – Zaruma.
- Proponer a esta metodología como una alternativa barata, sencilla de realizar y con una alta sensibilidad para determinar metales pesados en concentraciones muy bajas (trazas) sin la necesidad de una infraestructura muy compleja.

1.4 ALCANCE

Este trabajo de investigación abarca esencialmente la implementación de una técnica poco usual (voltamperometría de redisolución anódica “ASV”) a nivel de laboratorio de servicio en nuestro país, para la determinación cuantitativa de Cd(II), Pb(II) y Hg(II) en medios acuosos. En la primera parte se lleva a cabo la caracterización del material de electrodo (BDD) para conocer las características físicas y químicas de éste. Posteriormente se validará la metodología ASV para la determinación cuantitativa de Cd(II), Pb(II) y Hg(II) con la finalidad de tener resultados confiables con buena repetabilidad, reproducibilidad y linealidad. La

exactitud de esta metodología se evalúa a través de un material de referencia certificado internacionalmente.

Una vez determinado el comportamiento de cada uno de los metales en estudio, se analizará muestras de minas abandonadas del sector de estudio antes mencionado. El estudio termina con la colaboración a otro proyecto en el cual se está diseñando columnas de retención de metales en donde ingresan muestras del mismo origen y se analiza su concentración en los distintos puntos de tomas de muestra.

1.5 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

La ASV es reconocida como una metodología electroanalítica muy sensible (por debajo de 1×10^{-10} M) en el análisis de trazas de metales. Tiene la capacidad para la determinación cuantitativa simultánea de varios analitos, costo relativamente bajo de instrumentación, puede ser montado fácilmente incluso de manera portátil (Mirceski, Hocevar, Ogorevc, Gulaboski, & Drangov, 2012).

Se trata de una técnica no convencional en nuestro país, por lo que se propone validar el método como una necesidad analítica y una alternativa de análisis químico cuantitativo a desarrollarse en el Centro de Investigación y Control Ambiental CICAM de la Escuela Politécnica Nacional. Posteriormente se busca prestar servicio de análisis a la comunidad especialmente en aguas con concentraciones bajas de los metales en estudio.

Las técnicas voltamperométricas se encuentran entre las técnicas experimentales más utilizadas para la detección específica de metales pesados en muestras ambientales. En particular, resulta especialmente apropiada por su alta sensibilidad, estabilidad, robustez y bajo costo de mantenimiento para la determinación de analitos a baja concentración en muestras acuosas (Rosolina, Chambers, Lee, & Xue, 2015).

Adicionalmente, como las medidas electroquímicas son sensibles al estado de oxidación de los analitos, es posible realizar no sólo una determinación cuantitativa de los metales, sino también mediciones cualitativas de éstos, aprovechando adecuadamente las diferencias entre los potenciales de reducción u oxidación de las distintas especies en la muestra.

La determinación cuantitativa y cualitativa de metales pesados a bajos niveles de concentración en muestras de carácter ambiental son necesarias debido a su toxicidad, ya que, a diferencia de los residuos orgánicos, los metales no se degradan y se acumulan en los suelos, sedimentos y aguas residuales especialmente de explotación minera, por lo que afectan a los ecosistemas de forma prolongada.

Aunque los metales son importantes para llevar a cabo las funciones celulares, su rango de concentración tiene un gran impacto en la salud humana. Si el intervalo de concentración de los metales es menor que el intervalo de toxicidad, entonces se considera que son seguros. Cuando se va más allá de los límites permisibles, conduce a varios efectos citológicos y fisiológicos (Gumpu et al., 2015).

El mercurio, arsénico, plomo y cadmio se encuentran entre los metales pesados de mayor peligro ambiental, ya que se utilizan de forma masiva en procesos industriales y algunas de sus formas químicas poseen una elevada toxicidad. Estos metales además pueden ser transportados en gran medida por el aire, asociados a partículas sólidas, pueden encontrarse como contaminantes de aguas naturales de procedencia diversa y alejada de los focos reales de contaminación.

Los electrodos de BDD por su gran versatilidad y naturaleza del material puede realizar ligandos para formar capas superficiales de nanopartículas metálicas especialmente de mercurio y oro para aumentar aún más su sensibilidad en el momento de la detección de metales pesados incrementando de este modo su capacidad de electroanálisis para catalizar los procesos de óxido-reducción (Wang, Lu, Hocevar, Farias, & Ogorevc, 2000).

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 DESARROLLO DE LA ELECTROQUÍMICA

A través del experimento de Luigi Galvani con las ancas de rana (Galvanismo), se tiene en cuenta la acción de los metales, hecho que aprovecharía favorablemente Volta para la elaboración de su pila, y la explicación de la producción de electricidad a través de los fluidos. Sin embargo, Davy es quien va a establecer una relación entre la electricidad y la descomposición química de las sustancias, otorgando un significado importante en relación a la afinidad o no de las sustancias según su naturaleza eléctrica. Los aportes de otros científicos como Oersted, Ampère y Liebig van configurando la teoría electroquímica que posteriormente Berzelius logra interpretar en función de las proporciones de materia que se combinan y de los flujos eléctricos que estaban implicados “Es claro que la misma causa, que produce las combinaciones o las descomposiciones como la pila eléctrica, deben cooperar también en los mismos fenómenos fuera de esta” (Berzelius, 1811: 257). De esta manera, él pretendía no sólo explicar el cambio químico sino el carácter electropositivo o negativo que tenían las sustancias en relación a otras con las cuales reaccionaba.

Berzelius, a partir de allí, atribuyó al oxígeno (que ya había sido descubierto por Lavoisier, quien hablaba de oxidación) la mayor electronegatividad y el carácter dual de otras sustancias como los no metales con respecto al oxígeno (electropositivo) o con respecto a metales (electronegativo). Sin embargo, es importante además considerar los trabajos de Liebig en relación a la deshidrogenación de los alcoholes en aldehídos, que definían la oxidación y reducción en función del hidrógeno, en la TABLA 2.1 se analiza los principales

acontecimientos del desarrollo de la electroquímica en el siglo XIX (González, 2012).

TABLA 2.1 HISTORIA DEL DESARROLLO DE LA ELECTROQUÍMICA

Periodo	Evento Importante	Conceptos relevantes de electroquímica	Conceptos relevantes sobre actividad química
1771	Galvanismo	Producción de la electricidad a partir de procesos naturales.	Relación de la química con otras áreas (fisiología).
1800	Construcción de la pila de Volta.	Producción de la electricidad a partir de procesos artificiales.	Valor e importancia de los instrumentos científicos.
1806	Primera edición de charlas sobre química	Relación entre la electricidad y el cambio químico.	Divulgación y enseñanza de química.
1806	Conferencia de H. Davy acerca de algunos agentes químicos de la electricidad.	Descomposición química de sustancias a través de la electricidad.	Evolución y desarrollo del concepto de elemento químico.
1810	Lectura de Faraday de charlas sobre química	Estudio del cambio químico.	Contexto social y personal en la construcción del conocimiento.
1811	Teoría Dualista de J.J. Berzelius.	Coexistencia de dos partes (polos) positiva y negativa en cualquier átomo. Atracción y repulsión que ocurren entre los polos sobre las sustancias químicas (afinidad química).	Distinción y debate sobre química orgánica e inorgánica.
1836	Construcción de la pila de Daniell	Carácter oxidante y reductor de las sustancias, reacciones redox.	Valor e importancia de los instrumentos científicos.
1840	Última versión de charlas sobre química	Relación cuantitativa entre cantidad de sustancia y electricidad. Relación entre electricidad y magnetismo.	Mujeres científicas en la construcción del conocimiento científico.
1851	Propuesta de las leyes de Faraday.	Conservación de cargas, proporcionalidad entre materia y electricidad.	Relación con otras áreas del conocimiento (Física-Matemáticas).

FUENTE: La historia de la teoría electroquímica y su contribución a la promoción de la explicación científica en la química escolar.

ELABORADO POR: Jorge Tafur.

2.2 PRINCIPIOS DE LA ELECTROQUÍMICA ANALÍTICA

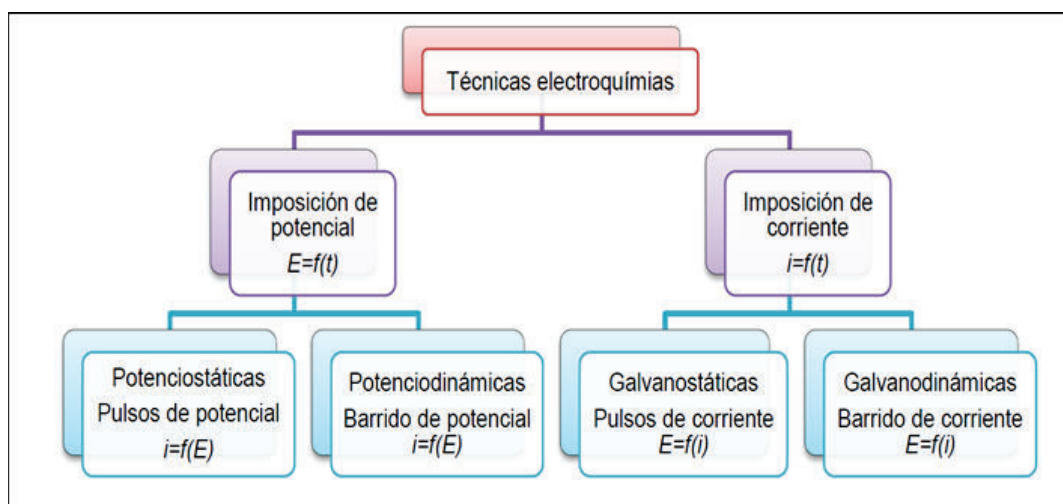
2.2.1 TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS

2.2.1.1 Programas de perturbación transitorios

De acuerdo al tipo de perturbación que se imponga en una celda electroquímica será el tipo de respuesta que se manifestará y de ella dependerá el tipo de información que se obtenga para caracterizar a las moléculas, las reacciones al electrodo, la cantidad de analito y la forma en que acontece dicha transformación.

Si se impone una diferencia de potencial se obtendrá una corriente de electrólisis; en cambio, si se impone una corriente constante la respuesta se manifestará por medio de un cambio de potencial en la interfase conductor – disolución. Las técnicas electroquímicas pueden dividirse de acuerdo en la manera en que realizan mediciones y la perturbación del sistema de acuerdo al Fig. 2.1:

FIGURA 2.1 CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

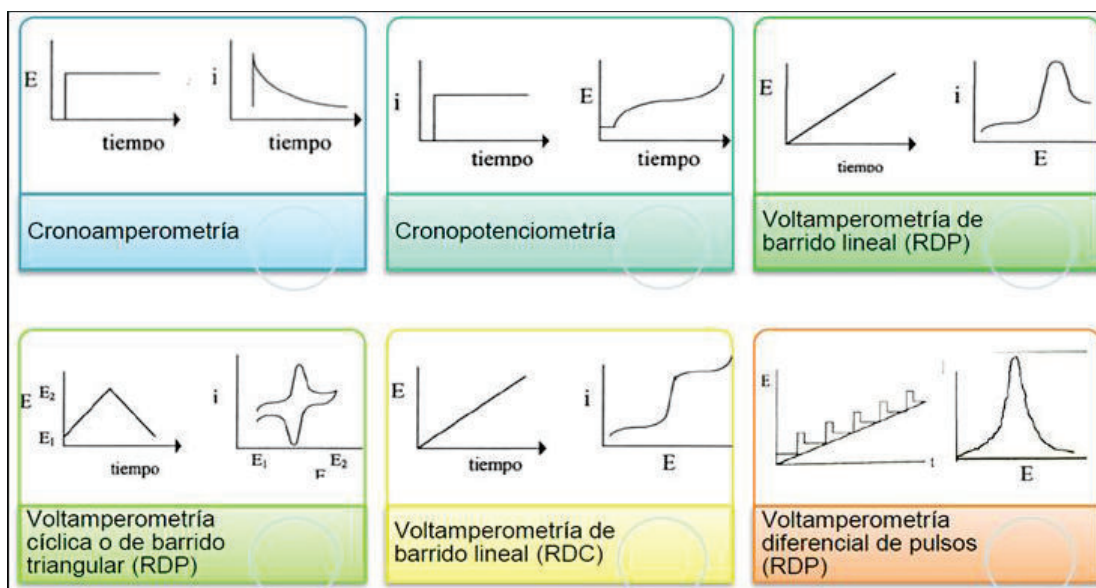


FUENTE: Alejandro Baeza, Principios de Electroquímica

Las técnicas electroquímicas forman un pilar importante en el análisis rutinario y permiten explicar fenómenos que hasta su concepción, habían resultado indescifrables.

Para que se lleve a cabo una reacción electroquímica debe provocarse una perturbación y generarse una respuesta de donde se puede obtener información que permitirá caracterizarla. Se tienen varios tipos de perturbación de acuerdo a la clasificación mostrada en la Fig 2.2 y son los siguientes:

FIGURA 2.2 PERTURBACIONES EN SISTEMAS ELECTROACTIVOS



FUENTE: Alejandro Baeza, Principios de Electroquímica.

- Por imposición de un pulso constante de potencial (cronoamperometría): Se impone una diferencia de potencial mediante un potencióstato y se registra la corriente obtenida en función del tiempo, manteniendo condiciones en estado estacionario (sin agitar). El transporte de masa en estas condiciones está regido por difusión y la curva $i - t$ refleja la disminución de la concentración del analito en las cercanías del electrodo.
- Por imposición de una corriente constante (cronopotenciometría): Se obtiene como respuesta un cambio en la diferencia de potencial, el cual cambia hacia valores de potencial característicos del par redox, la concentración de la especie varía conforme ocurre la transferencia de electrones (reacción electroquímica) necesaria para mantener la intensidad de corriente constante hasta que la especie se acaba en las cercanías del electrodo, es entonces cuando el potencial cambia hacia valores en que otra especie pueda aportar los electrones para seguir manteniendo la corriente constante.
- Técnicas que involucran la variación lineal de potencial con el tiempo, este tipo de técnicas utilizan un barrido de potencial que presenta velocidad

constante (también se puede realizar un barrido de corriente). Una de las técnicas más difundidas por la información que puede aportar sobre los mecanismos de reacción de especies electroactivas es la voltamperometría; la cual se puede realizar en régimen de difusión pura (sin agitar) o bien en régimen de difusión convectiva (se hace al girar el ET, o manteniendo el goteo de mercurio constante), donde se encuentra clasificada la polarografía.

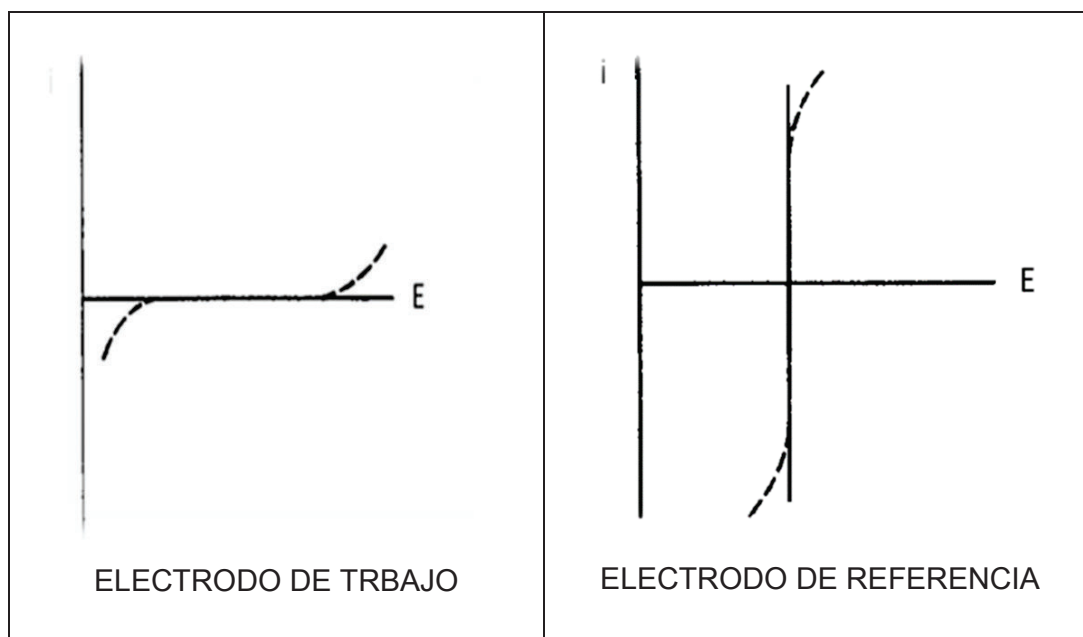
Las técnicas potenciodinámicas son la base fundamental del presente trabajo de investigación, por lo que, es importante comprender los principales fenómenos que ocurren durante una reacción electroquímica al realizar las curvas de intensidad de corriente vs. potencial (i vs. E).

2.2.2 CURVA i/E

Si se determina la corriente como una función de la polarización, se puede obtener información de la reacción que ocurre en la superficie del electrodo de trabajo (Fig. 2.3).

El término polarización (variación de potencial) se refiere a la desviación del potencial del electrodo, de su valor de potencial de corriente nula ($i = 0$), también llamado potencial de equilibrio, hacia valores de potencial positivo (oxidación) o valores de potencial negativo (reducción). Un electrodo idealmente polarizable, es aquel que muestra un cambio considerable en el potencial con el paso de una corriente infinitesimal (Fig. 2.3), este es el comportamiento de un electrodo de trabajo (ET). Un electrodo idealmente no polarizable es aquel cuyo potencial no cambia con el paso de una corriente, es decir, es un electrodo de potencial fijo, como debe de ocurrir con un electrodo de referencia (ER) (Baeza & García, 2011).

FIGURA 2.3 POLARIZACION DE ELECTRODOS



FUENTE: Alejandro Baeza. Principios de Electroquímica Analítica

Una medida del grado de polarización es El sobrepotencial, η , que es la desviación del potencial de su valor de corriente nula o potencial de circuito abierto (Ec. 2.1).

$$\eta = E_{eq} - E^0 \quad (2.1)$$

Donde η es el sobrepotencial, E_{eq} es el potencial de equilibrio y E^0 es el potencial estándar.

2.3 LEYES DE FARADAY

Para calcular la cantidad de producto formado por el paso de una cantidad dada de electricidad se emplean las leyes de Faraday. Estas establecen una relación proporcional entre la cantidad (moles) transformadas con la corriente empleada para tal fin.

Primera Ley: la masa de un elemento depositada en un electrodo es proporcional a la cantidad de corriente que pasa a través de la interfase electrodo – disolución o del electrodo - electrolito fundido:

$$m = \varepsilon \cdot q \quad (2.2)$$

Donde, m es masa depositada, ε es equivalente electroquímico del analito, q es la cantidad de carga que se está aplicando.

Como la cantidad de carga es: $q = i \times t$, la Ec. 2.2 se puede escribir:

$$m = \varepsilon \times i \times t \quad (2.3)$$

i es la intensidad de corriente eléctrica aplicada, t es el tiempo que se aplica la corriente.

El coulomb se define como la cantidad de carga (q) transmitida en un segundo, lo que se conoce como un amperio ($A = C/s$).

$$\varepsilon = \frac{m}{q} = \frac{m}{I \cdot t} \quad (2.4)$$

El equivalente electroquímico (ε) se define como la cantidad de una sustancia oxidada o reducida por el pasaje de un Faraday (F) de carga. El Faraday es la cantidad de carga que permite reducir un peso equivalente-gramo de una sustancia en el cátodo u oxidar un peso equivalente-gramo de una sustancia en el ánodo. Es decir, es la cantidad de carga que pone en juego el paso de un mol de electrones (6.023×10^{23} electrones) y tiene un valor constante $F = 96\,500.00$ C.

Por ej.: el paso de 2 moles de electrones pone en juego 2 F o 193 000 C ($2 \times 96\,500$ C). Numéricamente, el equivalente químico, es igual al cociente entre la masa atómica (MA) de una sustancia y el número de electrones (n) puestos en juego para oxidarla o reducirla:

$$E = \frac{MA}{n} \quad (2.5)$$

Donde, E es el equivalente químico, MA es la masa atómica, n es el número de electrones que se oxidan o se reducen.

La relación directa que existe entre el equivalente químico (E) y el electroquímico (ε) se establece según la Ec. 2.6:

$$\varepsilon = \frac{E}{F} = \frac{MA}{nF} \quad (2.6)$$

2.4 APORTES EN LA MEDICIÓN DE POTENCIAL Y CORRIENTE

Durante la serie de eventos que ocurren en una reacción electroquímica, los parámetros que se registran son la intensidad de corriente y la diferencia de potencial. Cuando se mide esta última, no solamente se mide la que se impone entre los electrodos, sino también se registran distintos aportes:

$$\Delta E_{medido} = (E_i + E_j + I_R) - E_R \quad (2.7)$$

Donde, E_i es el potencial impuesto por el potencióstato, E_j es el potencial de unión química, debido a la formación de las dos fases iónicas, I_R es el aporte en el potencial a causa de la resistencia de todo el circuito, E_R es el potencial del electrodo de referencia.

En la práctica los valores de I_R y E_j de tienen valores muy pequeños si se usan membranas de separación adecuadas, o si se usan microelectrodos y si se trabaja en presencia de sales iónicas concentradas para disminuir la resistencia de la disolución.

La intensidad de corriente también está constituida por diferentes aportes que son:

$$i_{medida} = i_{cap} + i_{far} \quad (2.8)$$

$$i_{far} = i_{difusión} + i_{migración} + i_{convección} \quad (2.9)$$

Donde, i_{cap} es la corriente capacitiva que aparece al formarse la doble capa eléctrica, i_{far} es la corriente farádica o de electrólisis, la cual es un indicativo de velocidad de la reacción electroquímica.

Ésta es resultado de la contribución de los tres fenómenos que componen el transporte de masa.

La velocidad de reacción, y por lo tanto la corriente de electrólisis, depende de la forma en la que la especie llega al electrodo, de la velocidad de transferencia electrónica, de las reacciones químicas acopladas que ocurren antes o después de la reacción electroquímica, de fenómenos de adsorción en la superficie del electrodo, que bien puede ser del medio de reacción o del compuesto estudiado.

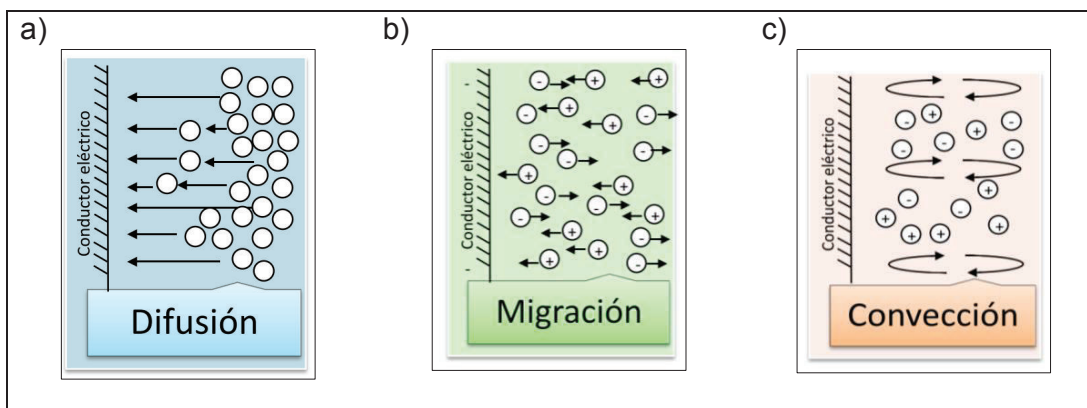
2.4.1 FENÓMEOS DE TRANSFERENCIA DE MASA

El transporte de masa de la disolución al electrodo puede ocurrir de tres maneras:

- **Difusión:** es el movimiento espontáneo debido a un gradiente de concentración, la materia fluye de una región de mayor concentración hacia otra de menor concentración hasta alcanzar en un estado homogéneo. (Fig. 2.4 – a)
- **Migración:** las especies con carga eléctrica son transportadas desde el seno de la disolución hacia el electrodo debido a un campo eléctrico, aplicado entre el ánodo y cátodo. (Fig. 2.4 – b)

- **Convección:** el transporte de materia se realiza desde el seno de la disolución hacia la interfase por medios físicos, al agitar una disolución, al girar o vibrar el electrodo de trabajo, etc. (Fig. 2.4 – c)

FIGURA 2.4 TIPOS DE TRANSPORTE DE MASA HACIA EL ELECTRODO



FUENTE: Alejandro Baeza. Principios de Electroquímica Analítica

Todos estos términos están involucrados en la ecuación de Nernst – Planck.

$$J(x, t) = -D \frac{\delta C(x, t)}{\delta x} - \left(\frac{zFDC}{RT} \right) \frac{\delta \phi(x, t)}{\delta x} + C(x, t)V(x, t) \quad 2.10$$

En la Ec. 2.10 el flujo de materia ($J(x, t)$ [$\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]) está dado por diferentes aportes, en primer lugar, el término de transporte por difusión donde $\frac{\delta C(x, t)}{\delta x}$ es el gradiente de concentración a la distancia x y al tiempo t . En segundo lugar se tiene el aporte del transporte por migración debido a un campo eléctrico aplicado, z y C son la carga y la concentración de la especie respectivamente y $\frac{\delta \phi(x, t)}{\delta x}$ es el gradiente de potencial. Por último se tiene la contribución convectiva, donde $V(x, t)$ es la velocidad hidrodinámica en la dirección x . De las demás constantes que aparecen, F es la constante de Faraday, D el coeficiente de difusión de la especie, R es la constante de los gases y T es la temperatura.

Debido a que la corriente eléctrica es proporcional al flujo de materia J que llega al electrodo para efectuar una reacción electroquímica, la corriente que se registra

estará en función de los aportes de difusión, migración y convección, como se describe en la Ec. 2.11

$$i = -nFAJ(x, t) \quad (2.11)$$

Donde, A es el área del electrodo y n el número de electrones intercambiados.

Para relacionar el valor de corriente con la concentración del analito o del compuesto de interés, se pueden realizar manipulaciones experimentales con el fin de controlar o hacer muy pequeño el transporte por migración (agregando sales iónicas concentradas) y por convección (utilizando una disolución sin agitar o bien, agitando constante y controladamente). Bajo estas condiciones el flujo de materia, descrito por la Ec. 2.10, estará determinado por difusión únicamente.

$$J(x, t) = -D \frac{\delta C(x, t)}{\delta x} \quad (2.12)$$

En conclusión, sustituyendo la Ec. 2.12 en la Ec. 2.11, se llega a una nueva función, en que la corriente registrada estará determinada por la difusión de la especie y será proporcional al gradiente de concentración de la especie electroactiva.

$$i = nFA D \frac{\delta C(x, t)}{\delta x} \quad (2.13)$$

El coeficiente de difusión está comprometido con la viscosidad del medio η , con la temperatura y con el radio de la partícula en movimiento (considerándola esférica, r por medio de la ecuación de Einstein–Stokes.

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r} \quad (2.14)$$

k_b y es una constantes igual a $1.38 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ que se denomina como constante de Boltzmann (Baeza & García, 2011).

En el análisis voltamétrico se mide la intensidad de corriente que atraviesa un electrodo por aplicación de una diferencia de potencial. Las diferentes técnicas voltamétricas se distinguen, esencialmente, por la diferente forma de variación del potencial aplicado.

Se puede decir que la evolución introducida en el tipo de modulación de la forma del potencial ha resultado de una investigación constante dirigida a alcanzar límites de detección cada vez menores, sin olvidarse que las técnicas voltamétricas más avanzadas, con utilización de formas más complejas de modulación de potencial, están asociadas, en general, a límites de detección más bajos (Harris, 2007).

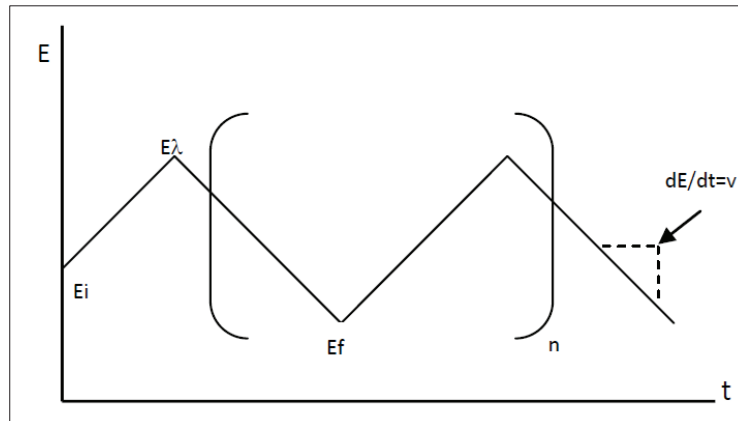
El método voltamétrico de análisis químico se basa en la interpretación de las curvas intensidad de corriente – potencial (i vs. E), resultantes de la electro-reducción o electro-oxidación de las especies en solución, y se va a mencionar las modulaciones de potencial utilizadas en esta investigación que son:

- Voltametría Cíclica
- Cronoamperometría
- Voltametría de Onda Cuadrada

2.5 VOLTAMETRÍA CÍCLICA

Una de las técnicas que más se emplea para estudiar mecanismos de reacción es la voltamperometría cíclica, ya que aporta información rápida acerca del comportamiento redox de las especies, de las reacciones químicas en que participan (mecanismos de reacción, reacciones químicas acopladas) y en la determinación de parámetros termodinámicos. Como se muestra en la Fig. 2.5, la señal es de tipo triangular, es decir, se aplica un número n de ciclos, sobre un electrodo estacionario, estático y en régimen de difusión pura (sin agitar).

FIGURA 2.5 APLICACIÓN TRIANGULAR DE POTENCIAL



FUENTE: Electrochemical Methods, Allen J. Bard.

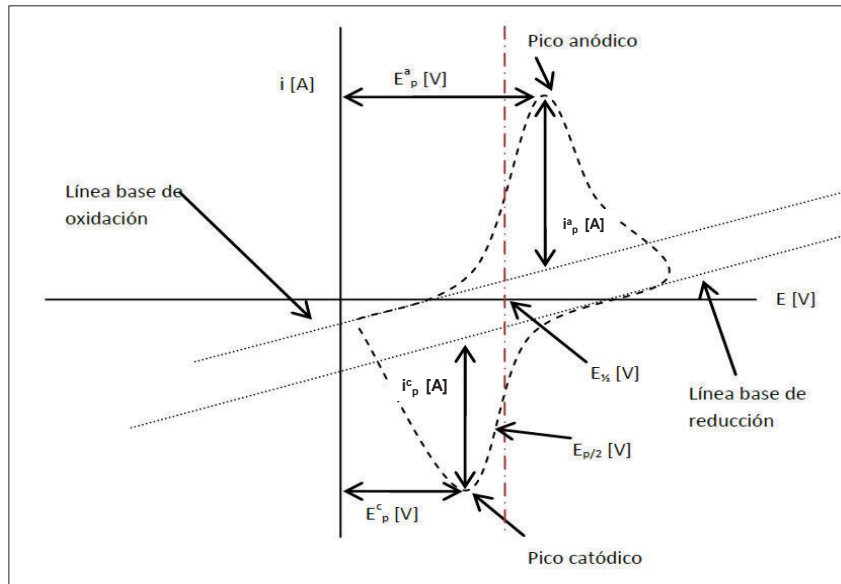
El ciclo suele darse varias veces, y los potenciales en los que acontece el cambio de la dirección de barrido reciben el nombre de potenciales de inversión (E_λ).

Los intervalos de potencial se escogen teniendo en cuenta los valores en los que se produce la oxidación o la reducción controladas por difusión de uno o varios analitos.

La respuesta consecuente se llama voltamperograma cíclico y se obtiene al graficar la corriente leída al potencial asociado, en una curva del tiempo $i=f(E)$.

En la Fig. 2.6 se muestra un ejemplo de voltamperograma donde se señalan las magnitudes físicas de este patrón de respuesta.

FIGURA 2.6 VOLTAMPEROGRAMA CÍCLICO



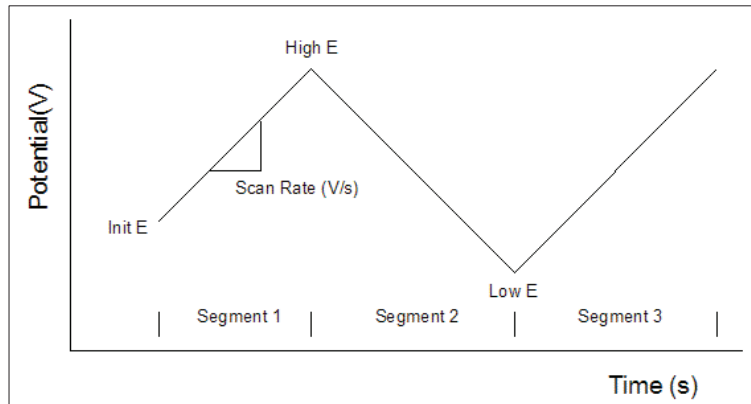
Voltograma cíclico para una especie electroactiva, E_p^a = potencial de pico anódico, E_p^c = potencial de pico catódico, i_p^a = intensidad de corriente de pico anódico, i_p^c = intensidad de corriente de pico catódico. FUENTE: Alejandro Baeza, Principios de Electroquímica.

Esta técnica permite electrolyzar una especie e invertir el potencial para comprobar la formación de su par redox, de esta forma es posible dilucidar mecanismos de reacción. Al variar la velocidad de barrido se puede estudiar la cinética de las reacciones o bien, detectar la aparición de especies intermedias en procesos redox.

Si se analiza una muestra con dos o más analitos presentes, su comportamiento es particular, por lo que el voltamperograma resultante no es necesariamente la suma de los voltamperogramas individuales de cada analito.

En la Fig. 2.7 se presenta un barrido triangular de potencial en el cual dos segmentos representan un periodo.

FIGURA 2.7 IMPOSICIÓN DE POTENCIAL EN LA VOLTAMETRÍA CÍCLICA



FUENTE: CHI Instruments 1232A

2.5.1 ECUACIONES BÁSICAS EN VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

La ecuación de Randles – Sevcik establece una proporcionalidad entre el perfil de la corriente obtenida del barrido del primer ciclo con la concentración y velocidad de barrido:

$$i_p = 0.4463 \left(\frac{F^3}{RT} \right)^{1/2} n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (2.15)$$

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_o^{1/2} v^{1/2} C_o^* \quad a (25^\circ C) \quad (2.16)$$

Donde i_p es la intensidad de corriente de pico [A], n es el número de electrones transferidos, A el área del electrodo [cm^2], D es el coeficiente de la especie electroactiva [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$], C la concentración de la especie electroactiva [$\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$], v la velocidad de barrido [$\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$].

Para un sistema reversible la gráfica de $i_p = f(v)^{1/2}$ presenta el perfil de una línea recta, cuya pendiente permite extraer información analítica importante, como el número de electrones intercambiados o el valor del coeficiente de difusión de la especie electroactiva. Cuanto más rápida es la velocidad de barrido, mayor es la intensidad de corriente de pico, mientras el sistema continúe siendo reversible; sin embargo, si la especie electroactiva se está adsorbiendo en las inmediaciones del

electrodo, la intensidad de corriente de pico es directamente proporcional a la velocidad de barrido en lugar de su raíz cuadrada. Para especies irreversibles la ecuación de Randles – Sevcik se modifica debido a la corrección de términos cinéticos y es la siguiente:

$$i_p = (2.99 \times 10^5) \alpha^{1/2} nAD^{1/2} C v^{1/2} \quad a (25^\circ C) \quad (2.17)$$

Donde α es el coeficiente de transferencia y es adimensional.

Un criterio temprano para identificar la reversibilidad de un sistema consiste en realizar el cociente de las señales de corriente anódica y catódica para diversas concentraciones o diversas velocidades de barrido. Debe cumplirse que $i_p^a/i_p^c = 1$ para una electroreducción y $i_p^c/i_p^a = 1$ para una electrooxidación, donde la corriente debida a la especie que se genera al electrodo se coloca en el numerador del cociente.

El potencial de media onda ($E_{\frac{1}{2}}$) se aproxima al valor del potencial normal condicional ($E^{0'}$) para un sistema reversible, de acuerdo a la siguiente relación:

$$E^{0'} \simeq E_{\frac{1}{2}} = \frac{(E_p^c + E_p^a)}{2} \quad (2.18)$$

La Ec. 2.18 se cumple, toda vez que los coeficientes de difusión de ambas especies sean próximos y eliminen el término logarítmico de la Ec. 2.19:

$$E_{1/2} = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_{red}^{1/2}}{D_{ox}^{1/2}} \right) \quad (2.19)$$

Los sistemas reversibles que son lo suficientemente rápidos como para mantener las concentraciones de reactivo y producto en la superficie del electrodo muestran un comportamiento típico, pues el potencial donde se manifiestan los picos anódico y catódico presentan una diferencia constante.

$$\Delta E = E_p^a - E_p^c = \frac{2.22RT}{nF} = \frac{57.0 \text{ mV}}{n} \quad (25^\circ\text{C}) \quad (2.20)$$

Los argumentos anteriores permiten calcular el término voltamperométrico $E_{p/2}$ (potencial de medio pico) para un sistema reversible, que indica una mejor estimación del punto medio entre los picos de un voltamperograma (el valor de potencial correspondiente para $i_{p/2}$). En la Ec. 2.21 el signo positivo se toma para un proceso de oxidación, mientras que el signo negativo para una reducción.

$$E_{p/2} = E_p \pm 1.09 \frac{RT}{nF} = E_p \pm \frac{28.0 \text{ mV}}{n} \quad (25^\circ\text{C}) \quad (2.21)$$

Para un sistema reversible E_p es independiente de la velocidad de barrido. Por otro lado, los sistemas irreversibles dependen de la velocidad de barrido. La siguiente relación es importante pues involucra estos dos términos, $E^{0'}$ y v .

$$E_p^c = E^{0'} - \frac{RT}{\alpha n F} \left[0.780 + \left(\ln \frac{D^{1/2}}{k^0} \right) + \ln \left(\frac{\alpha F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (2.22)$$

Las variables descritas en la Ec. 2.22 ya han sido definidas. Para un sistema electroquímico irreversible la gráfica de $E^{0'} = f(\ln v)$, para el pico anódico o catódico, genera una línea recta cuya ordenada al origen se ajusta a $E^{0'}$. La recta presenta una pendiente de $\frac{1.15RT}{\alpha n}$ o $\frac{30 \text{ mV}}{\alpha n}$ a 25°C por cada incremento de 10 en la velocidad de barrido. En estos casos el potencial de pico es una variable que no depende de la concentración del analito. Para definir el E_p^a , la función anterior toma los mismos términos, pero los sumandos cambian de signo (a excepción del $E^{0'}$). Un criterio rápido para determinar α se basa en la diferencia entre el potencial de pico (E_p) y el potencial a la mitad de la altura de pico ($E_{p/2}$).

$$|E_p - E_{p/2}| = \frac{1.857RT}{\alpha n F} = \frac{47.7 \text{ mV}}{\alpha n} \quad (2.23)$$

Existen tratamientos formales para el análisis de las curvas $i-E$ para sistemas irreversibles; sin embargo, los reportes presentan tratamientos de datos inconvenientes y tediosos.

Finalmente, existiendo funciones (para electroreducción y electrooxidación respectivamente) que permiten evaluar la constante estándar heterogénea de velocidad de transferencia de electrones, k^0 , a partir de una combinación entre la corriente de pico y el potencial normal condicional redox según la aproximación de Butler –Volmer:

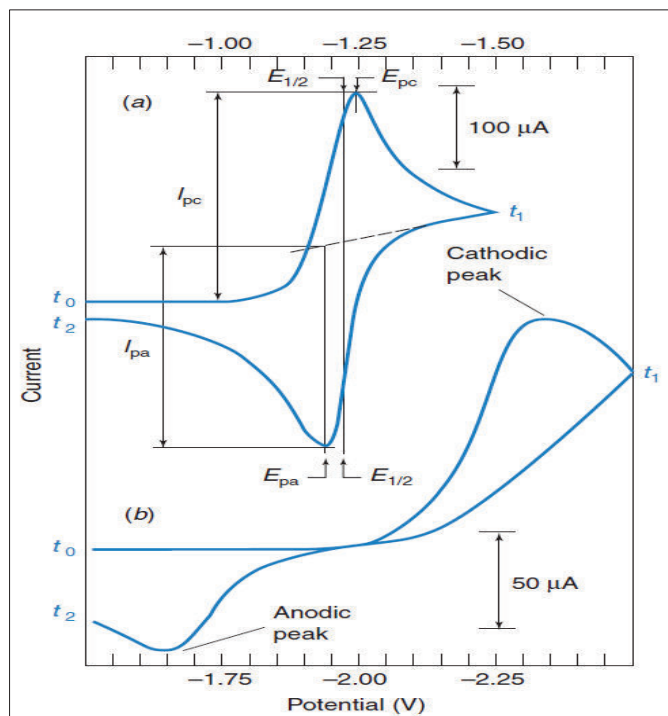
$$i_p^a = 0.227nFC_{ox}k^0 e^{[-\alpha n f (E_p - E^{o'})]} \quad (2.24)$$

$$i_p^c = 0.227nFC_{red}k^0 e^{[(1-\alpha)n f (E_p - E^{o'})]} \quad (2.25)$$

Donde, $f = \frac{F}{RT}$ en unidades de $[V^{-1}]$. Una gráfica de $\ln i_p = f (E_p - E^{o'})$ determinada a diferentes velocidades de barrido, debe producir una línea recta con pendiente $-\alpha n f$ y una intercepción proporcional a k^0 .

La señal de respuesta consecuente se llama voltamperograma cíclico y se obtiene al graficar la corriente leída al potencial asociado Fig. 2.8 , en una curva del tiempo $i = f(E)$.

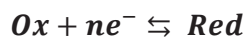
FIGURA 2.8 VOLTAMETRÍA CÍCLICA DE (a) O₂ Y (b) 2-NITROPROPANO.



Voltametría cíclica de (a) 0.1 mm de O₂ y (b) 0.06 mm de 2-nitropropano. La reacción de la curva es: O₂ + e⁻ → O₂⁻ se realizó con electrodo de mercurio (ET), Ag/AgCl (ER), a una velocidad de barrido de 100 v/s, I_{pa}= intensidad de corriente de pico anódico, I_{pc}= intensidad de pico catódico. E_{pa} y E_{pc} son los potenciales a los cuales se observa las corrientes de respuesta. **Fuente:** D. H. Evans, K. M. O'Connell. "Cyclic Voltammetry, J. Chem.Ed. 1983, 290.

2.6 CRONOAMPEROMETRÍA

En la Fig. 2.9 se observa el programa de perturbación para un experimento básico de imposición de potencial.



Donde *Ox* es la especie electrooxidada y *Red* la especie electroreducida.

Los efectos de la imposición acontecen en la interfase entre un conductor sólido y una disolución no agitada que contiene una especie electroactiva, Ox para este ejemplo. Primero se inicia desde un potencial E_1 en un valor en el cual no ocurran procesos faradáicos, es decir, no hay reacción electroquímica. Entonces se imponen pulsos de potencial próximos a un valor E_5 donde la cinética de electrorreducción de Ox es tan rápida que éste no puede coexistir al electrodo, por lo tanto la concentración de Ox en la superficie del electrodo descenderá prácticamente a cero. Se dice que E_5 se encuentra en una región limitada por la transferencia de masa, específicamente, por la difusión. El pulso se mantiene por un tiempo determinado.

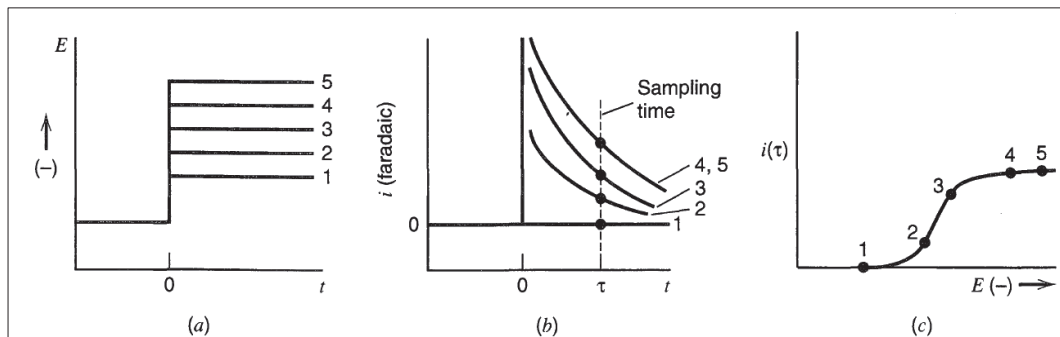
Esta condición requiere de una gran cantidad de corriente, porque ocurre instantáneamente. La corriente fluye subsecuentemente para mantener la condición reducida de Ox en la superficie del electrodo. Como consecuencia se crea un gradiente de concentración en la superficie del electrodo lo cual favorece que llegue nuevo Ox el cual debe ser reducido; sin embargo, este flujo provoca un incremento de la zona donde no hay Ox , por lo que la concentración éste al electrodo disminuye con tiempo, al igual que la corriente. La medida de la respuesta de la perturbación puede describirse por medio de la Ec. 2.26 de Cottrell para un electrodo de disco.

$$i(t) = \frac{nFA C_{ox} D_{ox}^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (2.26)$$

Donde $i(t)$ es la intensidad de corriente medida en un tiempo t , n número de moles que intervienen en la reacción, F constante de Faraday, C_{ox} concentración de la especie electroactiva, D_{ox} coeficiente de difusión de la especie electroactiva.

También puede imponerse una diferencia de potencial hasta un tiempo t_λ (tiempo de inversión), y entonces se impone otro valor de potencial.

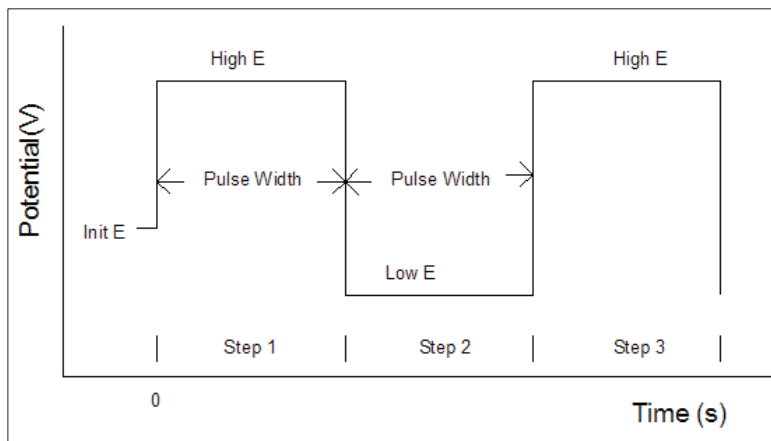
FIGURA 2.9 VARIACIÓN DE POTENCIALES CON EL TIEMPO



(a) Programa de perturbación del pulso cronoamperométrico $E_{impuesto} = f(t)$. (b) Patrón de respuesta $i_{farádica} = f(t)$. (c) Procesamiento de datos $i_{difusión} = f(E_{\tau})$. FUENTE: Electrochemical Methods, Allen J. Bard.

En el grafico xx se observa la forma en la que se aplica el potencial en función del tiempo que parte de un potencial inicial E_0 hasta un potencial E_f y se mantiene constante durante un tiempo determinado (ancho de pulso), esto constituye un paso y se puede realizar varios de ellos.

FIGURA 2.10 BARRIDO CRONOAMPEROMÉTRICO



FUENTE: CHI Instruments 1232A

Es posible ejecutar una serie de experimentos de pulsos de potencial como el mencionado anteriormente. Entre cada experimento se agita la disolución de tal manera que la condición inicial sea siempre la misma. De igual manera, se escoge

un potencial antes del pulso en el que no ocurren procesos farádicos. La diferencia entre un experimento y otro es el potencial del pulso, como se muestra en la Fig. 2.9. El pulso E_1 corresponde un potencial en el que Ox no es electroactivo y en consecuencia no se obtiene corriente farádica. Por otro lado E_2 y E_3 corresponden a potenciales en los que Ox es electroreducido, pero no tan efectivamente para que su concentración al electrodo sea cero. Los pulsos E_4 y E_5 corresponden a potenciales que están en la zona limitada por transferencia de masa ya que Ox se reduce tan rápido como la difusión lo lleva al electrodo y la corriente está limitada por este factor. Una vez que el potencial ha alcanzado estos valores de potencial extremos, la corriente no se ve influenciada por cambios en el potencial. Sin embargo, ya que en los pulso E_2 y E_3 puede coexistir cierta concentración de Ox al electrodo, las corrientes obtenidas son menores que en los pulsos E_4 y E_5 . Si se muestrea la corriente a un tiempo definido (llamado τ) se obtiene un registro del tipo $i_{difusión} = f(E_\tau)$, llamado voltamperograma de muestreo cronoamperométrico (SCV, sampled current voltammetry por sus siglas en inglés).

Este tipo de voltamperometría permite realizar un análisis interesante al aproximar la ecuación de Cottrell a un estado en que la concentración de la especie electroactiva al electrodo presenta un gradiente lineal de concentración según la Ec. 2.27 y 2.28:

$$i = -nK_{ox}[C_{ox}^* - C_{ox}^s] \quad (2.27)$$

$$i = nK_{red}[C_{red}^* - C_{red}^s] \quad (2.28)$$

Donde n es número de electrones transferidos, K_{ox} y K_{red} son constantes de proporcionalidad según los parámetros de Cottrell, C_{ox}^s es la concentración del oxidante en la superficie del electrodo, C_{red}^s es la concentración del reductor en la superficie del electrodo, C_{ox}^* concentración del oxidante en la solución, C_{red}^* concentración del reductor en la solución.

A tiempos suficientemente largos, $C^s \rightarrow 0$, entonces la corriente de oxidación y reducción estará limitada por la difusión.

$$i_{ox} = -nK_{ox}C_{ox}^* \quad (2.29)$$

$$i_{red} = nK_{red}C_{red}^* \quad (2.30)$$

Al sustituir sobre la ecuación de Nernst: $E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[Ox]}{[Red]} \right)$ se llega a la Ec. 2.31:

$$E = E^{0'} + \frac{0.06V}{n\alpha} \log \frac{i_{\tau} - i_{ox}}{i_{red} - i_{\tau}} + \frac{0.06V}{n\alpha} \log \frac{K_{red}}{K_{ox}} \quad (2.31)$$

Para una solución que contiene solo oxidante, el análisis voltamperométrico con muestreo cronoamperométrico en sentido catódico se ajusta la Ec. 2.32:

$$E = E^{0'} + \frac{0.06V}{an} \log \frac{i_{ox} - i_{\tau}}{i_{\tau}} \quad (2.32)$$

Para una disolución que contiene sólo reductor, el análisis voltamperométrico con muestreo cronoamperométrico en sentido anódico se ajusta a la Ec. 2.33:

$$E = E^{0'} + \frac{0.06V}{an} \log \frac{i_{\tau}}{i_{ox} - i_{\tau}} \quad (2.33)$$

Donde i_{τ} representa la corriente muestreada en un tiempo τ en pulso de potencial tal que la corriente no se encuentre limitada por difusión. Ambas ecuaciones reciben el nombre de ecuaciones de Heyrovský-Ilkovic para electroreducción y electrooxidación respectivamente.

La función $E = f \left(\frac{i_{\tau} - i_{ox}}{i_{red} - i_{\tau}} \right)$ es una línea recta y se utiliza como un criterio de reversibilidad pues la pendiente debe ajustarse a $m = \left(\frac{2.303 RT}{anF} \right)$

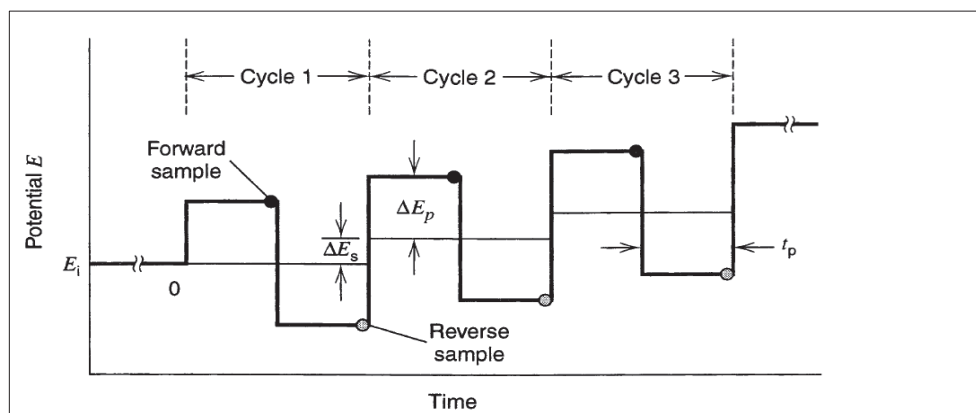
2.7 VOLTAMETRÍA DE ONDA CUADRADA

La voltamperometría se refiere a la relación de corriente con el potencial en una celda electroquímica y, en particular, la respuesta de corriente con el tiempo aplicado a un electrodo de trabajo.

Si el potencial se lo administra de forma escalonada a un valor en que los procesos farádicos sean mayores a los capacitivos y con un control adecuado del experimento, la corriente de respuesta puede ser utilizada para determinar la concentración y obtener información de una especie en solución.

La corriente es la velocidad en la que la carga pasa a través de interfaz solución – electrodo por efecto de un proceso faradaico que es una medida directa de la velocidad del proceso y ésta es proporcional a la concentración de las especies electroactivas en solución.

FIGURA 2.11 VOLTAMETRÍA DE ONDA CUADRADA (SWV)



La forma de escalera es el modo de aplicar el potencial en función del tiempo, en cada ciclo se muestrea la corriente directa señalada con un punto sólido y la corriente inversa se toma en el punto marcado de color plomo. FUENTE: Electrochemical Methods, Allen J. Bard.

La onda cuadrada se caracteriza por tener una altura de pulso, ΔE_p que se mide con respecto a la banda de rodadura correspondiente de la escalera, y un ancho de pulso t_p . Alternativamente, el ancho de pulso se puede expresar en términos de

la frecuencia de onda cuadrada $f = \frac{1}{2t_p}$. También existen los incrementos de potencial de la escalera ΔE_s en el comienzo de cada ciclo, así, la tasa de exploración $v = \frac{\Delta E_s}{2t_p} = \Delta E_s f$. La exploración comienza en un potencial inicial, E_i que se puede aplicar a un tiempo arbitrario para inicializar el sistema con libertad.

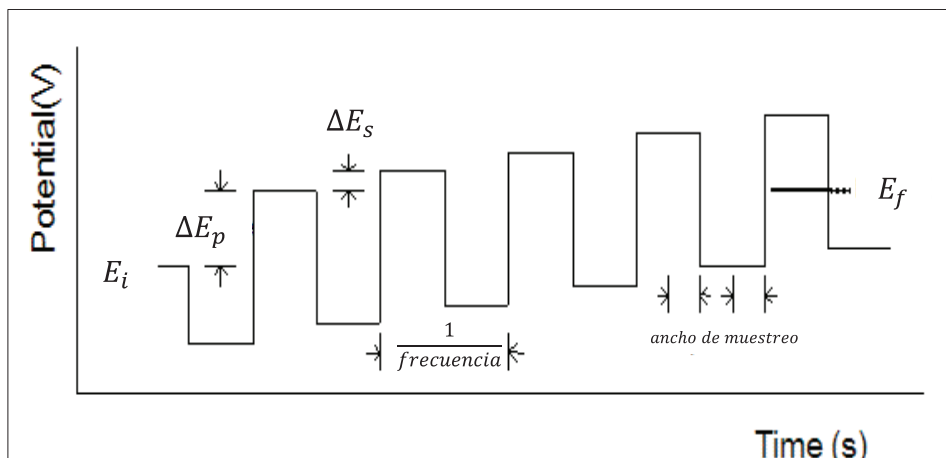
Las muestras de corriente se toman dos veces por ciclo, al final de cada impulso. La corriente directa, i_f se la toma del primer impulso de cada ciclo, que es en la dirección de la escalera. La muestra de corriente inversa i_r se toma al final del segundo impulso, que se encuentra en la dirección contraria. La diferencia de corriente Δi se la calcula como $i_f - i_r$. Hay valor diagnóstico en el avance y corrientes inversas; por lo tanto, que se conservan por separado.

En general, t_p define el tiempo de experimentación, ΔE_s fija el espaciamiento de los datos (puntos a lo largo del eje de los potenciales), estos parámetros determinan el tiempo requerido para un análisis completo.

En la práctica normal, ΔE_s es significativamente menor que ΔE_p , (Fig. 2.12) que define amplitud en cada periodo y por lo tanto determina la resolución y las características de la voltametría lo largo del eje del potencial.

Sólo t_p se varía en un amplio intervalo, según (Osteryoung & Osteryoung, 1985) típicamente entre 1-500 ms ($f = 1-500$ Hz), $\Delta E_s = 10/n$ mV y $\Delta E_p = 50/n$ mV. Con $\Delta E_p = 10$ mV y $t_p = 1-500$ ms, se procede con un barrido de 5 V/s a 10 mV/s; por tanto, un voltamograma completo es rápido en comparación con el rendimiento de la mayoría de los métodos de pulso y es comparable en duración a voltamperogramas cíclicos.

FIGURA 2.12 VOLTAMPEROGRAMA DE ONDA CUADRADA (SWV)



FUENTE: CHI Instruments model 1232A.

La emisión de la señal de corriente está gobernado por la Ec. 2.34 y 2.35

$$\delta_{(i)max} = \frac{nFAD_o^{1/2} C_o^*}{\pi^{1/2} t_{delay}^{1/2}} \left(\frac{1-\delta}{1+\delta} \right) \quad (2.34)$$

$$\delta = \exp\left(\frac{nF \Delta E}{RT} \right) \quad (2.35)$$

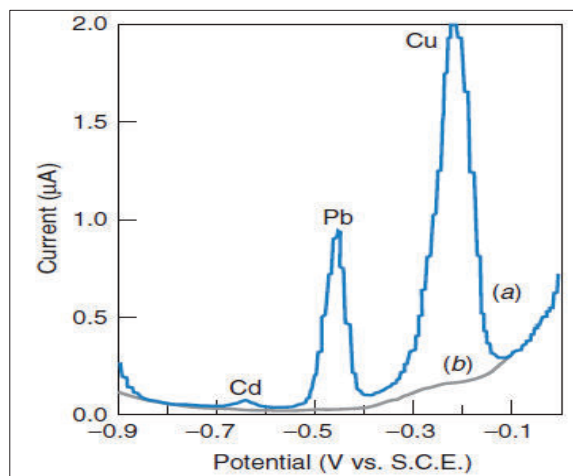
Donde $\delta_{(i)max}$ es la corriente máxima por cada ciclo, n el número de electrones que intervienen en la reacción, A es el área del electrodo, D es el coeficiente de difusión, C_o^* concentración del analito en la solución, $t_{delay}^{1/2}$ es el tiempo del pulso y δ es la frecuencia angular de modulación.

2.8 ANÁLISIS DE REDISOLUCIÓN

En el análisis de redisolución, al analito se lo preconcentra en una película delgada de Hg u otro material en el electrodo de trabajo, generalmente por electroreducción. Las especies electroactivas entonces son despojadas del electrodo mediante la inversión de la dirección del barrido de tensión. El potencial se vuelve más positivo y oxida la especie de nuevo en solución. La corriente medida

durante la oxidación es proporcional a la cantidad de analito que fue depositada. En la Fig. 2.13 se muestra un voltograma de redisolución anódica de Cd, Pb, y Cu en miel.

FIGURA 2.13 SWVAS DE Cd (II), Pb (II), Y Cu (II)



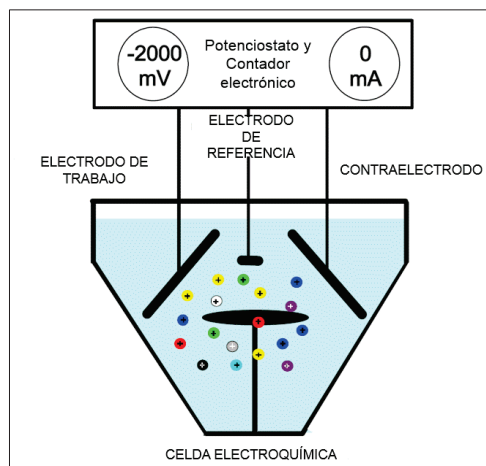
FUENTE: Daniel Harris. Análisis Químico Cuantitativo

La redisolución anódica consta de las siguientes etapas:

- ***Etapla inicial común característica de preconcentración del analito***

Sobre el electrodo de trabajo en una disolución agitada, donde se logra concentrar la especie en un volumen mucho más reducido, comparado con el volumen de la disolución, es decir, la concentración del analito es mucho mayor en la superficie del electrodo que en el seno de la disolución (Fig. 2.14). La transformación no es cuantitativa, por lo que para conseguir resultados reproducibles es necesario controlar perfectamente los parámetros hidrodinámicos como: el tiempo de concentración, agitación, temperatura, área del electrodo y potencial inicial aplicado. Esta técnica se puede usar tanto con electrodo de gota de mercurio suspendida como con ciertos electrodos sólidos.

FIGURA 2.14 CATIONES EN SOLUCIÓN ANTES DEL ANÁLISIS (ASV)

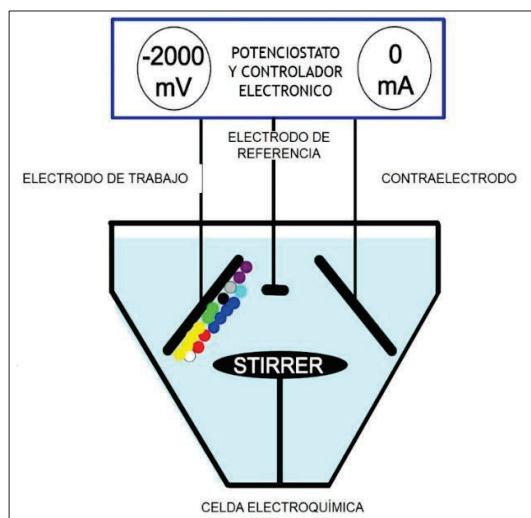


FUENTE: Voltametría de M. Jackman.

- ***Etapas de redisolución***

En la cual se determina la cantidad de analito depositado mediante un procedimiento voltamperométrico, previa redisolución del mismo por aplicación de un barrido de potenciales en sentido contrario al inicial. Este barrido puede realizarse por diversas técnicas, aunque las basadas en impulsos son las más generalizadas porque proporcionan mejores resultados Fig. 2.15 (Blanco, 2011).

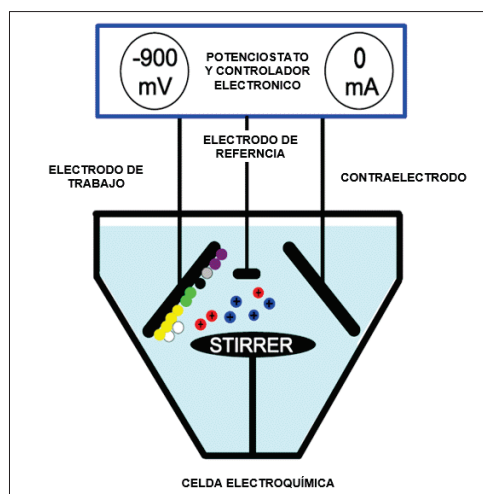
FIGURA 2.15 PARTÍCULAS PRECONCENTRADAS EN EL ELECTRODO



FUENTE: Voltametría de M. Jackman.

Si el potencial se fija por debajo del potencial de redox de un metal, éste no se reducirá sobre el electrodo. Esto se puede usar selectivamente para eliminar un metal del análisis.

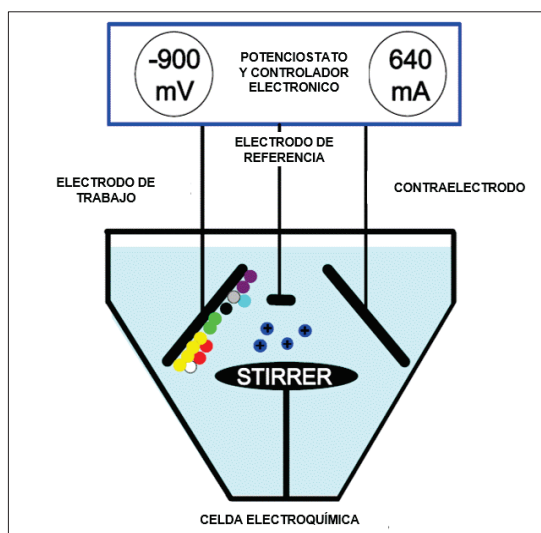
FIGURA 2.16 SELECTIVIDAD DEL ELECTRODO DE TRABAJO



FUENTE: Voltametría de M. Jackman.

Cuando el potencial de escaneado llega al potencial de redox de un metal, el metal se oxida, liberando electrones, lo cual genera una corriente Fig. 2.17.

FIGURA 2.17 OXIDACIÓN DEL ANALITO



FUENTE: Voltametría de M. Jackman.

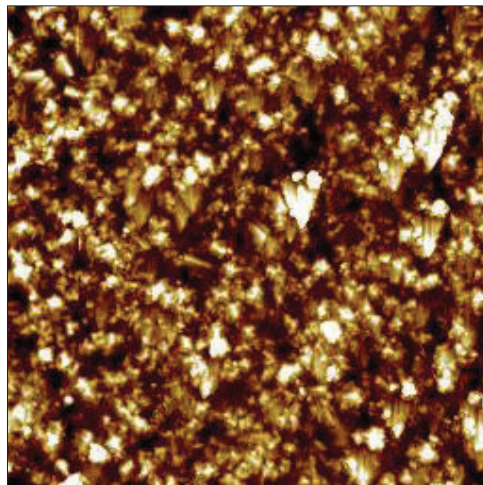
2.9 ELECTRODO DE DIAMANTE DOPADO CON BORO

El diamante con su extraordinaria estabilidad química, es un electrodo de material prometedor, tanto el diamante natural como sintético son aisladores intrínsecos (banda energética = 5,5 eV), pero adquieren conductividad eléctrica sobre el dopaje por aceptores tales como boro.

Otra ruta a la conducción controlada, que van desde diamante puro a grafito, se puede inducir en diamante mediante implantación iónica, a expensas de la estabilidad. El diamante dopado con boro es un tipo p-semiconductor, aunque el mecanismo detallado de la conductancia, la naturaleza de la impureza (aceptor), y de transferencia de electrones todavía no están claras. En contraste con la extensa historia de materiales de carbono (grafito, carbonos vítreos, etc.). En consecuencia gran parte queda por caracterizar y comprender la interacción de la física, química y propiedades electroquímicas (Vinokur, Miller, Avyigal, & Kalish, 1996).

La técnica de preconcentración química al vapor (CVD) es muy conveniente para la preparación de electrodos en el laboratorio y la industria, y puede ser considerado como de bajo costo en gran escala producción, sin embargo existen otros de diamante modificados, que merecen el interés del investigador, incluso del académico. Estos son obtenidos a alta temperatura y alta presión (HTHP) con monocristales (Yu. V. Pleskov et al., 2002), con vacío templado de microcristales de diamante (Pleskov, Krotova, Ralchenko, Khomich, & Khmel'nitskiy, 2003), diamante nanocristalino (Pleskov et al., 2012), carbono tipo diamante dopado con nitrógeno (Yu V. Pleskov, M. D. Krotova, et al., 2002) o metales (Pleskov, Evstefeeva, & Baranov, 2002). Cada material tiene sus ventajas y desventajas y deben encontrar su nicho en la ciencia o industria.

Las propiedades electroquímicas del electrodo de diamante dopado con boro (BDD) están influenciados por varios factores, tales como el nivel de dopaje, orientación cristalográfica, terminación de la superficie, morfología, e impurezas de carbono sp^2 que se depositan sobre una superficie.

FIGURA 2.18 MICROGRAFÍA POR AFM DE BDD

ELABORADO POR: Jorge Tafur

La superficie del diamante se termina naturalmente por heteroátomos por ejemplo, por el hidrógeno o el oxígeno, pero las modificaciones electroquímicas también han sido dirigidas y modificadas por aplicaciones fotoelectroquímicas. Dipolos C-H o C-O en H-Terminales (HT) u O-Terminales (OT) causan afinidad electrónica negativa o positiva respectivamente Rao Et Al (Rao, Tryk, Hashimoto, & Fujishima, 1999). Informó por primera vez que el diamante HT se puede convertir a OT por oxidación electroquímica en soluciones de electrolitos acuosos.

El diamante OT ha cambiado positivamente los planos de potencial y el inicio de la evolución de hidrógeno fotocatódico en consistencia con el movimiento de borde de banda hacia potenciales positivos (en escala electroquímica). Las propiedades electroquímicas de los diamantes con terminaciones superficiales identificados han sido cuidadosamente estudiados en el pasado. Sin embargo, se sabe menos sobre electrónica y cambios estructurales que se producen durante el tratamiento electroquímico de electrodos de BDD, especialmente a altas sobretensiones(Kavan et al.).

2.10 MÉTODOS ANALÍTICOS ADECUADOS A SU PROPÓSITO

2.10.1 VALIDACIÓN DE UN MÉTODO

Se puede interpretar para la validación de un método como el proceso de definir una necesidad analítica y confirmar que el método en cuestión tiene capacidades de desempeño consistentes con las que requiere la aplicación. Está implícita la necesidad de evaluar las capacidades de desempeño del método. El criterio de la “conveniencia” del método es importante; en el pasado la validación del método tendía a concentrarse sobre el proceso de evaluación de los parámetros de desempeño (Brieve, 1998).

Se tiene que tener muy en cuenta los conceptos básicos que conforman un sistema de validación que se definen a continuación:

2.10.2 LÍMITE DE DETECCIÓN

Cuando se realizan mediciones a niveles bajos del analito o de la propiedad relacionada, como en el análisis de trazas, es importante saber cuál es la concentración más baja del analito o el valor de su propiedad relacionada, que puede detectarse confiablemente por el método (Brieve, 1998). La importancia de determinar esto y los problemas implícitos, surgen del hecho que la probabilidad de detección no cambia repentinamente de cero a la unidad cuando se cruza un umbral se determina de acuerdo a la Ec. 2.36.

$$L_0D = \bar{x} + 3s \quad (2.36)$$

Donde L_0D es el límite de detección \bar{x} es la media de 10 concentraciones de muestras fortificadas s es la desviación estándar de la muestr.

2.10.3 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El “límite de cuantificación“(LoQ) estrictamente es la concentración más baja del analíto que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad. También se define por diversas convenciones como la concentración del analíto correspondiente al valor del blanco de muestra más 5, 6 ó 10 desviaciones estándar de la media del blanco. Algunas veces también se conoce como “límite de determinación”. LoQ es un valor indicativo y no deberá usarse en la toma de decisiones Ec. 2.37

$$L_oQ = \bar{x} + 10s \quad (2.37)$$

2.10.4 INTERVALO DE TRABAJO E INTERVALO LINEAL

Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analíto o los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse. Note que esto se refiere al intervalo de concentraciones o a los valores de la propiedad relacionada, de las disoluciones medidas realmente más que de las muestras originales.

En el extremo inferior del intervalo de concentración, los factores limitantes son los valores del límite de detección y/o cuantificación. En el extremo superior del intervalo de concentración, las limitaciones serán impuestas por varios efectos que dependen del sistema de respuesta del instrumento (Brieve, 1998).

2.10.5 EXACTITUD

La “exactitud” expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero. La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados. Normalmente la exactitud se estudia en dos componentes: la “veracidad” y la “precisión”. La veracidad (de un método) es una expresión de que tan cercana se

encuentra la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) respecto del valor real.

Normalmente, la veracidad se expresa en términos de sesgo. La “precisión” es una medida de que tan cercanos están los resultados unos con respecto a los otros y por lo general se expresa mediante medidas tal como la desviación estándar la cual describe la dispersión de los resultados. Adicionalmente, una expresión cada vez más común de exactitud es la “incertidumbre de medición”, la cual proporciona una figura única de expresión de la exactitud. Estos tres diferentes parámetros serán discutidos en su momento (Brieve, 1998).

2.10.6 VERACIDAD

La evaluación práctica de la veracidad se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, la veracidad se determina contra un valor de referencia (o sea, un valor verdadero o un valor verdadero convencional). Se dispone de dos técnicas básicas: la verificación con respecto a los valores de referencia de un material caracterizado o de otro método caracterizado. Los valores de referencia son idealmente trazables a patrones internacionales. Los materiales de referencia certificados por lo general se aceptan como medio de proveer valores trazables y por lo tanto, el valor de referencia es el valor certificado del MRC (Brieve, 1998).

2.10.7 PRECISIÓN

Normalmente, la “precisión” se determina para circunstancias específicas las cuales en la práctica pueden ser muy variadas. Las medidas de precisión más comunes son la “reproducibilidad” (Ec. 2.38) y la “repetibilidad” (Ec. 2.39). Éstas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse. La repetibilidad (la precisión más pequeña esperada) dará una idea de la clase de variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, con un

equipo en un período corto de tiempo, es decir, es la clase de variabilidad que se espera entre resultados cuando una muestra se analiza por duplicado.

$$DCMB = \frac{SDCB}{a-1} \quad (2.38)$$

$$DCMW = \frac{SDCW}{N-a} \quad (2.39)$$

Donde, $SDCB$, la diferencia cuadrada media entre tratamientos, a , el número de tratamientos, $SDCW$, la diferencia cuadrada media entre repeticiones, N , el número de repeticiones.

2.10.8 REPETIBILIDAD

A partir de la desviación estándar de repetibilidad σ_r , o s_r , es útil calcular el límite de repetibilidad “ r ”, el cual permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre análisis duplicados de una muestra determinados bajo condiciones de repetibilidad.

2.10.9 LÍMITE DE REPETIBILIDAD “ r ”

El valor menor o igual a aquél de la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba individuales, obtenidos bajo condiciones de repetibilidad, el cual se espera con una probabilidad de 95% según la Ec. 2.40:

$$r = t_{\infty, \sqrt{2}} * \delta_r \quad (2.40)$$

Donde $t_{\infty,}$ es el valor de Student en dos sentidos para $\nu = \infty$ a una confianza dada (el nivel de confianza normal establecido es de 95% cuyo valor es 1,96), y δ_r es la desviación estándar medida bajo condiciones de repetibilidad.

2.10.10 REPRODUCIBILIDAD

A partir de la desviación estándar de reproducibilidad σ_R , o s_R , es útil calcular el límite de reproducibilidad “R”, el cual permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre análisis duplicados de una muestra determinados bajo condiciones de reproducibilidad.

2.10.11 LÍMITE DE REPRODUCIBILIDAD “R”

El valor menor o igual a aquél de la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba individuales, obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad, el cual se espera con una probabilidad de 95%. (El límite de) la reproducibilidad se da por la fórmula:

$$R = t_{\infty, \sqrt{2}} * \delta_R \quad (2.41)$$

2.10.12 INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN

La incertidumbre de medición es un parámetro único (usualmente una desviación estándar o un intervalo de confianza) que expresa el intervalo de posibles valores sobre la base de los resultados de medición. Una estimación de la incertidumbre de medición considera todos los efectos reconocidos que influyen en el resultado; las incertidumbres asociadas a cada efecto son combinadas de acuerdo a procedimientos bien establecidos.

$$\mu_{c_2} = \sqrt{\mu_{c_1}^2 C_{c_1}^2 + \mu_{v_1}^2 C_{v_1}^2} \quad (2.42)$$

Donde, μ_{c_2} es la incertidumbre del método, μ_{c_1}, μ_{v_1} son las incertidumbres de las componentes analizadas, C_{c_1}, C_{v_1} son los coeficientes de sensibilidad de las componentes analizadas.

2.10.13 SENSIBILIDAD

Ésta es efectivamente la pendiente de la curva de respuesta, es decir, el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analíto.

2.10.14 RECUPERACIÓN

Los métodos analíticos no siempre miden todo el analíto de interés presente en la muestra. Los analítos pueden estar presentes en una variedad de formas en las muestras de las cuales no todas son de interés para el analista. El método debe entonces diseñarse deliberadamente para determinar solamente una forma específica del analíto. No obstante, la incapacidad de un método para determinar todo el analíto presente puede reflejar un problema inherente. De cualquier forma, es necesario evaluar la eficiencia del método para detectar todo el analíto presente.

$$\% \textit{Recuperación} = \left[\frac{CF - CU}{CA} \right] * 100 \quad (2.43)$$

Donde, **CF** es la concentración del analíto en la muestra fortificada, **CU** es la concentración del analíto de la muestra sin fortificar, **CA** es la concentración del analíto añadido.

2.10.15 ERROR DE MEDICIÓN

El resultado de una medición menos el valor verdadero del mensurando. Puesto que un valor verdadero no puede determinarse, en la práctica se utiliza un valor verdadero convencional.

2.10.16 ERROR ALEATORIO

Resultado de una medición menos la media que resultaría de un número infinito de mediciones del mismo mensurando realizadas bajo condiciones de repetibilidad.

2.10.17 ERROR SISTEMÁTICO

Media que resultaría de un número infinito de mediciones del mismo mensurando realizadas bajo condiciones de repetibilidad menos un valor verdadero del mensurando.

2.10.18 ESPECIFICIDAD

Es la capacidad de un método para medir solamente lo que se pretende que mida. La especificidad es la capacidad de determinar el analito inequívocamente en presencia de componentes los cuales se espera que estén presentes. Comúnmente, esto puede incluir impurezas, degradantes, matriz, etc.

2.10.19 TRAZABILIDAD

Propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón por medio de la cual éstos pueden ser relacionados, con una incertidumbre determinada, a referencias establecidas, generalmente patrones nacionales o internacionales, a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones.

CAPITULO 3

DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 REQUISITOS ANALÍTICOS

Frente a un problema analítico particular, el laboratorio debería en primer lugar, acordar con el cliente una necesidad analítica la cual define los requisitos de desempeño que un método debe tener para ser adecuado y resolver un problema analítico (determinación de una metodología para identificar y cuantificar un analito).

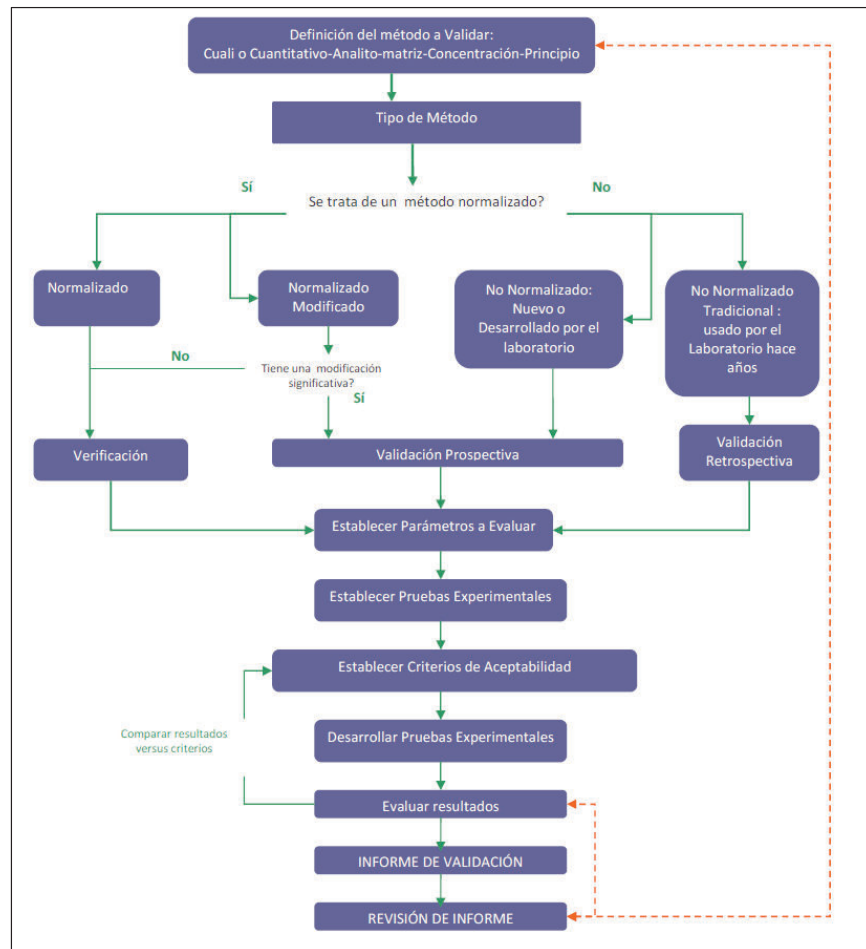
En respuesta a esta necesidad, el laboratorio puede evaluar si los métodos existentes son adecuados o si es necesario desarrollar un nuevo método (Brieve, 1998). En la Fig. 3.1 se clasifican los métodos de partida para realizar validaciones retrospectivas, prospectivas o verificaciones. La validación del presente estudio se basa en un método no normalizado y nuevo para el laboratorio.

La verificación, tiene generalmente como objetivo, el comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y lo utiliza correctamente, en caso de tratarse de un método normalizado modificado para la verificación se requiere solo realizar aquellas pruebas que indiquen que la variación realizada no afecta el ensayo.

En ocasiones, lo que se busca a través de una validación es demostrar que un método es equivalente a otro.

El objetivo de la validación y la verificación, es demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar, así, como también demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados por este entregado.

FIGURA 3.1 TIPOS DE MÉTODOS A VALIDAR



FUENTE: (Duffau, Guerrero, Roa, & Rodríguez, 2010)

3.2 NECESIDAD ANALÍTICA DE Pb (II), Cd (II) Y Hg (II)

El plomo, cadmio y mercurio están muy dispersos en el medio ambiente, y la exposición a cualquiera de estos elementos pueden dar lugar a una serie de efectos adversos para la salud debido a su toxicidad y posterior acumulación en múltiples órganos del cuerpo humano (Daher, 1995).

Estos metales son nefrotóxicos en niveles altos de concentración, y pueden interaccionar de manera aditiva o sinérgica entre sí o con otros metales pesados cuyos efectos tóxicos pueden resultar graves, incluso expuestos en niveles bajos.

Son escasos los estudios de toxicidad que se han realizado de cada metal en forma aislada, por lo general se lo realiza de un grupo de metales pesados (Trzeciakowski et al., 2014).

3.2.1 FUENTE DE EXPOSICIÓN DE Pb (II)

El plomo es un metal pesado, xenobiótico que no tiene ninguna función fisiológica conocida para los seres humanos. El plomo se absorbe principalmente a través del tracto gastrointestinal y los pulmones, después de la ingestión o inhalación. La mayoría de fuentes ambientales significativas de plomo son: la pintura a base de plomo, gasolina, agua potable, alimentos, suelo y polvo. Fuentes ocupacionales de exposición al plomo incluyen personas que trabajan como fontaneros, mineros que explotan plomo, los talleres de reparación de automóviles, trabajadores de la construcción, personas que laboran en la industria del caucho, plástico y fabricas que elaboran baterías(Daher, 1995).

Las instituciones encargadas de los programas de reducción de plomo, además de la eliminación de la gasolina con plomo, estudia el impacto directo en la protección de las personas, y en particular los niños, a partir de los peligros de la exposición al plomo (Daher, 1995).

Se sabe que el plomo afecta adversamente a muchos sistemas del cuerpo- hematopoyético, vascular, renal, cardiovascular, inmunológico, gastrointestinal, endocrino, al sistema nervioso central y reproductivo. Los niveles de plomo mayores a 55 pg/dL de sangre pueden causar la muerte, lesiones cerebrales, deficiencia renal, convulsiones y anemia. La anemia por desnutrición plantea una particular amenaza a un niño expuesto al plomo. Cuando hay un suministro inadecuado de calcio, fósforo y hierro en la dieta de un niño, el plomo se absorbe más fácilmente (Daher, 1995).

Sin embargo, los niños que contienen altos niveles de plomo en la sangre son asintomáticos, es por esto que el envenenamiento por plomo en niños tiene un efecto muy sutil, además puede causar déficits en el rendimiento cognitivo-neuroconductual, éstos déficits incluyen disminución del coeficiente intelectual (IQ), trastornos de conducta y problemas de audición que se han asociado con niveles de plomo a concentraciones tan bajas como 10 pg / dL de sangre (Gumpu et al., 2015).

3.2.2 FUENTE DE EXPOSICIÓN DE Cd (II)

El cadmio se encuentra naturalmente en las rocas y suelos asociados a minerales como cinc, plomo y cobre, las fuentes antropogénicas incluyen la extracción de cadmio como producto secundario durante la explotación de minerales tales como: cinc, plomo y cobre. El cadmio es liberado al suelo, al agua y al aire durante la extracción y refinación de metales no ferrosos, la manufactura y aplicación de abonos de fosfato, la quema de combustibles fósiles, y la disposición e incineración de basura, aumentan la cantidad de cadmio en organismos acuáticos y en cosechas agrícolas. Para los fumadores, el tabaco es una fuente importante de exposición al cadmio. (Gumpu et al., 2015).

La absorción de compuestos de cadmio varía mucho dependiendo de las especies químicas y tamaño de partícula. La tasa de absorción de cadmio en la sangre por inhalación en una persona adulta está en el rango de 2-7%. Una tasa entre el 25 y el 50% se ha estimado para vapores de óxido de cadmio. El cadmio existe en forma de ion hidratado o como complejo iónico asociado a otras sustancias inorgánicas u orgánicas. Las formas de cadmio solubles se movilizan en el agua. Las formas insolubles son inmóviles y se depositarán en el sedimento donde serán adsorbidas. (Gumpu et al., 2015).

El 90% de cadmio circundante en la sangre se une a los eritrocitos. En caso de inhalación o absorción gastrointestinal, el cadmio es concentrado principalmente en el riñón en un 50%, donde su vida media supera los 10 a 20 años y también se

concentra en el hígado en un 15%, en los pulmones y tracto gastrointestinal en menor medida. El cadmio reside en estos tejidos hasta comenzar un daño renal, que conduce a un mal funcionamiento del riñón y del hígado. Las formas químicas de cadmio en los tejidos se puede dividir principalmente en dos grupos: la metalotioneína (MT) y la no-metalotioneína (N-MT), el cadmio se acumula en el cuerpo principalmente como MT grandes cantidades de éste se transforman posteriormente en su forma tóxica N-MT donde el riñón pierde la capacidad de metabolizarlo y se genera un grave daño en su tejido (Daher, 1995).

3.2.3 FUENTE DE EXPOSICIÓN DE Hg (II)

El Mercurio cumple una serie de requisitos que lo vuelven sujeto de la atención por parte de salud pública, tiene un significativo peligro (datos de toxicidad, ecotoxicidad importantes), la exposición de la población es amplia y diversa, incluyendo situaciones laborales y generales; es creciente la preocupación respecto de la dispersión de su uso y de los mecanismos posibles de prevención (Bonsignore et al., 2016).

El Mercurio es un elemento que está presente en forma natural en la corteza de la Tierra en la que se lo encuentra comúnmente como sulfuro (Cinabrio – HgS, más de 80% de Mercurio), con frecuencia como rojo de cinabrio y con menos abundancia como metal cinabrio negro. Es frecuente que los minerales de mercurio contengan pequeñas gotas de mercurio metálico (Bonsignore et al., 2016).

El mercurio, presente de forma natural en la corteza terrestre, puede provenir de la actividad volcánica, la erosión de las rocas o la actividad humana. Esta última es la principal causa de las emisiones de mercurio, procedentes sobre todo de la combustión de carbón en centrales eléctricas, calefacciones, procesos industriales de incineración de residuos y de la extracción minera de mercurio, oro y otros metales (Laffont et al., 2015).

Una vez liberado el mercurio al medio, ciertas bacterias pueden transformarlo en metil-mercurio (M-Hg). Este se acumula entonces en peces y mariscos (se entiende por bioacumulación una concentración de la sustancia más elevada en el organismo que en su entorno). El metil-mercurio pasa también por un proceso de bioamplificación. Los grandes peces depredadores, por ejemplo, tienen más probabilidades de presentar niveles elevados de mercurio por haber devorado a muchos peces pequeños que a su vez lo habrán ingerido al alimentarse de plancton (Laffont et al., 2015).

Aunque las personas pueden verse expuestas a cualquiera de las formas de mercurio en diversas circunstancias, las principales vías de exposición son el consumo de pescado y marisco contaminados con metil-mercurio y la inhalación por ciertos trabajadores de vapores de mercurio elemental desprendidos en procesos industriales. El hecho de cocinar los alimentos no elimina el mercurio presente en ellos (Bonsignore et al., 2016).

Desafortunadamente, el uso de Hg a menudo se relaciona con el daño ambiental y con episodios de intoxicación asociados a humanos, uno de los principales compuestos que contiene mercurio es el metil-mercurio organometálico (M-Hg), que se ingiere principalmente a través de una dieta de mariscos, es la forma de mercurio más peligroso debido a su alta solubilidad en lípidos, puede tener efectos adversos en el hígado, órganos reproductivos, sistema nervioso central y periférico. Además, la capacidad del M-Hg de atravesar la barrera placentaria representa un riesgo peligroso para el correcto desarrollo del feto (Bonsignore et al., 2016).

En el otro lado, la exposición al mercurio metálico (Hg^0) y el mercurio inorgánico (I-Hg) se asocian generalmente con enfermedades cerebrales y renales. Estas formas de mercurio una vez ingeridas se absorben rápidamente en la hemoglobina de la sangre y se distribuyen a los tejidos especialmente del cerebro (Bonsignore et al., 2016).

3.2.4 OBJETIVOS DE VALIDACIÓN PARA Pb (II), Cd (II) Y Hg (II)

Los parámetros y los valores definidos en los objetivos de validación se los seleccionó con base a trabajos y publicaciones relacionadas con la capacidad de desempeño del método así como también en las necesidades que tiene el laboratorio (CICAM) de prestar servicios de análisis a sus clientes (ver TABLA 3.1).

TABLA 3.1 OBJETIVOS DE VALIDACIÓN PARA Pb (II), Cd (II) Y Hg (II)

Título	Determinación de plomo, cadmio y mercurio en presencia de zinc, cobre y talio en aguas estancadas de minas abandonadas y aguas limpias mediante voltametría de redisolución anódica.
Alcance	Determinar plomo (II) cadmio (II) y mercurio (II) en aguas residuales de origen minero, por voltametría de redisolución anódica, tamaño de muestra 20 mL.
PARÁMETRO	VALOR
Selectividad / Especificidad	Pb (II), Cd (II), Hg (II)
Linealidad / Función respuesta	$R^2 > 0,99$
Límite de detección	0,005 mg/L
Límite de cuantificación	0,010 mg/L
Veracidad (sesgo)	Aceptable / No aceptable
Precisión (repetibilidad, reproducibilidad)	$CVR \leq 15\%$ $CVR \leq 20\%$
Exactitud (incertidumbre de medida)	$\leq 35\%$
Intervalo de trabajo	0,010 – 0.02 mg/L

ELABORADO POR: Jorge Tafur

El método de ensayo a validar tiene que ser específico para Pb(II), Cd(II) y Hg(II), para lo cual se cuenta con estándares certificados de dichos metales los cuales permiten comprobar especificidad.

La linealidad no puede ser aceptada más allá de dos nueves debido a que las concentraciones son muy diluidas y la estabilidad del método es muy variable.

Los límites de detección y cuantificación se los define en base a los parámetros descritos en el Texto Unificado de Legislación Secundaria del Medio Ambiente

(TULSMA) en el anexo I del libro VI (Norma Calidad Ambiental y Descarga de Efluentes al Recurso Agua) TABLA 3.2.

TABLA 3.2 LÍMITES DE DESCARGA A UN CUERPO DE AGUA DULCE

Parámetro	Expresado como	Unidad	Límite Máximo Permisible
Plomo	Pb	mg/L	0.2
Cadmio	Cd	mg/L	0.02
Mercurio Total	Hg	mg/L	0.005

FUENTE: TULSMA

Se plantea alcanzar límites de detección alrededor de los 5 ppb ($\mu\text{g/L}$) que es valor más bajo en la determinación de mercurio.

Los límites de repetibilidad y reproducibilidad se los especificó mediante el coeficiente de variación definido por W. Horwitz (Ver ANEXO7), quien reunió una serie de datos (provenientes de 150 ensayos de interlaboratorios organizados por AOAC), en los que observó que el coeficiente de variación de los valores medios dados por los diferentes laboratorios aumentaba a medida que disminuía la concentración del analito según la Ec. 3.1.

$$CV = 2^{(1-0.5\log C)} \quad (3.1)$$

Donde, **CV** es el coeficiente de variación, **C** es la concentración del analito expresado en potencia de diez. Ver TABLA 3.3

TABLA 3.3 COEFICIENTES DE VARIACIÓN (HORWITZ)

% de Concentración (P/P)	Unidad	Razón (Potencia de 10)	% CV
100	100%(100g/100g)	1	2.0
10	10 g/100g	10 ⁻¹	2.8
1	1 g/100g	10 ⁻²	4.0
0.1	0.1 g/100g	10 ⁻³	5.6
0.01	100 mg/Kg	10 ⁻⁴	8.0
0.001	10 mg/Kg	10 ⁻⁵	11.0
0.0001	1 mg/Kg	10 ⁻⁶	16.0
0.00001	100 µg/Kg	10 ⁻⁷	23.0
0.000001	10 µg/Kg	10 ⁻⁸	32.0
0.0000001	1 µg/Kg	10 ⁻⁹	45.0

ELABORADO POR: Jorge Tafur

La incertidumbre típica para concentraciones en el orden de µg/L es igual o inferior al 30% según (Brieve, 1998).

El rango de validación escogido es de 10 a 20 µg/L debido a que se tiene que trabajar a las concentraciones más bajas posibles, dicho rango de validación puede cambiar según el comportamiento del método en la determinación del límite de detección y cuantificación.

3.2.5 PRINCIPIO DEL MÉTODO (SWVAS)

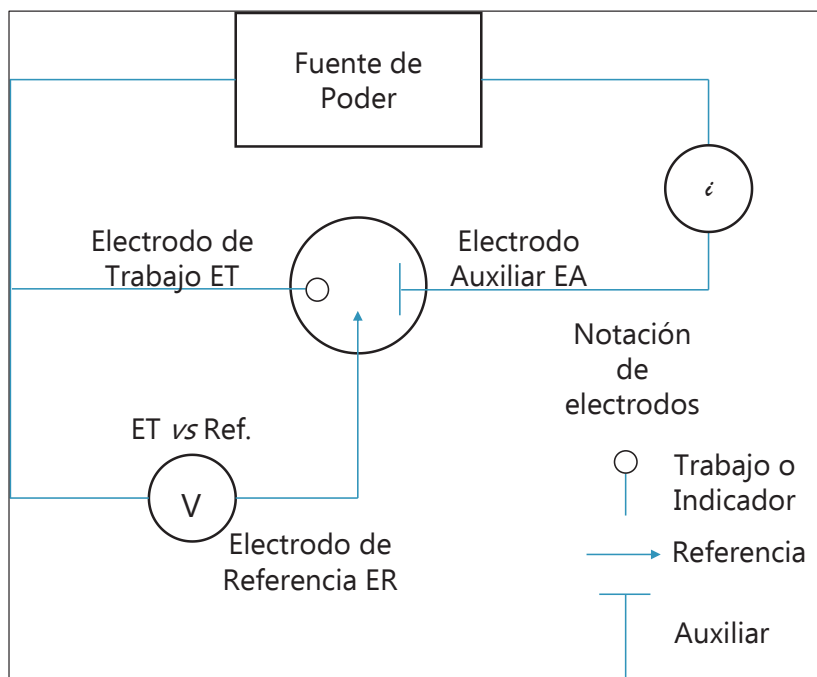
3.2.5.1 Pb (II), Cd (II) y Hg (II)

La voltamperometría se refiere a la relación que existe entre la corriente y un determinado potencial aplicado y controlado en un lapso de tiempo definido.

El potencial se manipula a través de un potencióstato que es el dispositivo electrónico requerido para controlar una celda de tres electrodos (Fig. 3.2) y ejecutar la mayoría de los experimentos electroanalíticos (Osteryoung & Osteryoung, 1985).

El analito a analizar debe estar contenido en un medio de soporte o electrolito que facilite el paso de corriente eléctrica, es decir que aumente la conductividad y disminuya la resistencia del medio, dependiendo del analito y la técnica a aplicar se puede utilizar ácido nítrico, clorhídrico, sulfúrico, acetato de amonio, ácido acético, etc.

FIGURA 3.2 ESQUEMA DE UNA CELDA DE TRES ELECTRODOS



FUENTE: Métodos Electroanalíticos. Bard, Allen J.

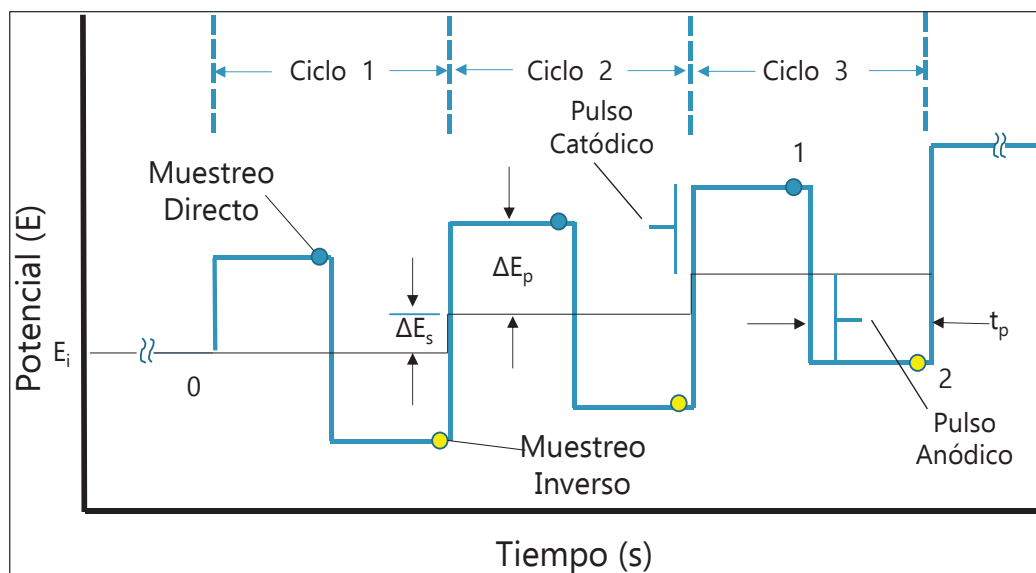
La celda electroquímica a utilizar está compuesta por tres electrodos: electrodo de trabajo (ET) cuyo material es de diamante dopado con boro (BDD), electrodo de referencia (ER) que es de Ag/AgCl, y electrodo auxiliar (EA) compuesto por grafito.

En la superficie del electrodo de trabajo tendrá lugar el proceso electroquímico que queremos estudiar. Para ello aplicamos una diferencia de potencial eléctrico entre el ET y el ER de tal forma que podamos forzar procesos de oxidación o reducción. La función del electrodo auxiliar es conseguir que la corriente eléctrica circule entre el ET y el EA evitando que pase por ER (Bard & Faulkner, 2000).

Aunque existen diferentes tipos de voltamperometría, una de las más utilizadas para el análisis de metales pesados en aguas es la voltametría de redisolución, que puede ser anódica o catódica, (que en nuestro estudio será anódica), la cual también puede diferir en el modo de la aplicación del potencial que se ingresa en el potencióstato

El perfil de voltaje más eficaz para una voltametría, es la llamada voltametría de onda cuadrada que utiliza la forma de onda representada en la Fig. 3.3, que consiste en una onda cuadrada superpuesta a una de tipo escalera. Durante cada impulso catódico llega un aporte brusco de analito, que se reduce en la superficie del electrodo (Harris, 2007).

FIGURA 3.3 PERFIL DE VOLTAJE DE LA SWV



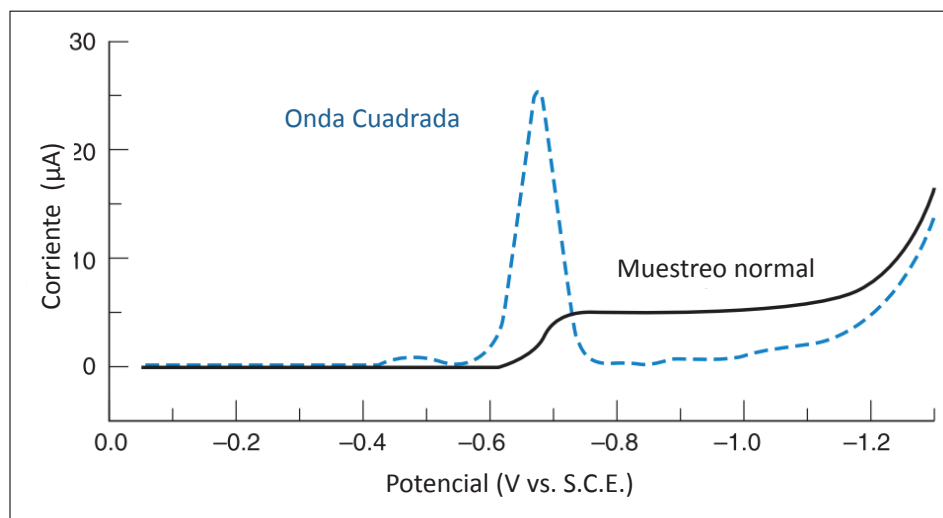
ELABORADO POR: Jorge Tafur

FUENTE: Métodos Electroanalíticos. Bard, Allen J.

Durante el impulso anódico el analito que acaba de reducirse se reoxida. El voltamperograma de onda cuadrada de la Fig. 3.4 es la diferencia de corrientes entre el intervalo 1 y 2 de la Fig. 3.3. Los electrones van desde el electrodo hacia el analito en el punto 1 y en dirección contraria en el punto 2. Dado que las dos

corrientes tienen signos opuestos su diferencia es mayor que cualquiera de las dos corrientes por separado (Harris, 2007).

FIGURA 3.4 DIFERENCIA DE CORRIENTES ANÓDICA Y CATÓDICA



FUENTE: Química Analítica Cuantitativa. Daniel C. Harris

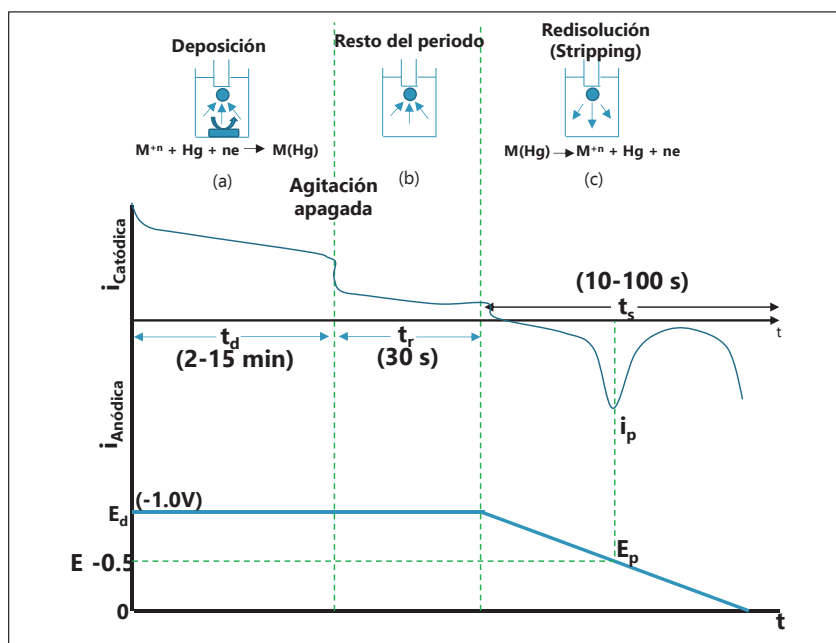
La señal en voltametría de onda cuadrada aumenta con relación a la diferencia de corriente registrada por el potencióstato, y la onda adquiere forma de pico. La señal aumenta porque el producto reducido de cada impulso catódico está situado justo en la superficie del electrodo esperando ser oxidado por el siguiente impulso anódico (Harris, 2007).

Dependiendo del carácter reductor u oxidante del electrodo durante la etapa de redisolución se habla de redisolución catódica o anódica. En los métodos de redisolución anódica el electrodo se comporta como un cátodo durante la etapa de preconcentración y como un ánodo durante la etapa de redisolución, mientras que en la de voltamperometría de redisolución catódica ocurre lo contrario.

La voltametría de redisolución anódica es una técnica electroquímica que se utiliza principalmente con fines analíticos en la determinación de metales electroactivos que desde estados oxidados pueden ser reducidos a sus formas metálicas. Esta técnica es muy útil ya que tiene un límite de detección muy pequeño de aproximadamente 10^{-9} hasta 10^{-10} M (Bard & Faulkner, 2000).

Experimentalmente, la voltametría de redisolución anódica puede separarse en 3 etapas (Fig. 3.5), en la primera etapa, se aplica un potencial de electrólisis controlado lo que junto con una constante agitación provoca que el analito sea depositado en el electrodo. Esto es posible ya que los iones metálicos en solución son extraídos electroquímicamente y se produce una preconcentración de la muestra en el electrodo.

FIGURA 3.5 PROCESO DE SWVAS



FUENTE: Química Analítica Cuantitativa. Daniel C. Harris

Para facilitar este proceso se utilizará un electrodo de Diamante Dopado con Boro depositado sobre éste un film de mercurio, ya que muchos analitos (entre ellos Pb^{2+} , Cd^{2+}) en su forma metálica son solubles en mercurio formando una amalgama (Bard & Faulkner, 2000).

Luego de que se ha terminado la preconcentración de la muestra, viene un tiempo corto donde se detiene la agitación, esta es la etapa de reposo, la que permite que el proceso electroquímico posterior sea controlado por procesos difusionales. Una vez que se ha terminado este lapso de tiempo, se realiza un barrido de onda cuadrada de potencial en alguno de los sentidos (en este caso, en el sentido anódico, de ahí el nombre de esta técnica), con esto los iones metálicos que habían

sido reducidos en el electrodo de BBD vuelven a la solución en su forma inicial (Daher, 1995).

En las curvas de voltametría de redisolución anódica es posible apreciar que la corriente de pico alcanzada es proporcional a la concentración del analito estudiado al igual que la velocidad de barrido aplicada. En esta técnica para lograr resultados analíticos es posible utilizar tanto curvas de calibración como el método de adición estándar (Bard & Faulkner, 2000).

La técnica utilizada en la determinación de plomo, cadmio y mercurio es la voltametría de redisolución de onda cuadrada (SWV) es una potente técnica electroquímica aplicada a mediciones electrocinéticas y analíticas, los límites de detección se pueden comparar con las técnicas cromatográficas y espectroscópicas (Arantes et al., 2014).

La voltametría de redisolución anódica por sus siglas en inglés (ASV anodic stripping voltammetry) es de por sí un método sensible y su uso para el análisis de trazas de metales pesados está bien fundamentado. Varias técnicas de ASV han empleado con éxito para la detección de plomo y cadmio, pero en la mayoría de ellas se ha involucrado electrodos de gota de mercurio o electrodos de película de mercurio. Sin embargo, debido a consideraciones obvias de toxicidad, se ha buscado actualmente sistemas analíticos libres de mercurio para la determinación de plomo y cadmio, por lo que se investiga la posibilidad de utilizar electrodos serigrafiados desechables ya sea para voltametría cuadrada o de impulsos (Dragoe et al., 2006).

En condiciones óptimas se prevé que exista una relación lineal entre las corrientes y las concentraciones de Cd (II), Pb (II) y Hg (II) en el rango de 10 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, con límites de detección menores a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en base a una relación señal a ruido igual a 3 ($S/N = 3$).

La detección electroquímica de metales pesados ofrece varias ventajas tales como la simplicidad, exactitud, bajo costo, notable sensibilidad, alta estabilidad y la

idoneidad para la determinación de múltiples analitos. La voltamperometría de redisolución anódica (ASV) ha sido ampliamente reconocida como una técnica poderosa para la determinación de elementos traza (Zhu et al., 2014).

3.2.6 CALIBRACIÓN CON ADICIÓN DE ESTÁNDARES

La preparación de estándares que reproduzcan la composición de la muestra es muy complicada cuando se trata del análisis de muestras complejas (suelos, minerales, aguas residuales, muestras biológicas (Palacios, 2014), etc.) ya que en este tipo de muestras, usualmente, los componentes de la matriz afectan las medidas de la señal analítica ya sea por exceso o por defecto. Por ello, es imposible compensar un blanco distinto de cero.

Con el objetivo de minimizar los efectos de la matriz, se utiliza el método de adición de estándar el cual consiste en la adición de un volumen fijo de la muestra, a las soluciones estándares diluyendo a un volumen final constante. Posteriormente, se procede a determinar la señal de los estándares así como de una muestra preparada de la misma forma, en ausencia de estándar añadido. En cada solución, las señales son afectadas de manera similar por los interferentes de la matriz.

El procedimiento que se lleva a cabo para la aplicación de este método, consiste en la selección de alícuotas de un volumen fijo de muestra (V_M) a las cuales se les añaden volúmenes variables de un estándar (V_S) de concentración conocida (C_S) diluyendo a un volumen final fijo (V_T) (Palacios, 2014)

Si se cumple una relación lineal entre la señal analítica y el volumen del estándar añadido (V_S), se tiene para la señal de la muestra (S_M) sin adición de estándar que:

$$Señal_M = k \frac{C_{Mi} * V_M}{V_T} \quad (3.2)$$

Donde: k corresponde a una constante de la curva de calibrado y C_M a la concentración del analito en la muestra. Por otra parte, para una alícuota de

muestra con adición de estándar la señal total (S_{M+S}) viene dada por la siguiente expresión:

$$\text{Señal}_{M+S} = k \frac{C_{Mi} * V_M}{V_T} + k \frac{C_s * V_s}{V_T} \quad (3.3)$$

A partir de la Ec. 2.21 una gráfica de la **Señal** $M+s$ en función de V_s es una línea recta con pendiente e intercepto igual a:

$$\text{Intercepto } (b) = k \frac{C_{Mi} * V_M}{V_T} \quad (3.4) \quad \text{Pendiente } (m) = k \frac{C_s}{V_T} \quad (3.5)$$

Al dividir la expresión del intercepto entre la expresión de la pendiente, se obtiene la Ec. 2.24 a partir de la cual se determina la concentración del analito en la muestra. Para la deducción de esta expresión ya se considero el factor de dilución. Así que C_M corresponde en este caso a la concentración de la muestra directamente.

$$C_{Mi} = \frac{b C_{si}}{m V_T} \quad (3.6)$$

También se puede graficar la señal analítica en función de la concentración del estándar añadido para el cual la relación matemática, para una alícuota de la muestra sin adición de estándar es:

$$\text{Señal}_M = k * C_M \quad (3.7)$$

Mientras que para una alícuota de la muestra con estándar añadido la relación matemática que se cumple es:

$$\text{Señal}_{M+S} = k * C_M + k_s * C_s \quad (3.8)$$

En este caso de la Ec. 2.26 se tiene que:

$$b = k * C_M \quad (3.9)$$

$$m = k \quad (3.10)$$

A partir del cociente del intercepto entre la pendiente se obtiene la Ec. 2.29 y de la que se puede determinar la concentración de la muestra:

$$C_M = \frac{b}{m} \quad (3.11)$$

En este caso la C_M que se obtiene con la Ec 2.30 corresponde a la muestra diluida, ya que todos los estándares con lo que se realiza la curva de calibrado fueron medidos en el volumen final de dilución. Siendo necesario considerar el factor de dilución para obtener el valor real de C_M (Palacios, 2014).

$$C_M = \frac{b}{m} * \frac{V_T}{V_M} \quad (3.12)$$

3.2.7 DETERMINACIÓN DE PLOMO (II) Y CADMIO (II)

Antes de iniciar tanto la preparación de soluciones de prueba como de muestras reales, limpiar completamente todo el material de vidrio con detergente y posteriormente con ácido nítrico 0,1 M (utilizar un solo grupo de material de vidrio para cada metal) para prevenir la contaminación entre metales.

3.2.7.1 Instrumentación

Todas las pruebas para la modulación y validación del método se realizaron en una celda voltamétrica de vidrio de 20 mL, utilizando un electrodo de Ag/AgCl como referencia (saturado con una solución de KCl 3M), como electrodo auxiliar se utilizó una barra de grafito y un electrodo de diamante dopado con boro de 3 mm de diámetro como electrodo de trabajo, todos fueron conectados a un potencióstato (CH Instruments modelo 1200A) y este a su vez a un ordenador donde se varía los ingresos de potencial a la celda para optimizar la técnica.

3.2.7.2 Reactivos

El agua que se utilizó fue destilada con un rango de conductividad de 0.5 a 3 $\mu\text{mhos/cm}$, es decir es un agua de tipo I.

Los estándares de Cd (II) y Pb (II) se prepararon en concentraciones de 5, 10, 15, 20, 100 y 1000 ppb ($\mu\text{g.L}^{-1}$) a partir de soluciones patrón de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2/\text{HNO}_3$ 0.5 M (Merck, Germany) de $1000 \pm 0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ como Cd (II) y de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2/\text{HNO}_3$ 0.5 M (Merck, Germany) de $1000 \pm 0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ como Pb (II) respectivamente.

Se utilizó nitrógeno de alta pureza 99.999% (AGA), acetato de amonio (NH_4Ac) con una pureza del 99.2% (Fisher Scientific) pH 4.6, mercurio (I) 0.5 mM a partir de $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (97%) (Merck, Germany), Ferricianuro de Potasio 0.5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Merck, Germany) y Ácido nítrico 0.2 M a partir de HNO_3 (Fisher Scientific) 69.6% de pureza.

3.2.7.3 Preparación de reactivos

- **Solución madre de 1000 ppb de Pb II y Cd II**

Tomar 0.5 ml de solución estándar de $1000 \pm 0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2/\text{HNO}_3$ 0.5 M (Merck, Germany) y 0.5 ml de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2/\text{HNO}_3$ 0.5 M (Merck, Germany) y aforar por separado a 500 ml con agua destilada (para determinar Pb (II) y Cd (II) de forma individual).

Realizar el mismo procedimiento anterior pero esta vez en un mismo balón colocar 0.5 ml de estándar Pb (II) y Cd (II) respectivamente, para determinar en una sola medida los dos metales.

- **Soluciones diluidas de Pb (II) y Cd (II)**

A partir de las soluciones madres de 1000 ppb de Pb (II) y Cd (II), tomar 10, 2, 1.5, 1, y 0.5 ml y aforar cada una a 100 ml para obtener concentraciones de 100, 20, 15, 10 y 5 ppb, que son los niveles de concentración a ser evaluados.

- **Acetato de Amonio 0.1 M (Electrolito soporte)**

Pesar aproximadamente 3.9326 g de acetato de amonio al 99.2% de pureza y aforar a 500 ml.

- **Mercurio (I) 0.5 mM (Formación de la amalgama)**

Pesar aproximadamente 0.1446 g de nitrato de mercurio (I), $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ del 97% de pureza (Merck Germany) y aforar a 500 mL en medio ácido, para facilitar la solubilidad.

- **Ferricianuro de Potasio 0.5 mM (Funcionalidad del electrodo)**

Pesar alrededor de 0.0832 g de ferricianuro de potasio $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Merck Germany) 99% de pureza y disolver en un balón de 500 ml con agua destilada.

- **Ácido Nítrico 0.2 M (Limpieza del electrodo)**

Tomar un volumen aproximado de 6.13 ml de ácido nítrico HNO_3 (Fisher Scientific) 69.6% de pureza y aforar a 500 ml.

3.2.7.4 Verificación del equipo

El equipo a utilizar es un potenciostato CHI versión 1200 A revisado su funcionalidad técnica el 10 de abril del 2014.

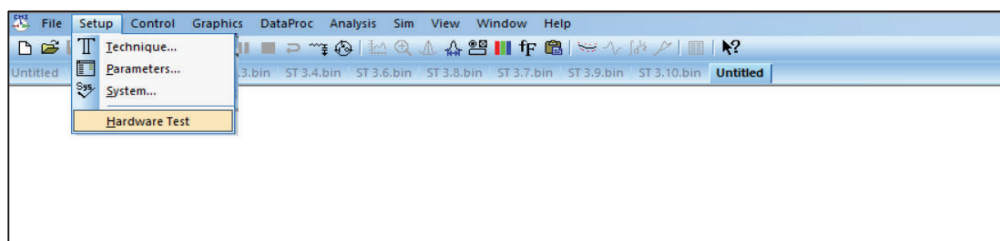
Diariamente hay que comprobar que las terminales del equipo estén conectadas correctamente a cada uno de los electrodos (terminal verde al electrodo de trabajo,

terminal rojo al contraelectrodo o electrodo de grafito y terminal blanco al electrodo de referencia Ag/AgCl), verificar la conexión entre el PC y potencióstato mediante la opción test hardware que se encuentra en el software del equipo Fig. 3.6

Mensualmente conectar la terminal del electrodo de trabajo con la terminal del electrodo de referencia y aplicar un potencial en función del tiempo como resultado se espera un potencial cercano a $0 \text{ V} \pm 0.8 \text{ mV}$.

Adicional conectar las mismas terminales a una resistencia y aplicar una voltametría lineal, se obtiene una gráfica de pendiente positiva de pendiente igual al de la resistencia.

FIGURA 3.6 VERIFICACIÓN DIARIA DEL POTENCIOSTATO



FUENTE: CHI 1200 A

3.2.7.5 Verificación del electrodo de referencia

En una celda limpia de 20 ml colocar 10 ml de acetato de amonio 0.1 M, conectar la terminal del electrodo de trabajo y la terminal del electrodo referencia a dos electrodos de referencia de Ag/AgCl respectivamente, aplicar un potencial de prueba cualquiera en función del tiempo y como resultado se obtiene un potencial estable y cercano a cero, esto denota que el electrodo de referencia se encuentra en óptimas condiciones para ser usado.

3.2.7.6 Verificación del electrodo de trabajo

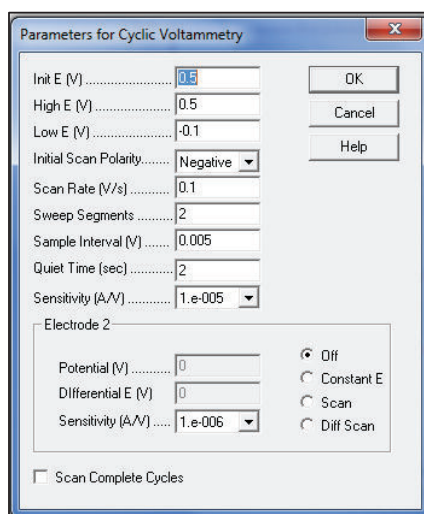
Para eliminar impurezas de los electrodos de trabajo se los debe someter a un proceso de pulido en superficies rugosas (materiales que proporciona el fabricante)

con agua y alúmina que ayuda a remover compuestos no deseados de la base del electrodo de trabajo. Debido a que la estructura del electrodo de BDD es muy delicada en lo posible se debe evitar el pulido y se debe optar por la aplicación de oxidaciones y reducciones sucesivas, (voltametrías cíclicas) en medio ácido que es otra alternativa para eliminar interferentes.

Para oxidar todas las especies depositadas en la base del electrodo por efecto de mediciones anteriores se debe aplicar un potencial positivo lo más cercano a lo que produce el equipo que es de 2.4 V (voltios) en ácido nítrico 0.2 M, es decir se aplica una cronoamperometria en cinco pasos cada una de veinte segundos hasta provocar una electrolisis del medio que finaliza con la presencia de burbujas que es un indicador de la generación de hidrógeno.

Al terminar la limpieza del electrodo de trabajo en medio ácido, se procede con la verificación del mismo, sometiéndolo a un análisis de voltametría cíclica (de -0,1 a 0,5 V Fig. 3.7) sobre una solución 0,5 mM de Ferricianuro de Potasio $K_3 [Fe(CN)_6]$ y 0,1 M de nitrato de potasio KNO_3 .

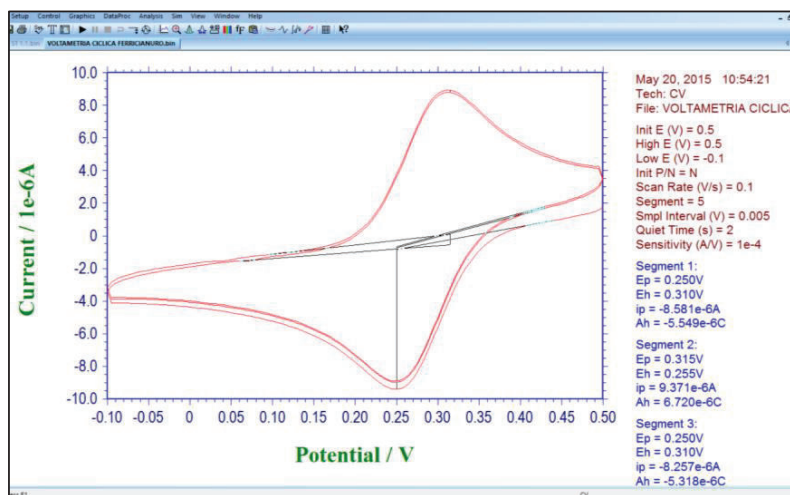
FIGURA 3.7 PARÁMETROS DE VOLTAMETRÍA CÍCLICA



FUENTE: CHI 1200 A

La Fig. 3.8, muestra una voltametría cíclica de ferricianuro de potasio con la cual se interpreta que no hay sustancias que interfieren o que están adheridas al electrodo de trabajo debido a que no existen picos montados o adyacentes en todo el perfil del voltagrama. El perfil de la voltametría cíclica de ferricianuro de potasio consta de dos picos, el superior o catódico (corriente negativa) y el inferior o anódico (corriente positiva) para comprobar que el electrodo de trabajo es funcional y se encuentra limpio la diferencia de corriente de los picos antes mencionados tiene que ser cercano o igual a cero.

FIGURA 3.8 VOLTAMETRÍA CÍCLICA DE FERRICIANURO DE POTASIO



FUENTE: CHI 1200 A

3.2.7.7 Acondicionamiento de muestras

Para el análisis de muestras preparadas y reales proceder a temperatura ambiente, con el fin de que no afecte los volúmenes y con estos los resultados, para muestras reales agitar y filtrar para eliminar materia orgánica y garantizar homogeneidad con membranas de 0.45 μm de diámetro.

Las principales interferencias incluyen la formación de compuesto intermetálicos (combinación que resulta de mezclas homogéneas de dos o más metales en solución), entre ellos están el Cu (II), Zn (II), Tl (III).

El cobre es de gran importancia debido a su abundancia en muestras acuosas ambientales, excesos de cobre puede causar el cambio de la superficie del electrodo, lo que afecta a las señales de plomo y cadmio. La localización, la sensibilidad, y el ancho de pico, de Cd (II) y Pb (II) se afecta considerablemente por la presencia de 0,2 mM Cu (II) (Bonfil & Kirowa-Eisner, 2002).

La señal de Tl (III) puede superponerse a la del Cd (II) ya que su señal es ligeramente más negativa. La sensibilidad del pico de talio aumenta al añadir mayores cantidades de electrolito afectando en mayor proporción al cadmio que al plomo (Bonfil & Kirowa-Eisner, 2002).

Los compuestos intermetálicos se pueden formar en la fase de preconcentración de mercurio, cuando las altas concentraciones de ciertos metales están presentes simultáneamente, el zinc forma compuestos intermetálicos con cobalto y níquel, y ambos el zinc y el cadmio forma compuestos intermetálicos con el cobre, la plata y el oro (Arantes et al., 2014).

Como resultado, el pico de extracción para los metales constituyentes pueden ser severamente deprimido o elevado y pueden existir picos adicionales debido a la presencia de compuestos intermetálicos (Arantes et al., 2014).

En general la formación de compuestos intermetálicos están presentes en concentraciones por encima de 1 mg.L^{-1} . Si los metales están presentes en concentraciones superiores a 10 mg.L^{-1} , no se utiliza voltametría de redisolución anódica. Las concentraciones superiores a 10 mg.L^{-1} generalmente se pueden cuantificar por métodos clásicos como espectrometría o cromatografía (Rice, Bridgewater, & Association, 2012).

Los niveles de validación para Cd (II), Pb (II) y Hg (II) se los plantea a partir de los objetivos de validación y de los parámetros descritos en el Texto Unificado de Legislación Secundaria del Medio Ambiente (TULSMA) en el anexo I del libro VI (Norma Calidad Ambiental y Descarga de Efluentes al Recurso Agua). Se plantea un rango de validación según la TABLA 3.4

TABLA 3.4 RANGO DE VALIDACIÓN PARA Pb (II), Cd (II) Y Hg (II)

Rango	5 a 20 ppb ($\mu\text{g/L}$)
-------	--------------------------------

3.2.8 EXPLORACIÓN Y AFINACIÓN DE LA TÉCNICA**3.2.8.1 Plomo (II) y Cadmio (II)**

Debido a que se va a trabajar con un electrodo prácticamente nuevo y de material no convencional en nuestro medio (BDD por sus siglas en inglés Boron Doped Diamond) y se pretende detectar dos metales al mismo tiempo nos basamos en la publicación (Arantes, T.M., et al., Lead detection using micro/nanocrystalline boron-doped diamond by square-wave anodic stripping voltammetry. Talanta, 2014. 128: p. 132-140) y en el manual de análisis de aguas limpias y residuales (Rice Eugene W., Bridgewater Laura, American Public Health Association APHA), partimos de las siguientes variables ver TABLA 3.5, aplicando voltametría de redisolución anódica por onda cuadrada por sus siglas en inglés (Square Wave Voltammetry) .

TABLA 3.5 PARÁMETROS INICIALES PARA Pb (II) Y Cd (II)

VARIABLE	VALOR
Potencial Inicial	-1.00 V (Pb, Cd); -1.20 V (Zn)
Potencial Final	0.00 V
Potencial de Equilibrio	-1.00 V (Pb, Cd); -1.20 V (Zn)
Amplitud de Pulso	25 mV
Ancho de Pulso	50 ms
Velocidad de Barrido	5 mV/s
Frecuencia	100 Hz

FUENTE: APHA

Las condiciones expuestas en la tabla anterior son condiciones iniciales y de exploración del método, es en base a esos valores de partida que se modula y se

explora los valores ideales que garanticen estabilidad de lecturas y repetibilidad de picos para iniciar con la puesta a punto de la técnica.

3.2.8.2 Procedimiento de análisis para determinar el límite de detección (L_{od}) y cuantificación (L_c) de Pb (II) y Cd (II)

Una vez comprobadas las conexiones de cada una de las terminales del equipo y realizado la verificación del potencióstato, así como de cada uno de los electrodos proceder de la siguiente manera para la determinación de los límites mínimos de detección y cuantificación para plomo y cadmio en agua.

Según (Brieve, 1998), recomienda para el límite de detección y cuantificación analizar diez muestras de blancos (muestras sin analito), independientes medidas una vez cada una, en el caso de que no exista señal analizar diez blancos de muestras independientes con la menor concentración posible de analito que genere señal instrumental, medidos una vez cada uno.

Debido a que el potencióstato no pudo detectar señal alguna con los blancos, se preparó una solución de Cd (II) y Pb (II) con una concentración mínima de 0.1 ppb con la cual el equipo pudo generar señal, es a partir de esta respuesta del potencióstato que se determina las concentraciones de detección y cuantificación.

Se procede de la siguiente manera:

- Añadir con una pipeta automática 4 mL de una solución de mínima concentración (0.1 ppb) de Pb (II) y Cd (II) a una celda de 20 ml
- Sobre la solución anterior agregar 6 mL de una solución de acetato de amonio 0.1 M y 0.5 mL de mercurio (I) de concentración 0.5 mM.
- Agitar manualmente hasta tener una solución homogénea y proceder con la lectura.

- La técnica que se aplica es la voltametría de onda cuadrada por sus siglas en inglés (SWV, Square Wave Voltametry). Las condiciones operativas de partida de esta técnica se tomó de (Rice Eugene W., Bridgewater Laura, American Public Health Association APHA), se modificó cada una de las variables mientras las restantes se las mantuvo constantes para mejorar altura, ancho de pico y tener lecturas estables.

3.2.8.3 Procedimiento de análisis para determinar Pb (II) y Cd (II) en muestras preparadas.

Una vez determinado el límite de detección y cuantificación preparar muestras de 5, 10, 15, y 20 ppb de plomo y cadmio por separado que son los niveles a ser evaluados.

- En el caso de muestras reales filtrar el agua para evitar interferencias por compuestos no deseados especialmente orgánicos, y dejar que la muestra tome temperatura ambiente en el caso que haya estado en refrigeración.
- Burbujear alrededor de 3 minutos con nitrógeno las muestras preparadas y reales para desplazar al oxígeno que es un interferente, tomar con una micropipeta automática 4 mL y adicionar en la celda con mucha precaución de no perder muestra.
- A continuación agregar 6 mL de solución de soporte o buffer (acetato de amonio 0.1 M).
- Como último reactivo adicionar 0.5 ml de mercurio (I) 0.5 mM y agitar cuidadosamente, todas las adiciones de los reactivos se los debe realizar con puntas limpias de micropipeta, para evitar contaminación.
- Por cada nivel (5, 10, 15 y 20 ppb) de concentración realizar tres determinaciones diarias en muestras preparadas durante cinco días mediante la técnica de adición del estándar.

- En el caso de tener problemas de lectura realizar una cronoamperometria en cinco pasos durante 20 s a 2.4 V en ácido nítrico 0.2 M, desechar esta solución y proceder con una voltametría cíclica (cinco ciclos) a una velocidad de barrido de 0.1 V/s en ácido nítrico 0.2 M, a continuación aplicar otra voltametría cíclica (cinco ciclos) pero a una velocidad menor de barrido 0.01 V/s, constatar que la ventana de trabajo del electrodo de BDD no genere picos ajenos a su ventana característica.
- De igual forma que para el límite de detección y cuantificación utilizamos voltametría de onda cuadrada y redisolución anódica.

Una vez afinada de la técnica, es decir definido las magnitudes de cada una de las variables tanto en la forma de ingreso de potencial (SWV TABLA 3.6) así como el tiempo y potencial de preconcentración TABLA 3.7, se aplica estas condiciones ideales para todos los niveles de concentración a validar (5, 10, 15, 20 ppb) con lo cual se garantiza alta estabilidad y repetibilidad instrumental (altura de pico).

TABLA 3.6 PARÁMETROS DE POTENCIAL PARA Cd (II) y Pb (II)

Condiciones experimentales de la Voltametría de Onda Cuadrada	
Potencial Inicial <i>Init E (V)</i>	-1
Potencial final <i>Final E(V)</i>	-0.1
Incremento <i>Incr E(V)</i>	0.01
Amplitud <i>Amplitude (V)</i>	0.025
Frecuencia <i>Frequency (Hz)</i>	100
Tiempo de reposo <i>Quiet Time (sec)</i>	5
Sensibilidad <i>Sensitivity (A/V)</i>	1×10^{-4}

ELABORADO POR: Jorge Tafur

TABLA 3.7 PARÁMETROS DE PRECONCENTRACION DE Cd (II) Y Pb (II)

PRIMER PASO	
Potencial (V)	0.4
Tiempo (s)	5
SEGUNDO PASO	
Potencial (V)	-1.3
Tiempo (s)	5
TERCER PASO	
Potencial (V)	-0.9
Tiempo (s)	5

ELABORADO POR: Jorge Tafur

3.2.9 DETERMINACIÓN DE MERCURIO

3.2.9.1 Instrumentación

Todas las pruebas para la modulación y validación del método se realizaron en una celda voltamétrica de vidrio de 20 mL, utilizando un electrodo de Ag/AgCl como referencia (saturado con una solución de KCl 3M), como electrodo auxiliar se utilizó una barra de grafito y un electrodo de diamante dopado con boro de 3 mm de diámetro como electrodo de trabajo, todos fueron conectados a un potenciostato (CH Instruments modelo 1200A) y este a su vez a un ordenador donde se varía los ingresos de potencial a la celda para optimizar la técnica.

3.2.9.2 Reactivos

Las soluciones diluidas de Hg (II) de 1000, 100, 20, 15, 10 y 5 ppb se prepararon a partir de una solución patrón de β (Hg^{2+}) = 1001 ± 2 mg/L (ppm).

Para detectar trazas de Hg (II) se realiza un film de oro (50 ppm) sobre la base del electrodo de trabajo (BDD) a partir de una solución patrón de ácido tetracloroaurico

HAuCl₄/HCl 2 M (Merck Germany) de 1000 ± 0.1 mg/L (ppm) como Au (III), se utilizó como electrolito soporte ácido clorhídrico (HCl) 0.6 N a partir de HCl (Fisher Scientific) al 38% y solución de limpieza, que contiene: 0.2 M de HClO₄, 3 mM NaCl y 1 mM de EDTA para eliminar impurezas entre lectura y lectura.

3.2.9.3 Preparación de reactivos

- **Solución madre de 1000 ppb de Hg (II)**

Tomar 0.5 mL de la solución patrón de Hg (II) (Merck) de 1000 ± 0.1 mg.L⁻¹ con una micropipeta automática y aforar a 500 mL.

- **Soluciones diluidas de Hg (II)**

A partir de la solución madre de 1000 ppb de Hg (II) tomar por separado 10, 2, 1, y 0.5 mL y aforar en balones de 100 ml, para obtener concentraciones de 100, 20, 15, 10, y 5 ppb de mercurio (concentraciones a ser evaluadas).

- **Solución de 50 ppb de de Oro (III) (formación del film de oro)**

Añadir 5 ml de la solución patrón de Oro de HAuCl₄/HCl 2 M 1000 ± 0.1 mg.L⁻¹ y aforar a 100 ml.

- **Solución de ácido clorhídrico 0.6 N (electrolito soporte)**

Colocar 24.84 ml de ácido clorhídrico concentrado (Fisher Scientific) del 38% de pureza en un balón y aforar a 500 ml.

- **Solución de ácido clorhídrico 6 N**

Colocar 248.42 ml de ácido clorhídrico concentrado (Fisher Scientific) del 38% de pureza en un balón de 500 ml y aforar.

- **Solución de ácido nítrico 0.2 N (limpieza de material de vidrio)**

Añadir 16.1 ml de ácido nítrico del 68% de pureza (Fisher Scientific) y aforar a 500 ml.

- **Solución de limpieza (del electrodo de trabajo BDD)**

Pesar alrededor de 0.04383 g de NaCl, 0.0930 g de EDTA y 5 ml de HClO₄ y llevar a 250 ml con agua destilada.

3.2.10 AFINACIÓN DE LA TÉCNICA PARA DETERMINAR Hg (II)

En el caso de la cuantificación de Hg (II) se utiliza la misma técnica de la determinación de Cd (II) y Pb (II), pero con reactivos diferentes porque su potencial característico se manifiesta a valores positivos por lo que resulta complicado identificarlo y cuantificarlo junto con plomo y cadmio en una sola medición, de la misma manera se parte del artículo (Abollino, 2008), que nos proporciona una idea de que punto partir, hay que tomar en cuenta que mencionado artículo se lo investigó con electrodo de carbón (como electrodo de trabajo) modificado con oro, en este estudio hay que identificar el comportamiento del electrodo de BDD. En la TABLA 3.8 se presenta la información de las variables a modificar en la afinación de la técnica.

TABLA 3.8 VARIABLES DE PARTIDA PARA DETERMINAR Hg (II)

VARIABLE	VALOR
Preconcentración de oro	-0.8 V; 6 minutos
Potencial Inicial	0.00 V
Potencial Final	0.8 V
Tiempo de concentración	120 s
Frecuencia	100 Hz
Incremento Onda	0.002 V
Amplitud de onda	0.02 V

FUENTE: Abollino Ornella

3.2.10.1 Procedimiento de análisis para determinar Hg (II)

- Lavar previamente todo el material de vidrio con detergente y posteriormente con ácido nítrico 0.2 N y dejar en contacto unos minutos, trabajar de preferencia con puntas de micropipetas nuevas para evitar contaminación de otros metales.
- Realizar la comprobación del software del potenciostato y de los electrodos de referencia y trabajo.
- Para determinar la concentración de Hg (II) en muestras preparadas y reales, en primer lugar se debe realizar la preconcentración de una película de oro sobre el electrodo de trabajo (BDD), la misma que es capaz de aumentar la sensibilidad en el momento de la preconcentración para formar la amalgama Hg-Au, para este fin tomar 15 mL aproximadamente de solución de 50 ppm de Au (III) y aplicar una cronoamperometría (potencial en función del tiempo) aplicando los parámetros que indica la TABLA 3.9

TABLA 3.9 PARÁMETROS DE DEPOSICIÓN DEL FILM DE Au (III)

Parámetros	Valores
Potencial inicial, <i>Init E (V)</i>	0
Potencial máximo, <i>High E (V)</i>	0
Potencial mínimo, <i>Low E (V)</i>	-0.8
Números de pasos, <i>Number of steps</i>	1
Ancho de pulso, <i>Pulse Width (s)</i>	360
Intervalo, <i>simple intervale (s)</i>	0.001
Tiempo de equilibrio, <i>Quiet Time (s)</i>	2
Sensibilidad, <i>Sensitivity (A/V)</i>	1×10^{-3}

ELABORADO POR: Jorge Tafur

- Una vez depositado la película de oro sobre el electrodo de trabajo (BDD) a éste se lo debe activar mediante voltametría cíclica, tomando 1 mL de HCl 0.6 N con 9 ml de agua destilada y aplicar las condiciones de la TABLA 3.10

TABLA 3.10 ACTIVACIÓN DEL FILM DE Au (III)

Parámetros	Valores
Potencial inicial, <i>Init E (V)</i>	0
Potencial máximo, <i>High (V)</i>	0.7
Potencial mínimo, <i>Low (V)</i>	0
Velocidad de barrido, <i>Scan Rate (V/s)</i>	0.1
Segmentos de barrido, <i>Sweep Segments</i>	20
Intervalo, <i>Sample Intervalo (V)</i>	0.001
Tiempo de equilibrio, <i>Quiet Time (s)</i>	2
Sensibilidad, <i>Sensitivity</i>	1×10^{-5}

ELABORADO POR: Jorge Tafur

- Realizada la activación del film de oro sobre el electrodo de trabajo (BDD) se coloca 9 ml de muestra preparada (de cada nivel de concentración 5, 10, 15, y 20 ppb) con 1 ml de HCl 0.6 N, se agita y se realiza la voltametría de onda cuadrada (SWV) según las condiciones de la TABLA 3.11, cabe recalcar que para la determinación de mercurio no se necesitó una preconcentración previa.

TABLA 3.11 PARÁMETROS PARA DETERMINAR MERCURIO POR (SWV)

Parámetros	Valores
Potencial Inicial, <i>Init E (V)</i>	0.3
Potencial Final, <i>Final E (V)</i>	0.8
Incremento de Potencial, <i>Incr E(V)</i>	0.01
Amplitud, <i>Amplitude (V)</i>	0.01
Frecuencia, <i>Frequency (Hz)</i>	30
Tiempo de Equilibrio, <i>Quiet time (s)</i>	20
Sensibilidad, <i>Sensitivity (A/V)</i>	1×10^{-4}

ELABORADO POR: Jorge Tafur

- Entre medida y medida realizar la eliminación de restos de mercurio del electrodo de trabajo aplicando una cronoamperometría con solución limpiadora (mezcla de NaCl, EDTA y HClO₄).
- Para determinar el límite de detección de Hg (II) preparar una solución de mercurio de 0.1 ppb de concentración y registrar la señal (registrar por lo menos 10 señales), calcular la concentración obtenida para determinar el límite de detección y cuantificación.

3.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se estableció el diseño experimental a seguir en la validación, el cual nos permitió identificar y cuantificar los parámetros de desempeño (selectividad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, veracidad, precisión repetibilidad, reproducibilidad, exactitud e intervalo de trabajo de los métodos dentro de la investigación.

3.3.1 Pb (II), Cd (II) Y Hg (II)

3.3.1.1 Elementos que se disponen para su validación

Para la validación del método en la determinación de Pb (II), Cd (II) y Hg (II) se seleccionó un rango de validación de 0.005 hasta 0.02 mg.L⁻¹ del cual se escogió 4 niveles de concentración para el análisis experimental. Los niveles de concentración escogidos se presentan en la TABLA 3.12:

TABLA 3.12 NIVELES DE CONCENTRACIÓN A VALIDAR

RANGO DE VALIDACIÓN	NIVELES DE CONCENTRACIÓN
5-20 µg.L ⁻¹	5, 10, 15, 20 µg.L ⁻¹

ELABORADO POR: Jorge Tafur

3.3.1.2 Selectividad

Según (Duffau, Rojas, et al., 2010) la selectividad es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes. Estos interferentes normal o frecuentemente se encuentran en la matriz de interés.

La prueba de selectividad que se va a realizar, consiste en analizar estándares de concentración conocida de cada analito (Pb II, Cd II y Hg II) en presencia de los tres principales interferentes del método que son Cu II, Zn II y Tl III a diversas concentraciones. Se va a realizar una prueba de significancia (t-Student), para comprobar si existe o no existe diferencia significativa de concentración de cada analito en estudio por efecto de la presencia de cada interferente.

3.3.1.3 Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio (Duffau, Rojas, et al., 2010).

Con el fin de determinar el rango lineal se realizará un gráfico de respuesta del potencióstato (μA) versus concentración de cada metal ($\mu\text{g.L}^{-1}$), lo que se conoce como función respuesta (normalmente llamada recta de calibrado). Ésta se va a determinar cada día de análisis por cada nivel de concentración de cada metal (5, 10, 15, 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$) compuesta por la muestra (blanco) y los estándares certificados de trabajos de valor teórico conocido, que cubren el intervalo de trabajo. El número de puntos a analizar es de 3 a 4 medidas para obtener la curva de calibrado y el coeficiente de correlación al cuadrado r^2 es aceptado con 0.99 debido a que son trazas de metales las que se analiza.

3.3.1.4 Límite de Detección (LoD)

Cuando se realizan mediciones a niveles bajos del analito o de la propiedad relacionada, como en el análisis de trazas, es importante saber cual es la

concentración más baja del analito o el valor de su propiedad relacionada, que puede detectarse confiablemente por el método. La importancia de determinar esto y los problemas implícitos, surgen del hecho que la probabilidad de detección no cambia repentinamente de cero a la unidad cuando se cruza un umbral. Los problemas han sido investigados estadísticamente con detalle y se ha propuesto una gama de criterios de decisión (Brieve, 1998).

Para determinar el límite de detección L_D del método propuesto se va a preparar 10 muestras individuales de una concentración mínima (0.1 ppb) que el equipo sea capaz de generar señal y se aplica la Ec. 3.13

$$L_D = \bar{x} + 3s \quad (3.13)$$

Donde \bar{x} es la concentración promedio de diez lecturas individuales y s es la desviación estándar de dichas concentraciones.

3.3.1.5 Límite de cuantificación (L_Q)

El “límite de cuantificación” (L_Q) estrictamente es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad, se calcula mediante la Ec. 1.14

$$L_Q = \bar{x} + 10s \quad (3.14)$$

Donde \bar{x} es la concentración promedio (10 lecturas de muestras individuales) de la mínima concentración de analito (0.1 ppb) preparada para cada metal (Pb II, Cd II y Hg II) que el potencióstato es capaz de generar señal analítica.

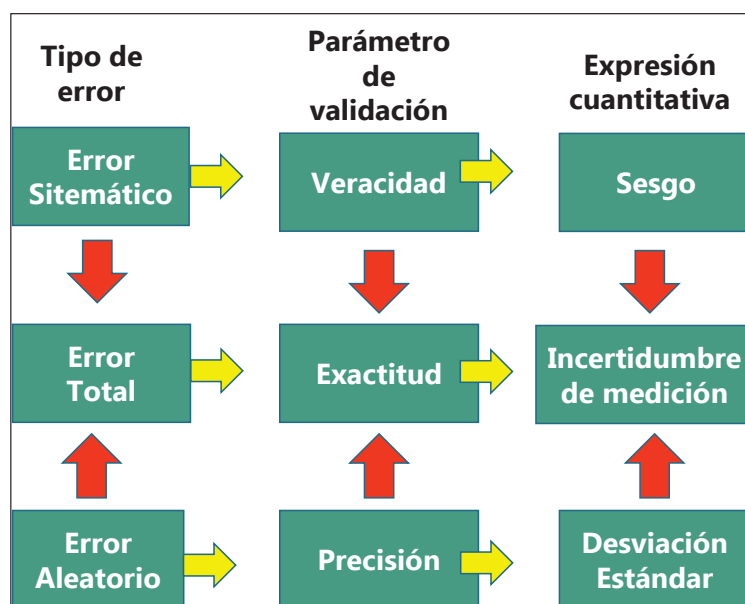
3.3.1.6 Exactitud

La “exactitud” expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero. La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los errores sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados TABLA 3.13.

Normalmente la exactitud se estudia en dos componentes: la “veracidad” y la “precisión”. La veracidad (de un método) es una expresión de que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) respecto del valor real, la veracidad se expresa en términos de sesgo. La “precisión” es una medida de que tan cercanos están los resultados unos con respecto a los otros y por lo general se expresa mediante medidas tal como la desviación estándar la cual describe la dispersión de los resultados.

Adicionalmente, una expresión cada vez más común de exactitud es la “incertidumbre de medición”, la cual proporciona una figura única de expresión de la exactitud (Brieve, 1998).

TABLA 3.13 PARÁMETROS QUE DEFINEN LA EXACTITUD



FUENTE: (Duffau, Guerrero, et al., 2010)
ELABORADO POR: Jorge Tafur

A más de evaluar la exactitud con sus parámetros relacionados (veracidad, precisión) se la va a calcular mediante la incertidumbre de medida asociada a cada nivel de concentración para cada metal (Pb II, Cd II y Hg II), realizando un análisis de todas las fuentes posibles de incertidumbre que provienen tanto de los errores aleatorios como de los sistemáticos del método, para concentraciones muy diluidas

en el orden de los $\mu\text{g.L}^{-1}$ se espera una incertidumbre de medida $\leq 35\%$ de su resultado.

3.3.1.7 Veracidad

La evaluación práctica de la veracidad se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, la veracidad se determina contra un valor de referencia (o sea, un valor verdadero o un valor verdadero convencional que se los obtiene a partir de material de referencia certificado MRC).

Se dispone de dos técnicas básicas: la verificación con respecto a los valores de referencia de un material caracterizado o de otro método caracterizado, en el caso de los metales a estudiar (Pb II, Cd II y Hg II) se preparará soluciones individuales de 5 ppb de cada metal a partir de estándares de concentraciones conocidas y adicional una muestra certificada por la Agencia Internacional de Energía Atómica (International Atomic Energy Agency) que contiene una mezcla de los tres metales y varios interferentes (ver ANEXO 6) dichas soluciones se las analizará por voltametría de redisolución anódica y por espectroscopia de plasma inducido (ICP) (método ya validado), se comparará la media de los resultados de cada metal por ambos métodos aceptando a la media de los resultados obtenidos por ICP como valores verdaderos o reales, se aplicará el estadístico t de student para el análisis de medias y se verificará si las medidas de sesgo son o no aceptables respecto a resultados de métodos ya validados.

3.3.1.8 Precisión

Normalmente, la “precisión” se determina para circunstancias específicas las cuales en la práctica pueden ser muy variadas. Las medidas de precisión más comunes son la “repetibilidad” y la “reproducibilidad” (Brieve, 1998).

Se realizó el análisis de varianza simple (ANOVA), para un factor (día de análisis) es decir, por cada nivel de concentración a validar (5, 10, 15, 20 ppb) de cada metal

(Pb II, Cd II y Hg II) se determinó 3 concentraciones diarias por 5 días, de los resultados obtenidos de cada nivel de estudio, se calculará la precisión como porcentaje del coeficiente de variación de repetibilidad (%CV_r) y reproducibilidad (% CV_R).

Una vez afinado el método se aplicará el procedimiento a muestras reales de agua provenientes del drenaje ácido de minas abandonadas del cantón Zaruma provincia de El Oro para evaluar Pb II, Cd II y Hg II conforme la norma nacional del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Medio Ambiente.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL ELECTRODO DE TRABAJO (BDD)

Como se sabe no todos los materiales distribuidos en la naturaleza se los puede considerar como “activos”, tal es el caso del diamante que incluso en su forma natural se lo clasifica como un aislante eléctrico, a pesar de ciertas características inigualables como su elevada densidad atómica, dureza e inercia química que lo convierten en un material de gran interés tecnológico. Sin embargo, la introducción de algún átomo dopante a su estructura (generalmente el boro o el nitrógeno) le confieren propiedades de conductor electrónico. Dependiendo de la cantidad de dopante puede comportarse como un semiconductor o como un semimetal. Debido a sus excepcionales cualidades, el diamante conductor se convierte en un nuevo material muy prometedor para su uso en aplicaciones electroquímicas (Pleskov et al., 2015).

En contraste con otros materiales carbonosos como el grafito o el carbón vítreo, de los que se viene estudiando desde hace varios años sus propiedades y aplicaciones en electroquímica, la electroquímica del diamante es mucho más reciente. Se atribuye la primera publicación sobre este material a Pleskov y sus colaboradores realizada en 1987.

Desde entonces se ha venido realizando un sin número de investigaciones referente al comportamiento del diamante por diversos grupos de científicos que se enfocan principalmente en factores que influyen en la respuesta electroquímica del BDD, para lo cual se han apoyado en técnicas electroquímicas (voltamperometría e impedancia), espectroscópicas (Raman y XPS), microscópicas (AFM y SEM), entre otras.

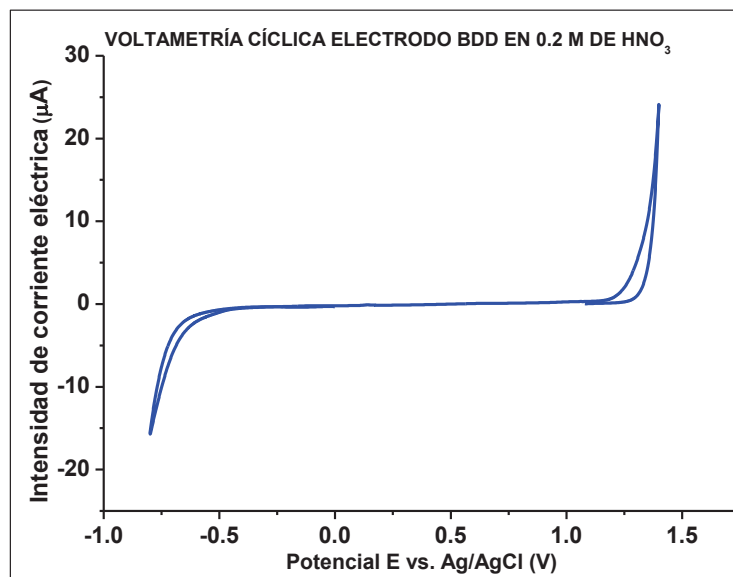
En este trabajo, el primer punto de estudio fue la caracterización de los electrodos de BDD-Si (diamante dopado con boro depositado sobre una base de silicio cuya nomenclatura se reduce a BDD) adquiridos de la compañía Metaken mediante microscopía de AFM y c-AFM y que se usaron posteriormente en los estudios electroanalíticos de la determinación de metales pesados (Cd II, Pb II y Hg II) por voltametría de redisolución anódica.

4.1.1 MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM Y c-AFM)

En este trabajo, la finalidad de llevar a cabo un estudio de AFM y de c-AFM es conocer la topografía de la superficie y la conductividad superficial de los electrodos de BDD nuevos sin ningún tratamiento de limpieza, y de un electrodo de BDD nuevo luego de un proceso de limpieza para conocer su funcionalidad antes de realizar la cuantificación de los metales en estudio.

La topografía y la conductividad de la superficie de las películas de BDD fueron estudiadas en un equipo Park NX 20 en modo de contacto. Se utilizó una punta de Si_3N_4 en forma piramidal montada sobre un cantiléver (soporte de la aguja). Las micrografías fueron tomadas de un electrodo de BDD nuevo sin un tratamiento de limpieza y de un BDD nuevo luego de un tratamiento de limpieza. Para el electrodo de BDD nuevo que fue limpiado se siguió el siguiente procedimiento: se enjuagó el electrodo de BDD en isopropanol ($\geq 99.7\%$ Sigma-Aldrich) por 20 min y posteriormente se lavó con agua desionizada ($18\text{ m}\Omega\text{ cm}$). Utilizando un potenciostato CHI instruments acoplado a una computadora y controlado por un software CHI 1200 A. Se impuso 25 ciclos de potencial a 100 mV s^{-1} en una disolución de 0.2 M de HNO_3 ($\approx 65\%$, Fisher Scientific) burbujeada con $\text{N}_2(\text{g})$ (99.99% , Aga) en el intervalo de la ventana de potencial de trabajo (WPW, por sus siglas en inglés) de -0.7 a 1.5 V de acuerdo a la Fig. 4.1. Desde un punto de vista electroquímico el electrodo de BDD se caracteriza por tener un amplio rango de potencial donde el electrodo se comporta como idealmente polarizable, además de presentar bajas corrientes de doble capa en este rango de potenciales, si las comparamos con los voltagramas de otros electrodos con base de carbón.

FIGURA 4.1 VENTANA DE TRABAJO DEL ELECTRODO DE BDD



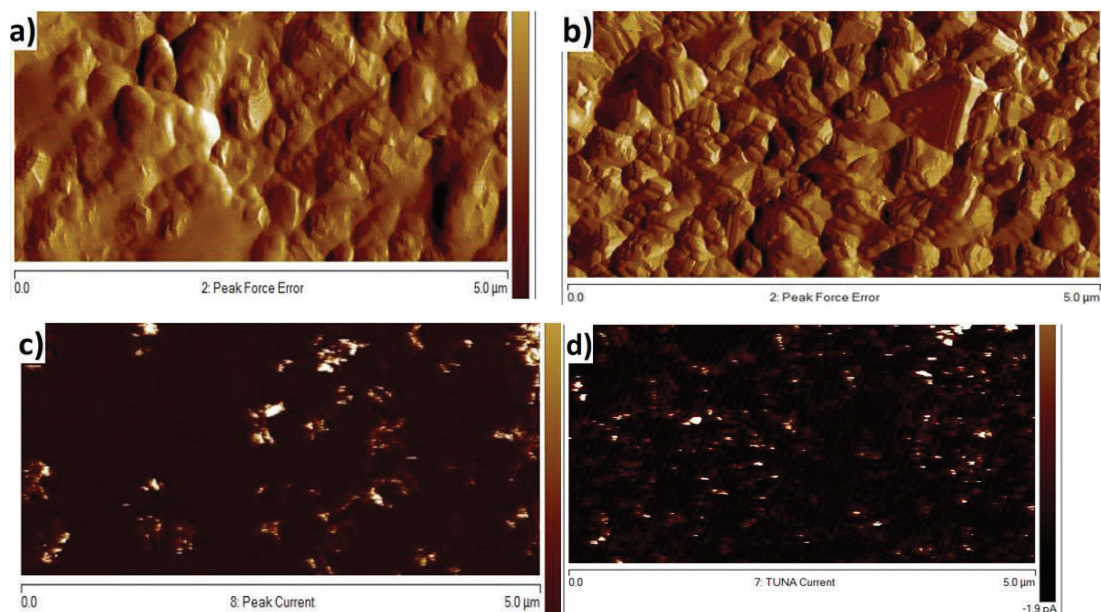
ELABORADO POR: Jorge Tafur

En la Fig. 4.2 a se observa una capa de carbón residual que recubre la superficie del electrodo de BDD nuevo sin ningún tipo de limpieza. Sin embargo, el electrodo de BDD nuevo luego de ser limpiado (Fig. 4.2 b) presenta una estructura cristalina muy bien definida, con un tamaño promedio de los cristales de BDD de 0.5 nm.

La imagen de c-AFM del BDD nuevo sin un tratamiento de limpieza, da la impresión de que toda la superficie presenta una conductividad leve, con pocas zonas de alta conductividad (Fig. 4.2 c). Sin embargo, luego de la limpieza del electrodo la capa de polvo de carbón se elimina, y se puede observar más zonas del electrodo con buena conductividad y sensibilidad (1.9 pA) ver (Fig. 4.2 d).

La apariencia de que toda la superficie es levemente conductora en los electrodos nuevos sin una limpieza previa, se debe a que el polvo de carbón residual superficial también presenta conductividad, que no es la conductividad real del electrodo.

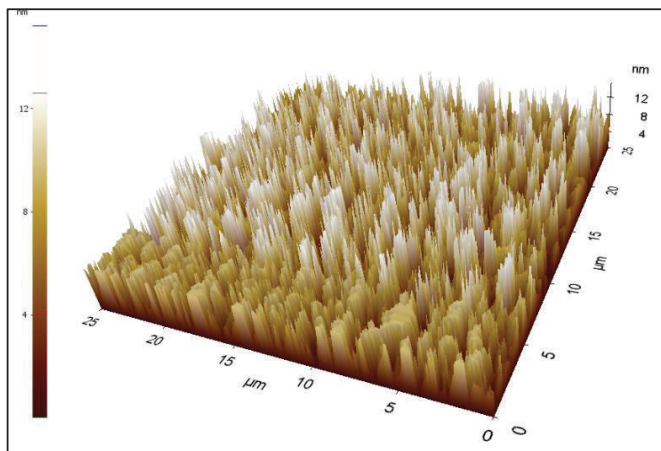
FIGURA 4.2 IMÁGENES DEL AFM Y c-AFM DEL ELECTRODO DE BDD



ELABORADO POR: Jorge Tafur

De acuerdo a las micrografías de las Figs. 4.1a, 4.1b, 4.1c y 4.1d es evidente que una limpieza superficial de cualquier electrodo de BDD nuevo es necesario antes de que éste sea utilizado en cualquier tipo de estudio electroanalítico. La limpieza superficial puede ser química, electroquímica o por otros métodos. Una adecuada limpieza no solo permite eliminar todas las impurezas de carbón residual de la superficie, sino que también permitirían tener una respuesta electroquímica sin interferencias y con una buena reproducibilidad.

En la Fig. 4.3 se observa el intercalado de paquetes formados por boro depositado en sílice con paquetes de diamante, el cual se aprecia una distribución uniforme en todo el área de análisis que fue de $25 \times 25 \mu\text{m}$, los paquetes formados a base de diamante sobresalen de la superficie hasta una altura de 12 nm.

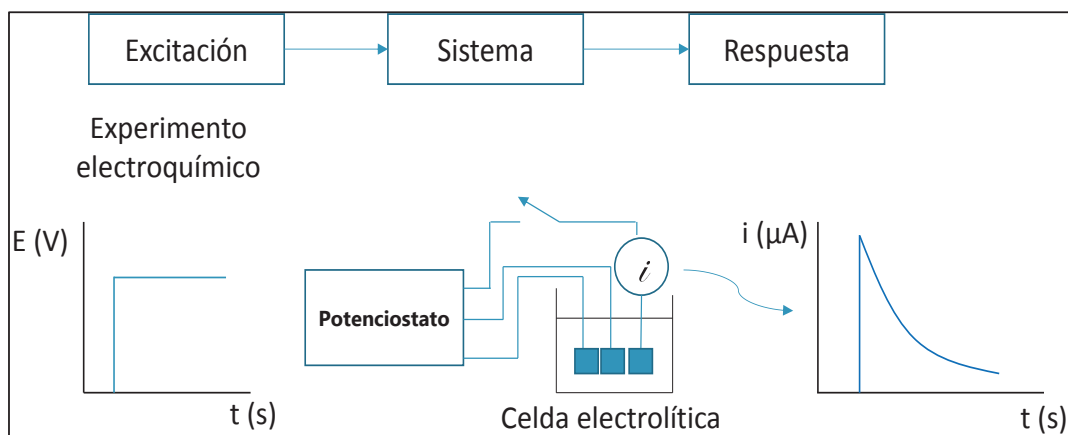
FIGURA 4.3 IMAGEN EN 3D DE LA DISTRIBUCIÓN DE BORO Y DIAMANTE

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2 RESPUESTA Y ELECCIÓN DE LA SEÑAL

4.2.1 Cd II Y Pb II

En el equipo utilizado (potenciostato) la variable independiente es el potencial, el cual se define como una perturbación hacia valores positivos o negativos, partiendo del potencial de equilibrio interno de la celda. Como respuesta de salida el instrumento emite una señal de corriente eléctrica en μA (micro amperios), en forma de pico. La intensidad de corriente es directamente proporcional a la concentración del analito en estudio Fig. 4.4. Para la cuantificación del analito se puede utilizar una de las dos variables del espectro; la altura del pico o el área del pico, por lo que, es importante definir con cuál de las dos se va a trabajar en la validación los cálculos.

FIGURA 4.4 GENERACIÓN DE SEÑAL INSTRUMENTAL

FUENTE: Métodos Electroanalíticos. Bard, Allen J.
ELABORADO POR: Jorge Tafur

Para conocer la variabilidad de la respuesta tanto en la altura de pico como área del pico y poder escoger una de las dos variables para la validación, se preparó 5 soluciones individuales de 5 y 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cd II, estas se midieron mediante ASV, con las respuestas obtenidas se calculó el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) de cada uno de ellos (TABLA 4.1). La señal emitida por el equipo referente a la altura de pico presenta menos variabilidad de medida respecto al área de pico, y al comparar alturas de pico para concentraciones de 5 y 20 ppb se determina que el %CV disminuye conforme aumenta la concentración del analito.

TABLA 4.1 VARIACIÓN DE LA SEÑAL EMITIDA POR EL EQUIPO (ALTURA vs. ÁREA)

# Determinación	SEÑAL DE Cd II EN AMPERIOS (A)			
	ALTURA DEL PICO	ÁREA DEL PICO	ALTURA DEL PICO	ÁREA DEL PICO
	5 ppb		20 ppb	
1	2.046E-07	5.959E-09	4.571E-07	2.812E-08
2	2.496E-07	5.896E-09	4.308E-07	2.375E-08
3	2.462E-07	8.165E-09	4.441E-07	2.235E-08
4	2.448E-07	6.750E-09	4.630E-07	2.540E-08
5	2.800E-07	8.207E-09	4.404E-07	2.495E-08
DES	2.683E-08	1.138E-09	1.297E-08	2.147E-09
media	2.450E-07	6.995E-09	4.471E-07	2.491E-08
%CV	10.95	16.27	2.90	8.62

ELABORADO POR: Jorge Tafur

El mismo estudio se realizó para el caso del Pb II. Se observó un comportamiento similar al del Cd(II) (TABLA 4.2). Donde el %CV es inferior para la variable altura de pico, es decir la dispersión más es baja y la estabilidad de la señal es mayor con respecto a la variable área del pico, por lo que, para el resto de cálculos durante la validación del método (ASV), se utilizará como variable de medida la altura de pico.

TABLA 4.2 SELECCIÓN DE LA SEÑAL (ALTURA/ÁREA)

# Determinación	SEÑAL DE Pd II EN AMPERIOS (A)			
	ALTURA DEL PICO	ÁREA DEL PICO	ALTURA DEL PICO	ÁREA DEL PICO
	5 ppb		20 ppb	
1	4.859E-07	3.045E-08	3.33E-06	2.02E-07
2	4.348E-07	2.291E-08	3.67E-06	2.85E-07
3	4.303E-07	2.740E-08	3.33E-06	2.55E-07
4	4.444E-07	2.573E-08	3.37E-06	2.45E-07
5	4.650E-07	2.800E-08	3.84E-06	2.93E-07
DES	2.314E-08	2.799E-09	2.362E-07	3.611E-08
media	4.521E-07	2.690E-08	3.508E-06	2.559E-07
%CV	5.12	10.40	6.73	14.11

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.2 ESTABILIZACIÓN DE LAS MEDIDAS DE Cd II Y Pb II

Para obtener picos estables y repetibles se exploró las variables más representativas de la técnica (ASV) (tiempo y potencial de preconcentración de los metales en estudio), que permita conseguir una homogeneidad de parámetros en el barrido de muestras preparadas y reales. Para los análisis de repetibilidad (%CV_r) las mediciones se realizaron por triplicado el mismo día para cada nivel de concentración, y para los análisis de reproducibilidad (%CV_R) se realizaron las mismas mediciones una vez por 5 días.

4.2.2.1 Tiempo de preconcentración Cd II y Pb II

Un parámetro muy importante y determinante en la forma de pico es el tiempo de preconcentración, es una variable en la cual los respectivos iones metálicos en estudio se amalgaman con el mercurio (reacción. 4.1) en la superficie del electrodo

de trabajo al ser reducidos. Al momento de oxidar la amalgama (reacción. 4.2) se va a generar la señal de oxidación del metal en estudio, donde la forma del pico de corriente va a depender del tiempo empleado para la preconcentración.

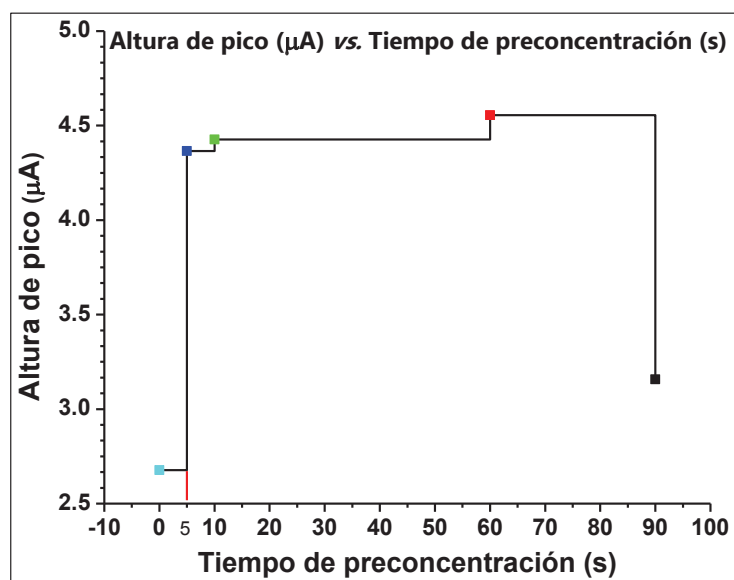


Donde M^{+n} es el metal en estudio (Pb II, Cd II) y mercurio Hg I sirve como reactivo para formar la amalgama.

Se realizaron 5 mediciones y se promedió las lecturas de una solución de 5 ppb de Pb II para tiempos de preconcentración de: 0, 5, 10, 60 y 90 s (Fig. 4.5). Para seleccionar el mejor tiempo de preconcentración del analito en el electrodo de trabajo, se tomó como criterios de selección; al tiempo en el cual se obtuvo la máxima altura de pico de corriente y la mejor simetría del voltamperograma.

Para el criterio de selección del tiempo de preconcentración, altura de pico, se realizaron mediciones sin preconcentración (medición directa) donde la altura de pico de corriente es mínima y por lo tanto el límite de detección es alto. Al realizar la preconcentración aplicando tiempos de 5, 10 y 60 s, el pico de corriente de respuesta aumenta, y por lo tanto el límite de detección es más bajo. Al sobrepasar los 60 s de preconcentración el pico de corriente de respuesta empieza a disminuir (Fig. 4.5). Teniendo en cuenta el segundo criterio de selección del mejor tiempo de preconcentración, forma del pico, se observó que a 5 s de preconcentración la forma de pico de corriente es más simétrica con respecto a las demás, por lo que se tomó a este tiempo como parámetro de validación de la técnica (ASV), para el caso del Pb II y Cd II. Para el tiempo de preconcentración de 60 s se tiene la mayor altura de pico, sin embargo, éste tendría poca reproducibilidad al momento de analizar numerosas muestras.

FIGURA 4.5 SELECCIÓN DEL TIEMPO DE PRECONCENTRACIÓN



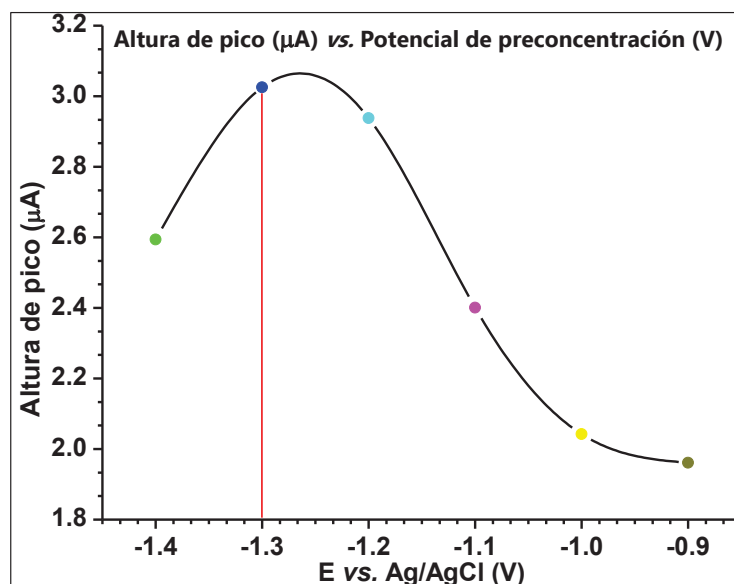
ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.2.2 Potencial de preconcentración de Cd II y Pb II

Un factor crítico a tener en cuenta en la puesta a punto del método es el potencial de preconcentración del metal en estudio, éste tiene que ser mayor al valor del potencial en el cual aparece la señal voltamperométrica de reducción del metal en las condiciones de estudio, por ejemplo: para el Pb(II) el potencial de reducción es $-0.31\text{ V vs. Ag/AgCl}$ y para el Cd (II) es $-0.59\text{ V vs. Ag/AgCl}$ aproximadamente (Arantes *et al.*, 2014), por lo que, si se quiere cuantificar a los dos metales a la vez es necesario aplicar potenciales de preconcentración mayores, por ej. $-1.2\text{ V vs. Ag/AgCl}$ de acuerdo a lo informado en la literatura (Arantes *et al.*, 2014).

En este estudio, para determinar el potencial de preconcentración, se realizó una exploración desde -1.4 hasta -0.9 V (Fig. 4.6) utilizando una solución de 5 ppb de Pb (II). Se encontró que la altura máxima de pico de corriente se obtiene a $-1.3\text{ V vs. Ag/AgCl}$, potencial en el cuál se asegura la reducción y amalgamación de Pb (II) y Cd (II) en la superficie del electrodo de trabajo, seleccionando de esta forma el potencial de preconcentración.

FIGURA 4.6 EPLORACIÓN DEL POTENCIAL DE PRECONCENTRACIÓN



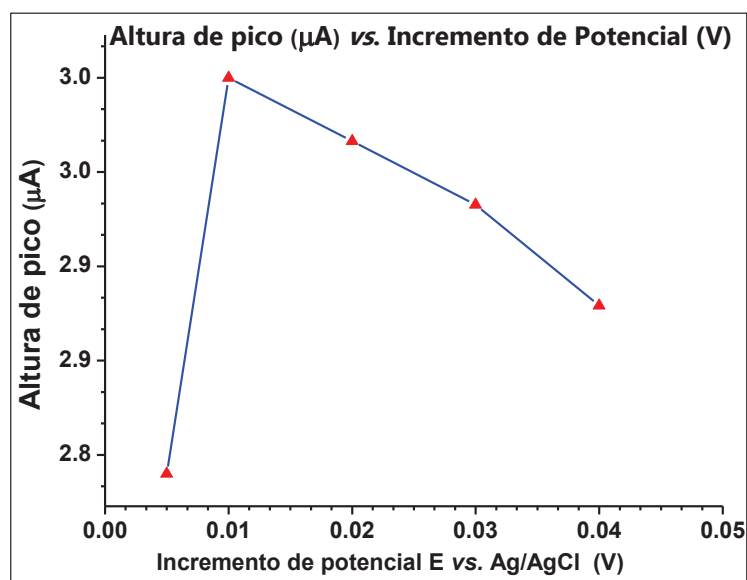
ELABORADO POR: Jorge Tafur

Una vez puesta a punto la preconcentración de los metales, se exploró el rango de potencial de oxidación de éstos desde la amalgama (redisolución), para el caso del plomo el intervalo de barrido de potencial fue desde -1 V y -0.1 V vs. Ag/AgCl, y el de cadmio desde -1 V y -0.5 V vs. Ag/AgCl. Por lo que, si se quisiera determinar nos dos metales [Pb (II) y Cd (II)] en una sola corrida se debe tomar un rango de potencial de oxidación desde -1 V hasta -0.5 V vs. Ag/AgCl.

4.2.2.3 Incremento de potencial de la onda cuadrada

El incremento de potencial es una variación pequeña de éste que se aplica entre cada ciclo de medida en el perfil de la onda cuadrada, se aplicó incrementos de 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.045 V, utilizando una solución de 5 ppb de Cd (II) los cuales no afectaron en forma significativa a la forma y altura de pico de corriente, se selecciona 0.01 que genera una altura ligeramente mayor en relación al resto de incrementos (Fig. 4.7).

FIGURA 4.7 MODULACIÓN DEL INCREMENTO DE POTENCIAL



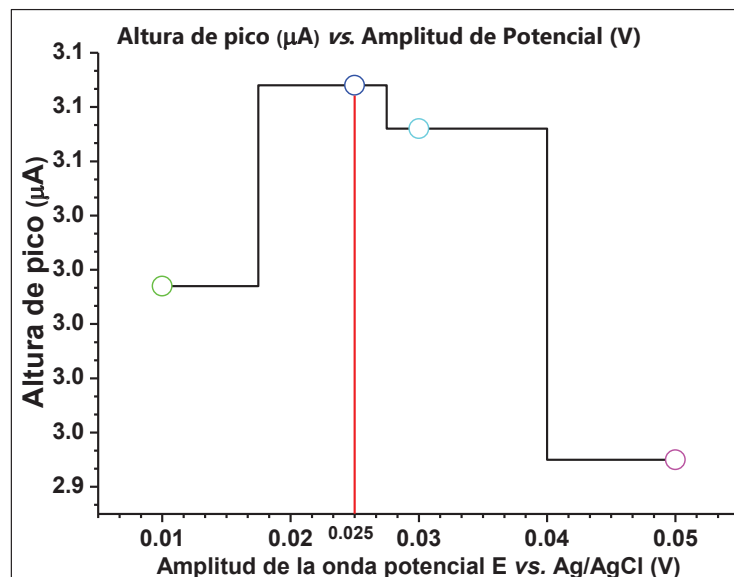
ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.2.4 Amplitud de la onda cuadrada de potencial

Dentro de las variables que se pueden modificar en la voltamperometría de onda cuadrada para obtener una buena definición y altura de pico se encuentra la variable, amplitud onda de potencial. Se impuso valores de 0.01, 0.025, 0.03 y 0.05 V vs. Ag/AgCl (Fig. 4.8).

En todos los casos no se observó una variación significativa ni del pico, ni del área de pico. Sin embargo, se selecciona una amplitud de potencial de 0.025 V vs. Ag/AgCl, ya que a este valor la señal es ligeramente mayor respecto de las otras.

FIGURA 4.8 MODULACIÓN DE LA AMPLITUD DE LA ONDA DE POTENCIAL



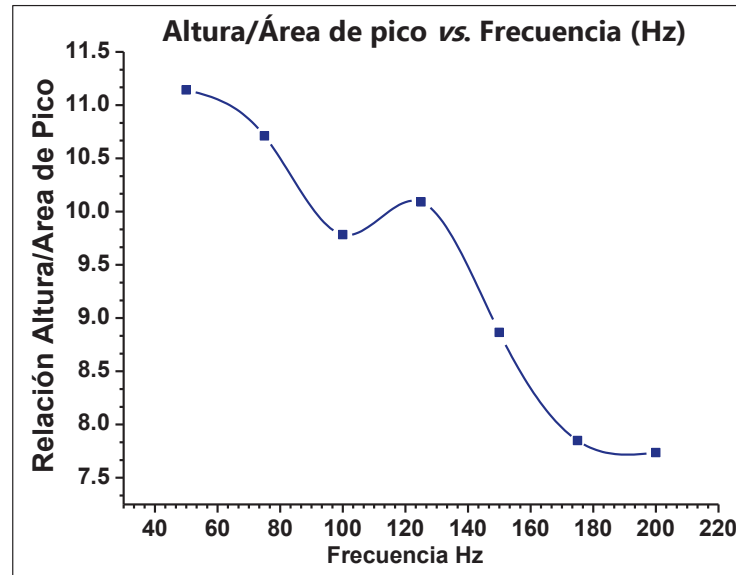
ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.2.5 Frecuencia de imposición del potencial de la onda cuadrada

La frecuencia de imposición del potencial de onda cuadrada en la voltamperometría de onda cuadrada tiene alta influencia en la simetría del pico según lo informado en la literatura (Suteerapataranon, Jakmunee, Vaneesorn, & Grudpan, 2002).

La relación área/pico debería ser alrededor de 9 para que la forma del pico sea homogénea, por lo que, se realizó mediciones a diferentes frecuencias (50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 Hz) (Fig. 4.9), utilizando una solución de Cd (II) de 5 ppb y manteniendo el resto de variables constantes. Se encontró a 100 Hz la relación área/pico es la idónea.

FIGURA 4.9 SELECCIÓN DE LA FRECUENCIA



ELABORADO POR: Jorge Tafur

Una vez puesto a punto todas las variables del método (ASV), en la TABLA 4.3 y en la Tabla 4.4 se muestra un resumen de éstas. Las variables escogidas se utilizarán en todas las curvas tanto para las disoluciones preparadas a partir de estándares de Cd (II) y Pb (II), como para el caso de muestras reales.

TABLA 4.3 PARAMETROS DE LA SWV PARA Cd (II) Y Pb (II)

Condiciones experimentales de la Voltametría de Onda Cuadrada	
Potencial Inicial <i>Init E (V)</i>	-1
Potencial final <i>Final E(V)</i>	-0.1
Incremento <i>Incr E(V)</i>	0.01
Amplitud <i>Amplitude (V)</i>	0.025
Frecuencia <i>Frequency (Hz)</i>	100
Tiempo de reposo <i>Quiet Time (sec)</i>	5
Sensibilidad <i>Sensitivity (A/V)</i>	1×10^{-4}

ELABORADO POR: Jorge Tafur

TABLA 4.4 TIEMPO DE PRECONCENTRACIÓN DE Cd (II) Y Pb (II)

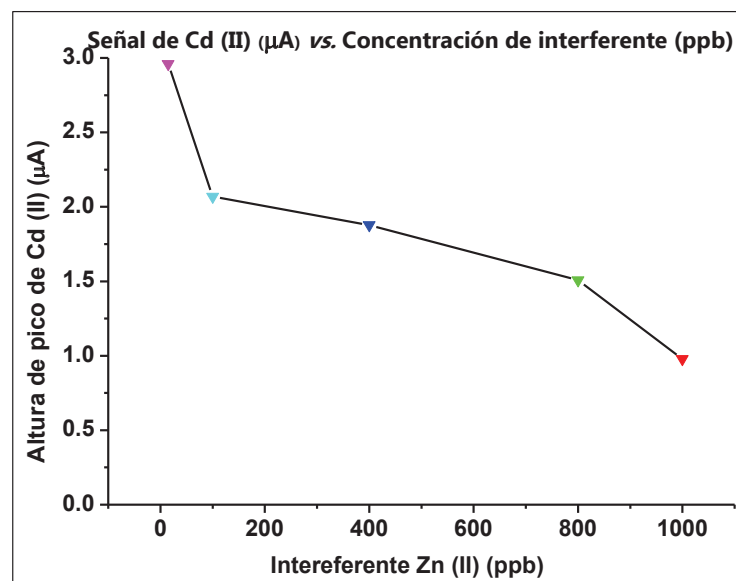
PRIMER PASO	
Potencial (V)	0.4
Tiempo (s)	5
SEGUNDO PASO	
Potencial (V)	-1.3
Tiempo (s)	5
TERCER PASO	
Potencial (V)	-0.9
Tiempo (s)	5

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.2.6 Interferentes

El principal interferente de Cd (II) es el Zn (II) que se lo determina a potenciales cercanos al de cadmio, lo cual ocasiona la disminución de la señal de éste. (Fig. 4.10).

FIGURA 4.10 INTERFERENCIA DE Zn (II) EN LA SEÑAL DE Cd (II)

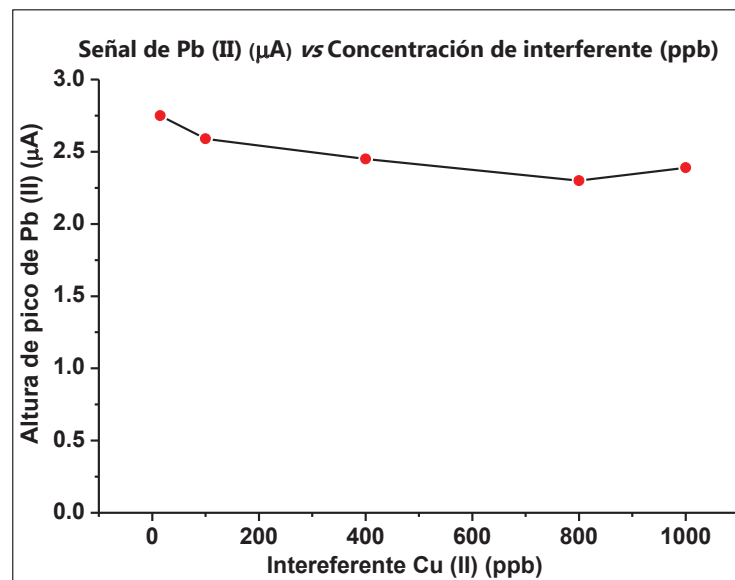


ELABORADO POR: Jorge Tafur

Al someter a una solución de 5 ppb de Cd (II) a diferentes concentraciones del interferente (Zn II), se observa que la altura de pico de corriente del cadmio disminuye hasta un 50% para concentraciones mayores a 800 ppb de Zn (II), con un efecto directo en el límite de detección y cuantificación del analito.

En la Fig. 4.11 se muestra el comportamiento de una solución de 5 ppb de Pb (II) a la que se le adicionó diferentes concentraciones de Cu (II) (15, 100, 400, 800 y 1000 ppb) que es el principal interferente para este analito, la altura de pico de plomo no se ve mayormente afectada con concentraciones de hasta 1000 ppb de Cu (II).

FIGURA 4.11 ININTERFERENCIA DE Cu (II) EN LA SEÑAL DE Cd (II)



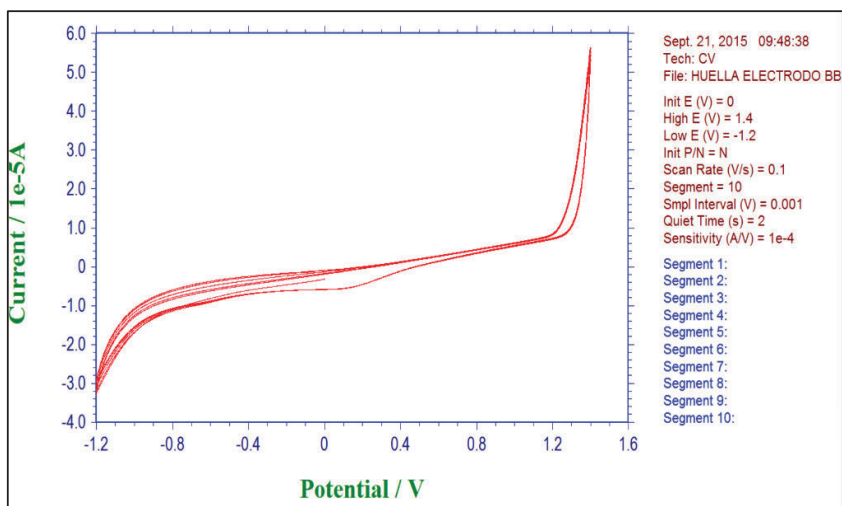
ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.3 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN Cd II Y Pb II

Para asegurarse que el electrodo de trabajo es el idóneo para detectar Cd II, Pb II y Hg II se determina la ventana de trabajo, (Pleskov et al., 2015) que es el rango de potencial en cual el electrodo de trabajo emite una respuesta eléctrica y puede detectar cualquier analito que se manifieste dentro de dicho intervalo, para este fin se realiza una voltametría cíclica en medio ácido, en el Fig. 4.12 se presenta la ventana de trabajo para el electrodo de diamante dopado con boro (BDD) el cual

abarca un rango de potencial de -1.2 a 1.3 voltios de tal forma que sirve para detectar los analitos mencionados.

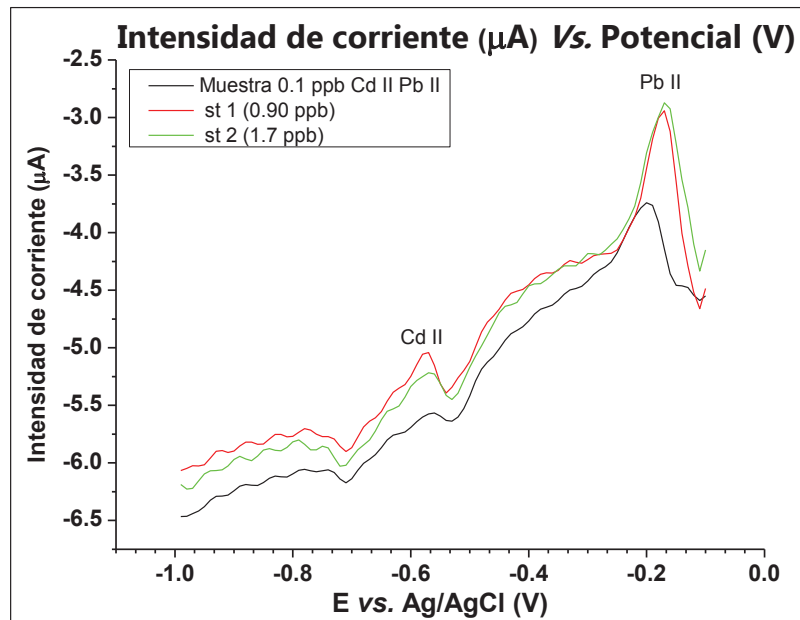
FIGURA 4.12 VENTANA DE TRABAJO DEL ELECTRODO DE BDD



ELABORADO POR: Jorge Tafur

Para determinar los límites de detección y cuantificación de Cd (II) y Pb (II) se preparó una solución de $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de los dos metales, concentración mínima que el equipo pudo registrar una señal bajo condiciones de repetibilidad (Duffau, Guerrero, et al., 2010), en la Fig. 4.13 se muestra las señales de Cd II a un potencial de -0.54 V y -0.18 V para Pb II.

FIGURA 4.13 SEÑAL GENERADA POR 0.1 ppb DE Cd II y Pb II



ELABORADO POR: Jorge Tafur

Según los estudios realizados por (Fischer & van den Berg, 1999) los potenciales característicos de manifestación de Cd (II) son de -0.60 a -0.75 y para Pb (II) de -0.50 a -0.55 utilizando electrodos de carbón vítreo, sin embargo al utilizar diamante dopado con boro (BDD) como electrodo de trabajo y soluciones de baja concentración existe un desplazamiento de los picos hacia valores de menor electronegatividad.

Se determinó la concentración de 10 muestras individuales preparadas con $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cd (II) y Pb (II) y se calculó los parámetros de detección y cuantificación, en la TABLA 4.5 se muestra los valores mínimos de concentración que el método es capaz de detectar y cuantificar. En el ANEXO 1 se presentan las curvas de adición del estándar para cada nivel de evaluación (5, 10, 15 y 20 ppb).

TABLA 4.5 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE Cd (II) y Pb (II)

Concentración ppb	
Cd (II)	Pb (II)
0.39	0.23
0.50	0.61
0.51	0.43
0.23	0.47
0.30	0.13
0.33	0.60
0.50	0.28
0.25	0.36
0.37	0.49
0.27	0.28
Media \bar{x}	
0.37	0.39
Desviación estándar σ	
0.11	0.16
Límite de detección L_D ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
0.69	0.86
Límite de cuantificación L_c ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
1.45	1.97

ELABORADO POR: Jorge Tafur

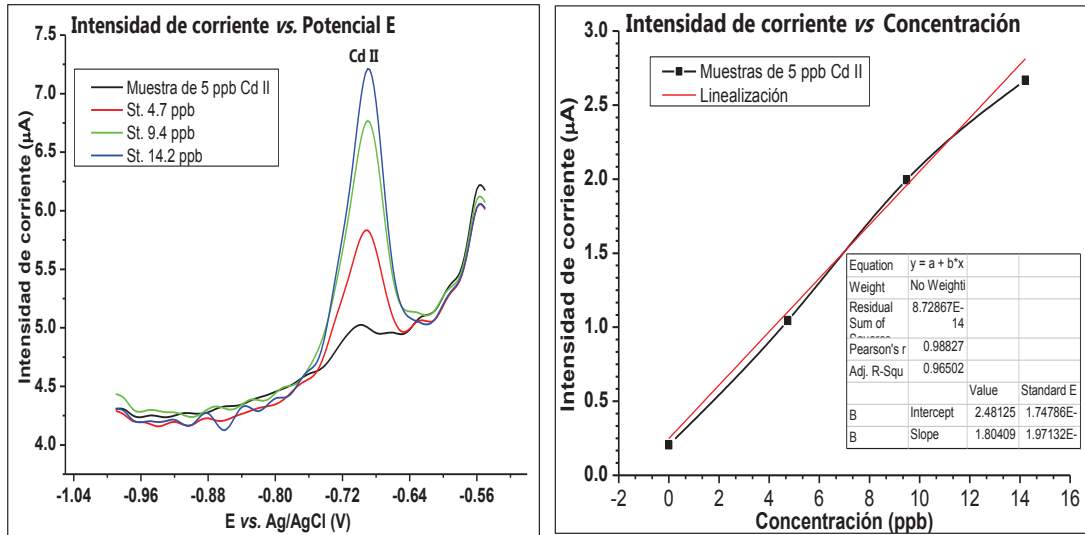
Si bien el equipo (potenciostato) es capaz de detectar y cuantificar concentraciones de Cd (II) y Pb (II) inferiores a $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ con alta confiabilidad el primer nivel a evaluar es de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$, con el que se conseguirá mayor certeza en el valor de sus resultados debido a que aumenta la cantidad del analito, este valor se planteó en los objetivos de validación en base a la legislación del TULSMA.

4.2.4 SEÑALES DE RESPUESTA E INTERVALO LINEAL PARA Cd (II)

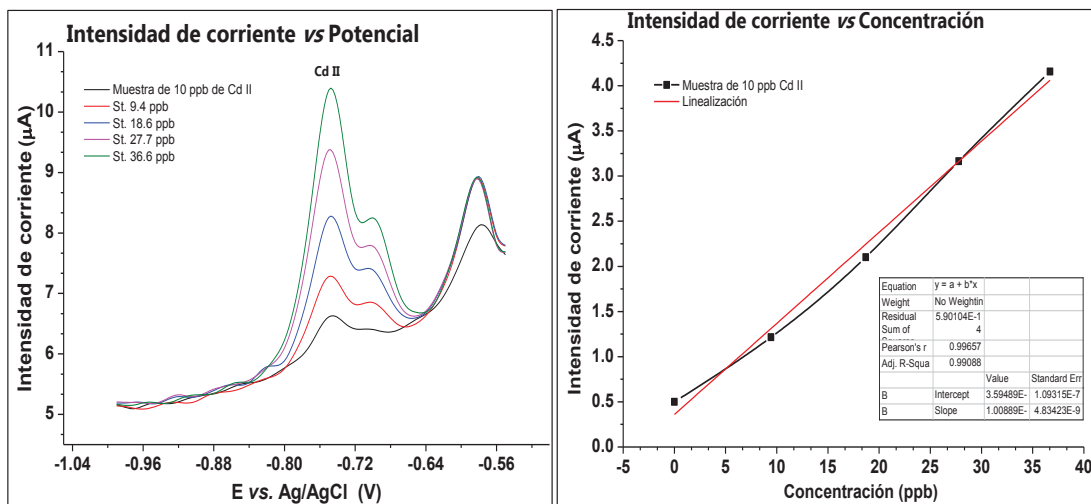
Con el fin de evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del Cd (II) se analizó tres muestras diarias de concentraciones preparadas durante cinco días para cada nivel (5, 10, 15, y 20 ppb) las curvas de adición y su linealidad para 5 y 10 ppb de Cd (II) se presentan en la Fig. 4.14. El resto de curvas se presentan en el ANEXO 2.

FIGURA 4.14 CUANTIFICACIÓN DE 5 ppb Y 10 ppb DE Cd (II)

(a) 5 ppb Cd (II)



(b) 10 ppb Cd (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

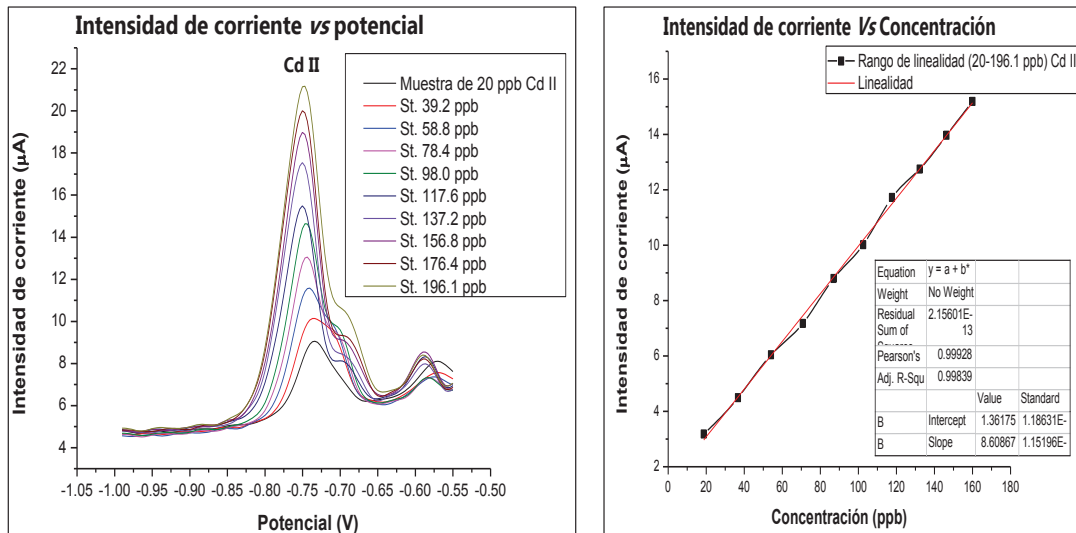
En el Fig. 4.14 se presentan la determinación de 5 y 10 ppb de Cd (II) con coeficientes de linealidad de 0.988 y 0.998 respectivamente, la correlación de la muestra de 5 ppb se la puede aumentar al incrementar uno o dos puntos de adición.

Existe un leve desplazamiento del potencial de la muestra de 10 ppb respecto a la de 5 ppb en aproximadamente 0.05 V, pero las dos señales se mantienen en el

rango de la emisión de 0.6 a 0.75 V aproximadamente según (Fischer & van den Berg, 1999).

Se comprobó la linealidad para concentraciones mayores a 20 ppb de Cd (II) (Fig. 4.15), realizando adiciones del estándar hasta 196 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ con un coeficiente de correlación de 0.999, al explorar altas concentraciones de Cd II las medidas de corriente se estabilizan y la linealidad aumenta.

FIGURA 4.15 CUANTIFICACIÓN DE Cd (II) MAYOR A 20 ppb



ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.5 ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE (ANOVA) PARA Cd (II)

En la TABLA 4.6 se presentan todas las variables tomadas en cuenta al momento de elaborar el diseño experimental y los niveles a los cuales se trabajó.

TABLA 4.6 CATERÍSTICAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DE Cd (II)

Factor:	Día de validación (Di)	
Tratamientos:	D1, D2, D3, D4, D5	
Unidad experimental:	AGUA	
Variable respuesta:	Corriente, Amperios (A)	
Nivel de significancia:	0.05	
Modelo:	Diseño a un criterio de clasificación	
Hipótesis:	Ho: No existe diferencia significativa en la concentración de cadmio determinada en agua, por efecto del día de validación	
Estadística de prueba:	$F_c = DCM_B / DCM_W$	
Criterio de decisión:	Rechazar la hipótesis nula si $F_c > F_t$	
Número de tratamientos (a):	5	
Número de repeticiones (n):	3	
Número total de observaciones (N):	15	
Nivel de validación 1	5.0	ppb
Nivel de validación 2	10.0	ppb
Nivel de validación 3	15.0	ppb
Nivel de validación 4	20.0	ppb

ELABORADO POR: Jorge Tafur

Los resultados de las concentraciones de Cd (II) con la técnica de redisolución anódica en los cuatro niveles de concentración durante cinco días se presentan en la TABLA 4.7.

TABLA 4.7 CUANTIFICACIÓN DE Cd (II)

Nivel (µg/L)	Días de validación				
	D1	D2	D3	D4	D5
5.0	3.66	4.47	4.86	5.39	4.64
	5.67	4.36	4.64	4.73	4.21
	4.22	6.76	5.15	3.69	3.95
10.0	9.70	9.85	10.97	10.83	9.59
	11.02	10.83	9.28	10.48	10.44
	12.34	10.61	10.95	10.41	9.78
15.0	16.01	14.39	15.94	14.85	14.71
	14.55	15.62	15.43	14.25	15.05
	14.25	14.19	14.95	14.29	14.19
20.0	21.51	19.39	21.12	19.03	20.24
	21.71	19.42	19.72	21.04	20.99
	21.54	19.67	19.73	20.99	19.08

ELABORADO POR: Jorge Tafur

En el ANOVA, la hipótesis nula supone que todas las muestras se extraen de una población de media μ y varianza σ^2 (desconocidas). Así pues, este análisis presupone condiciones de normalidad y homogeneidad de las varianzas de los grupos que vamos a comparar (ASECAL, 2012), por lo que lo primero se examinó las varianzas experimentales s_i^2 para comprobar si son o no homogéneas.

4.2.5.1 Homogeneidad de varianza de Cd (II)

La prueba de Cochran, es aplicable para examinar la homogeneidad de las varianzas S_i^2 de un conjunto de k grupos del mismo tamaño p (Nota: Si los grupos tuvieran tamaños distintos, deberíamos aplicar una prueba distinta, por ejemplo la de Bartlett) se aplica el siguiente estadístico:

$$\hat{C}_{Cochran} = \frac{S_{max}^2}{S_1^2 + S_2^2 + \dots + S_k^2} \quad (4.2)$$

Donde $\hat{C}_{Cochran}$ es la variabilidad experimental que se obtiene de la relación entre la varianza máxima S_{max}^2 y la sumatoria de las varianzas individuales S_k^2 de los tratamietos, se compara frente a un $G_{tabulado}$ con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ el criterio a decidir es si $\hat{C}_{Cochran} < G_{tab}$ las varianzas son homogéneas.

TABLA 4.8 TEST DE COCHRAN HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS

Nivel ($\mu\text{g/L}$)	Test de Cochran		Conclusión
	$\hat{C}_{Cochran}$	G_{tab}	
5.0	0.478	0.6838	Las varianzas son homogéneas
10.0	0.544	0.6838	Las varianzas son homogéneas
15.0	0.435	0.6838	Las varianzas son homogéneas
20.0	0.449	0.6838	Las varianzas son homogéneas

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.5.2 Test de Kolmogorov-Smirnov (Normalidad) de Cd (II)

La prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra se considera un procedimiento de "bondad de ajuste", es decir, permite medir el grado de concordancia existente entre la distribución de un conjunto de datos y una

distribución teórica específica. Su objetivo es señalar si los datos provienen de una población que tiene la distribución teórica especificada, en nuestro caso distribución normal (TABLA 4.9)

TABLA 4.9 TEST DE KOLMOGOROV-SMIRNOV (NORMALIDAD)

Nivel µg/L	Promedio µg/L	Desviación estándar (s)	Valor máximo (D _{máx}) F _i - z _n	D _{crit}	Conclusión
5.0	4.69	0.810	0.150	0.337	Se ajusta a una distribución normal
10.0	10.47	0.766	0.172	0.337	Se ajusta a una distribución normal
15.0	14.84	0.640	0.161	0.337	Se ajusta a una distribución normal
20.0	20.34	0.960	0.207	0.337	Se ajusta a una distribución normal

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.5.3 Prueba de Fisher de Cd (II)

Mediante la prueba de Fisher se puede determinar si los tratamientos (día de análisis) son o no homogéneos el criterio para aceptar la hipótesis nula Ho (no hay diferencia significativa en la concentración de cadmio II por efecto del día de validación) es cuando $F_{cal} < F_{tab}$ (TABLA 4.10)

TABLA 4.10 RESULTADOS DE LA PRUEBA F

Nivel	F _c	F _t	Conclusión
5.0	0.502	3.478	Se acepta la hipótesis nula
10.0	0.712	3.478	Se acepta la hipótesis nula
15.0	1.033	3.478	Se acepta la hipótesis nula
20.0	2.999	3.478	Se acepta la hipótesis nula

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.5.4 Repetibilidad y reproducibilidad de Cd (II)

Los límites de repetibilidad y reproducibilidad se los puede expresar como desviación estándar o coeficiente de variación a éstos parámetros de referencia se los obtiene de trabajos similares o según se los haya planteado en los objetivos de validación, cabe señalar que el coeficiente de variación calculado para la repetibilidad debe ser igual o menor al coeficiente de variación para la

reproducibilidad. En las TABLAS 4.11 y 4.12 se presentan los resultados de cumplimiento de la precisión (repetibilidad y reproducibilidad).

TABLA 4.11 LÍMITE DE REPETIBILIDAD DEL ENSAYO PARA Cd (II)

Nivel	CV (%)	Límite CV (%)	Conclusión
5.00	14.63	15	Cumple el objetivo de validación
10.00	7.63	15	Cumple el objetivo de validación
15.00	4.29	15	Cumple el objetivo de validación
20.00	0.50	15	Cumple el objetivo de validación

ELABORADO POR: Jorge Tafur

TABLA 4.12 LÍMITE DE REPRODUCIBILIDAD DEL ENSAYO PARA Cd (II)

Nivel	CV (%)	Límite CV(%)	Conclusión
5.00	18.63	20	Cumple el objetivo de validación
10.00	7.63	20	Cumple el objetivo de validación
15.00	4.31	20	Cumple el objetivo de validación
20.00	0.65	20	Cumple el objetivo de validación

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.5.5 Veracidad de Cd (II)

La veracidad se la calcula a través del sesgo mediante dos formas: la primera comparando respecto a un material de referencia certificado MRC y la segunda respecto a otro método validado, en nuestro caso se lo realizó en base a éste último gracias al apoyo del INAMHI (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología), las muestras que fueron analizadas mediante ICP (Plasma de Acoplamiento Inductivo).

Con los resultados obtenidos se realiza una prueba de significancia t (Student) para comprobar si el sesgo es aceptable o no con una probabilidad del 0.05%, bajo la condición que si $t_{\text{calculado}} < t_{\text{critico}}$ entonces el sesgo es aceptable.

La veracidad se la realizó únicamente para Cd (II) y Pb (II), el Hg (II) no fue posible analizarlo debido a que mencionado laboratorio no tiene la acreditación para este analito.

El sesgo se realizó para niveles de 3 y 5 ppb que son las concentraciones más bajas, en los siguientes niveles no fue posible realizarlos debido al costo que implica este tipo de análisis, la evaluación se la ejecutó durante cuatro días por triplicado

TABLA 4.13

TABLA 4.13 RESULTADOS DE 3 ppb DE Cd (II) ANALIZADOS POR ICP

Resultados obtenidos de la variable respuesta por ICP (Cd II)				
Nivel ppb	Días de determinación			
	día	día	día	día
	1	2	3	4
3	3.18	3.03	3.13	3.14
	3.45	3.59	3.56	3.91
PROMEDIO	3.32	3.31	3.34	3.526

ELABORADO POR: Jorge Tafur

En la TABLA 4.14 se presenta el sesgo en valor absoluto de cada lectura diaria respecto al nivel de análisis (3 ppb).

TABLA 4.14 SEGOS PROMEDIOS POR DÍA PARA 3 ppb DE Cd (II)

Resultados obtenidos de los sesgos de la variable respuesta por ICP				
Nivel ppb	Días de determinación			
	día	día	día	día
	1	2	3	4
3	0.18	0.03	0.13	0.14
	0.45	0.59	0.56	0.91
PROMEDIO SEGOS	0.32	0.31	0.34	0.52

ELABORADO POR: Jorge Tafur

Con la prueba t-Student se evaluó la hipótesis nula de que la media de la población estudiada es igual a un valor especificado o verdadero μ_0 (se utiliza como valor verdadero al promedio de todas las lecturas analizadas por ICP), se hace uso del estadístico:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s/\sqrt{n}} \quad (4.3)$$

Donde t es el estadístico de Student, \bar{x} es la media de lecturas determinadas por voltametría de redisolución anódica, μ_0 es la media de los resultados obtenidos por ICP, s es la desviación estándar de las concentraciones y n el tamaño de muestra.

En la TABLA 4.15 y 4.16 se llega a la conclusión que el sesgo que se produce en la medida por los métodos mencionados es aceptable para 3 y 5 ppb de Cd II, es decir el promedio de los valores de concentración determinados por voltametría de redisolución anódica se encuentran próximos o cercanos estadísticamente al promedio de los resultados de concentración determinados por ICP considerados a estos últimos como valor verdadero o real debido a que es un método acreditado en el SAE (Sistema de Acreditación Ecuatoriano).

TABLA 4.15 ANÁLISIS DE SESGO 3 ppb Cd (II)

<i>Nivel ppb</i>	<i>Media Nivel ppb</i>	<i>S (desviación estándar)</i>	<i>t_{cal}</i>	<i>t_{crí}</i>	<i>Conclusión</i>
3	3.37	0.10	5.31	12.70	El sesgo es aceptable

ELABORADO POR: Jorge Tafur

TABLA 4.16 ANÁLISIS DE SESGO 5 ppb Cd (II)

<i>Nivel ppb</i>	<i>Media Nive ppb</i>	<i>S (desviación estándar)</i>	<i>t_{cal}</i>	<i>t_{crí}</i>	<i>Conclusión</i>
5	5.81	0.34	3.38	12.70	El sesgo es aceptable

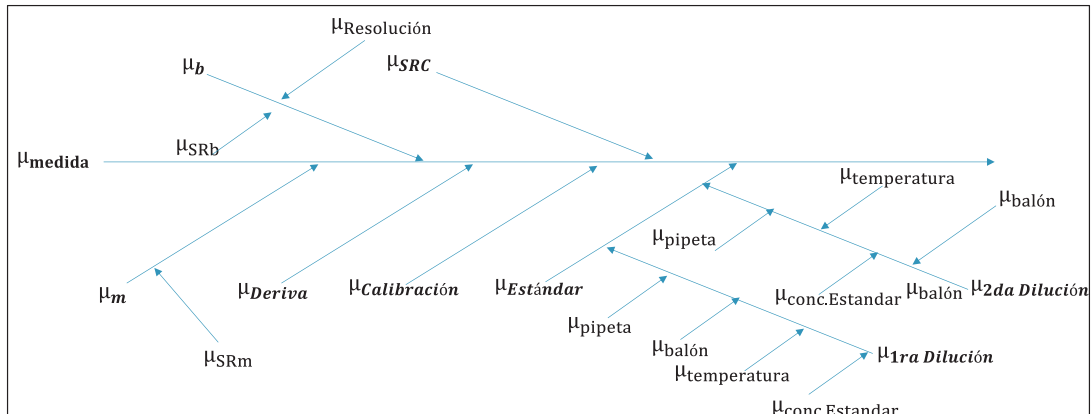
ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.5.6 Exactitud de Cd (II)

La incertidumbre de una medición es el parámetro asociado al resultado, es decir, caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al mesurando (Duffau, Guerrero, et al., 2010).

En este sentido, es importante que para un método validado o verificado por el laboratorio, se realice la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presente, en la Fig. 4.16 se representan las posibles causas que generan incertidumbre a lo largo de todo el proceso de medida de Cd (II), Pb (II) y Hg (II).

FIGURA 4.16 FUENTES DE INCERTIDUMBRE DE MEDIDA DE Cd (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

Donde μ_{medida} es la incertidumbre típica de medida asociada a las siguientes fuentes de incertidumbres: pendiente (m), intersección al origen (b), varianza de la pendiente (SRm), varianza de la intersección al origen (SRb), deriva, calibración, estándar, 1ra dilución, 2da dilución, balones, temperatura y pipetas. Se calcula a partir de la Ec.4.4

$$\mu_{medida} = \sqrt{(\mu_b^2 \times C_b^2) + (\mu_m^2 \times C_m^2) + \mu_{SRc}^2 + \mu_{deriva}^2 + \mu_{calibración}^2 + \mu_{estandar}^2} \quad (4.4)$$

Donde:

μ_b = Es la sumatoria de la Incertidumbre típica de: calibración, deriva, resolución, estándar, pipetas, balones y varianza.

C_b = Es el coeficiente de sensibilidad de la ordenada al origen

μ_m = Es la incertidumbre de la varianza para la pendiente

C_m = Es el coeficiente de sensibilidad de la pendiente

μ_{SRc}^2 = Incertidumbre de la varianza de las concentraciones

Se calculó la incertidumbre para el nivel de 5 ppb de cadmio que es probablemente el valor de incertidumbre más grande dentro de los niveles de evaluación debido a su mínima concentración.

En la TABLA 4.17 se presentan las incertidumbres para Cd (II) asociados a cada repetición y su promedio reportado como incertidumbre expandida, el ejemplo de cálculo de la incertidumbre se presenta en el ANEXO 8.

TABLA 4.17 INCERTIDUMBRE TÍPICA DE 5 ppb DE Cd (II)

DETERMINACIÓN	INCERTIDUMBRE TÍPICA (μ)				
	D1	D2	D3	D4	D5
1	1.05	1.33	0.46	0.98	0.74
2	1.05	1.33	0.46	0.98	0.74
3	1.05	1.33	0.46	0.98	0.74
PROMEDIO	0.91 $\mu\text{g.L}^{-1}$				
U_{EXPA}	1.83 $\mu\text{g.L}^{-1}$				

ELABORADO POR: Jorge Tafur

$$U_{\text{EXPANDIDA}} = k \times \mu_{\text{TÍPICA}} \quad (4.5)$$

$$k = 2$$

Donde k es el factor de cobertura o factor de transformación a incertidumbre expandida.

$$U_{\text{EXPANDIDA}} = 2 \times 0.91 = 1.83 \text{ ppb} \sim 36.6\%$$

El 36.63 % representa el máximo valor de incertidumbre en los cuatro niveles de validación de Cd (II) que se obtiene a partir del nivel mas bajo de concentración (5 ppb), ya que este abarca mayor cantidad de errores y en comparación con el objetivo de validación éste se sobrepasa en 1.63% de lo planteado.

4.2.5.7 Muestra Certificada para Cd (II)

La muestra certificada sólida se la secó a 102 °C durante 24 horas, luego se la disolvió en una mezcla de ácido clorhídrico y nítrico puros en relación 1:1 y se aforó a 250 mL, se realizó una disolución de 100 veces debido a q la señal de pico que originalmente se obtenía era de gran magnitud, a esta última solución se la analizó como una muestra individual según el procedimiento para cada metal.

En la TABLA 4.18 se detalla el cálculo de la concentración del material de referencia. Y en la Fig. 4.17 se muestra las señales de adición de un estándar certificado de cadmio (II).

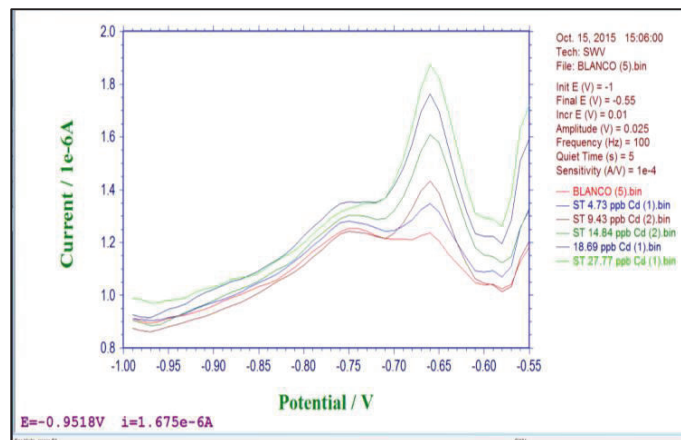
Esta muestra certificada nos garantiza exactitud y precisión al momento de analizar muestras reales de concentración desconocida, debido a que el valor encontrado en esta muestra certificada se aproxima al valor declarado en su certificado que está en el rango de 0.216 a 0.228 mg/Kg que se encuentra en el ANEXO 6.

TABLA 4.18 MUESTRA CERTIFICADA DE Cd (II)

Concentración ppb	Señal
0	6.686E-08
4.739	1.731E-07
9.433	2.904E-07
14.08	3.934E-07
18.69	4.969E-07
27.77	6.881E-07
Pendiente (m)	2.25E-08
interseccion (a)	7.16E-08
Correlación R^2	0.9995884
Factor de dilución	263
concentracion ppb	837.26
Concentración mg/Kg	0.21

ELABORADO POR: Jorge Tafur

FIGURA 4.17 Cd (II) DE UNA MUESTRA CERTIFICADA



ELABORADO POR: Jorge Tafur

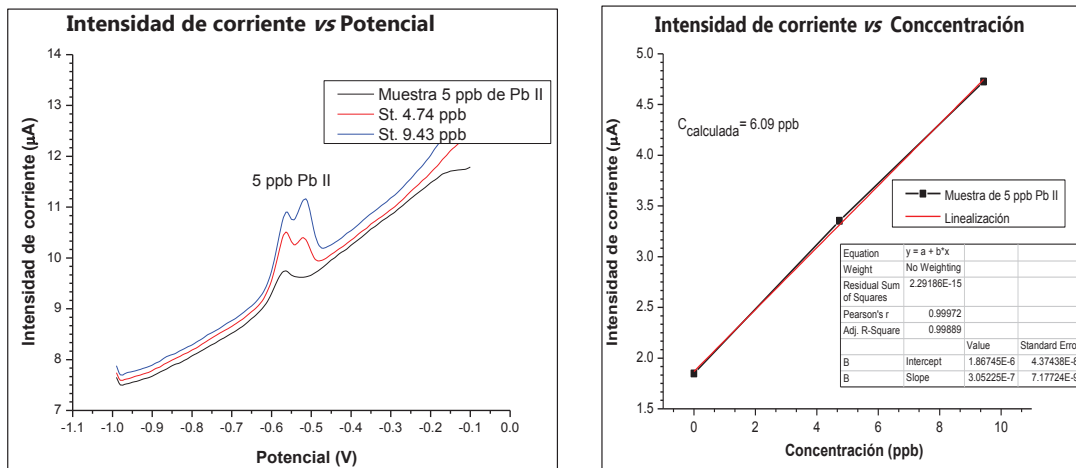
4.2.6 SEÑALES DE RESPUESTA E INTERVALO LINEAL PARA Pb (II)

En la Fig. 4.18 se presentan las señales y coeficientes de correlación en muestras preparadas de 5 y 10 ppb de Pb (II), para concentraciones de 15 y 20 ppb ver ANEXO 3.

La linealidad como coeficiente de correlación en 5 y 10 ppb se ajustan a los objetivos de validación 0.99, los potenciales característicos en los cuales se manifiesta Pb II están entre -0.50 y -0.55 según (Arantes et al., 2014) con un estándar certificado y trazable se comprobó la concentración durante cinco días por triplicado en muestras de 5, 10, 15 y 20 ppb de Pb (II).

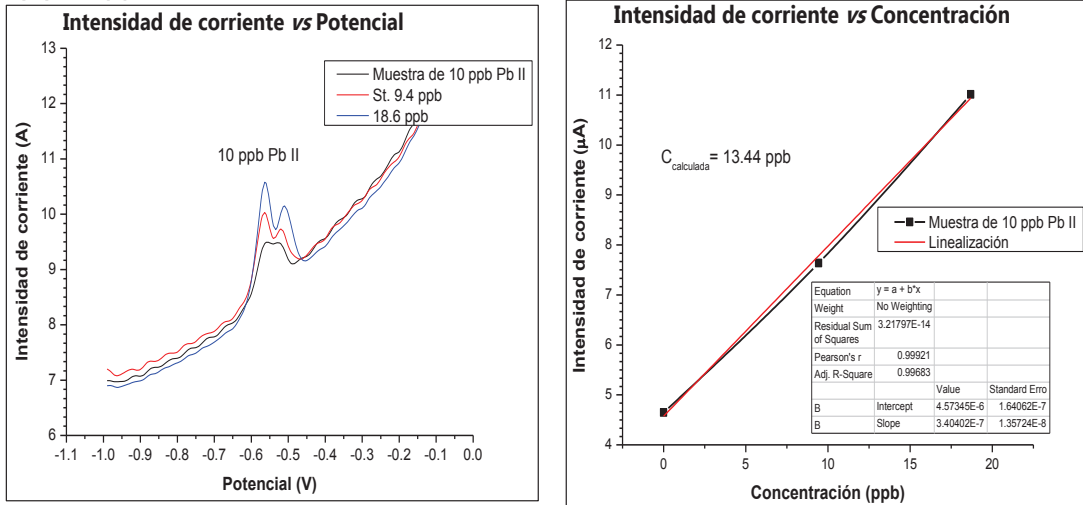
FIGURA 4.18 CUANTIFICACIÓN DE 5 ppb Y 10 ppb DE Pb (II)

(a) 5 ppb



ELABORADO POR: Jorge Tafur

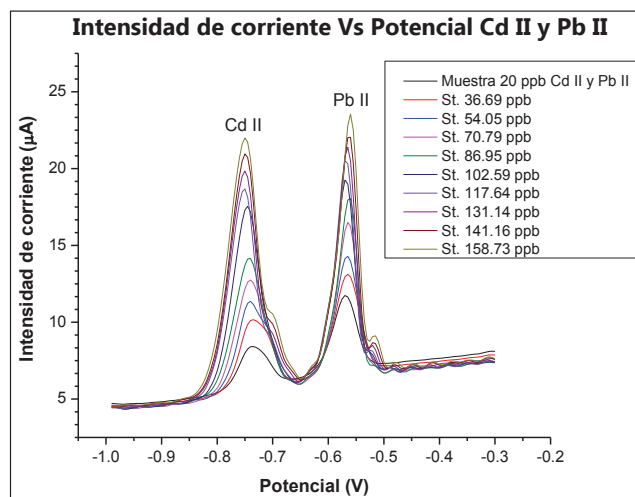
(b) 10 ppb



ELABORADO POR: Jorge Tafur

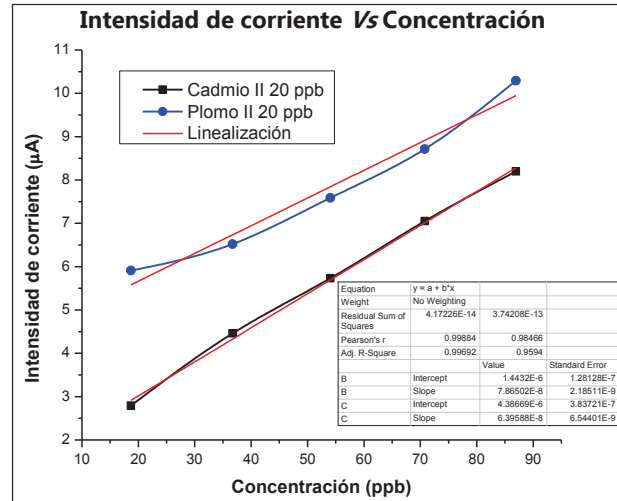
Es posible determinar Cd (II) y Pb (II), en un solo análisis, ya que los potenciales de estos dos metales en mención se encuentran muy cercanos y el electrolito de soporte es el mismo (acetato de amonio). Como se muestra en la Fig. 4.19 se preparó una solución de 20 ppb con los dos analitos y se realizó adiciones hasta concentraciones de 158 ppb aproximadamente se obtuvo linealidades mayores a 0.99 como coeficiente de correlación (r^2) Fig. 4.20

FIGURA 4.19 MUESTRA DE 20 ppb DE Pb (II) Y Cd (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

FIGURA 4.20 LINEALIDAD DE 20 ppb DE Cd (II) Y Pb (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.7 ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE (ANOVA) PARA Pb (II)

Las características del diseño experimental para determinar la repetibilidad y reproducibilidad del Pb II se presentan en la TABLA 4.19

TABLA 4.19 CARACTERÍSTICAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL Pb (II)

Factor:	Día de validación (Di)	
Tratamientos:	D1, D2, D3, D4, D5	
Unidad experimental:	AGUA	
Variable respuesta:	Corriente, Amperios (A)	
Nivel de significancia:	0.05	
Modelo:	Diseño a un criterio de clasificación	
Hipótesis:	Ho: No existe diferencia significativa en la concentración de plomo determinada en el agua, por efecto del día de validación	
Estadística de prueba:	$F_c = DCM_B / DCM_w$	
Criterio de decisión:	Rechazar la hipótesis nula si $F_c > F_t$	
Número de tratamientos (a):	5	
Número de repeticiones (n):	3	
Número total de observaciones (N):	15	
Nivel de validación 1	5.0	ppb
Nivel de validación 2	10.0	ppb
Nivel de validación 3	15.0	ppb
Nivel de validación 4	20.0	ppb

ELABORADO POR: Jorge Tafur

En la TABLA 4.20 se presentan las concentraciones de los cuatro niveles (5, 10, 15 y 20 ppb Pb(II) de validación, se realizó tres repeticiones diarias durante cinco días cada concentración para analizar el efecto que tiene el día de análisis sobre los resultados.

TABLA 4.20 CONCENTRACIÓN DE Pb (II) POR SWV

Nivel (µg/L)	Días de validación				
	D1	D2	D3	D4	D5
5.0	5.11	5.22	4.08	4.13	4.83
	5.37	5.16	4.94	4.37	5.07
	5.75	4.16	5.56	4.27	4.65
10.0	11.48	10.27	10.65	10.15	10.34
	11.43	11.98	9.09	11.48	10.27
	11.34	10.97	10.21	10.43	10.98
15.0	13.45	16.66	14.69	14.55	14.28
	14.35	16.91	14.81	13.45	14.41
	14.50	14.27	16.85	14.41	16.08
20.0	19.81	18.69	18.92	19.09	20.78
	19.86	19.80	19.86	19.96	19.71
	19.43	21.27	20.77	19.56	22.32

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.7.1 Homogeneidad de varianza para plomo Pb (II)

Antes de comenzar con el análisis de varianza se debe comprobar ciertos supuestos como la homogeneidad de varianzas, la cual se comprueba en la TABLA 4.21 con la cual se concluye que las varianzas son homogéneas por cada día y cada nivel concentración.

TABLA 4.21 TEST DE COCHRAN HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Pb (II)

Nivel (µg/L)	Test de Cochran		Conclusión
	G _{exp}	G _{tab}	
5.0	0.519	0.6838	Las varianzas son homogéneas
10.0	0.363	0.6838	Las varianzas son homogéneas
15.0	0.402	0.6838	Las varianzas son homogéneas
20.0	0.381	0.6838	Las varianzas son homogéneas

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.7.2 Test de Kolmogorov-Smirnov (Normalidad) Para Pb (II)

Con éste test se comprueba que la distribución de los resultados de la concentración obedece a una distribución normal (TABLA 4.22), que es un supuesto antes de iniciar con la prueba de significancia de Fisher.

TABLA 4.22 TEST DE KOLMOGOROV-SMIRNOV (NORMALIDAD)

Nivel $\mu\text{g/L}$	Promedio $\mu\text{g/L}$	Desviación estándar	Valor máximo ($D_{\text{máx}}$) $F_i - z_n$	D_{crit}	Conclusión
4.84	4.84	0.54316	0.143	0.337	Se ajusta a una distribución normal
10.74	10.74	0.73780	0.129	0.337	Se ajusta a una distribución normal
14.91	14.91	1.14532	0.268	0.337	Se ajusta a una distribución normal
19.99	19.99	0.94883	0.246	0.337	Se ajusta a una distribución normal

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.7.3 Prueba de Fisher Para Pb (II)

Una vez comprobado los supuestos de homogeneidad de varianzas y ajuste a una distribución normal se realiza la prueba F (TABLA 4.23) y se acepta la hipótesis nula de que no hay diferencia significativa entre los resultados por efecto del día de análisis de Pb (II).

TABLA 4.23 RESULTADOS DE LA PRUEBA F PARA Pb (II)

Nivel $\mu\text{g/L}$	F_c	F_t	Conclusión
5.0	2.333	3.478	Se acepta la hipótesis nula
10.0	2.193	3.478	Se acepta la hipótesis nula
15.0	1.865	3.478	Se acepta la hipótesis nula
20.0	1.005	3.478	Se acepta la hipótesis nula

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.7.4 Repetibilidad y reproducibilidad de Pb (II)

En la TABLA 4.24 y 4.25 se muestran los coeficientes de variación para repetibilidad y reproducibilidad calculados a partir de las concentraciones de Pb II de los distintos niveles de validación los cuales cumplen con los objetivos de validación

TABLA 4.24 LÍMITE DE REPETIBILIDAD DEL Pb (II)

Nivel µg/L	CV (%)	Límite de repetibilidad CV (%)	Conclusión
5.0	9.53	15	Cumple el objetivo de validación
10.0	5.93	15	Cumple el objetivo de validación
15.0	6.87	15	Cumple el objetivo de validación
20.0	4.74	15	Cumple el objetivo de validación

ELABORADO POR: Jorge Tafur

TABLA 4.25 LÍMITE DE REPRODUCIBILIDAD DEL Pb (II)

Nivel µg/L	CV (%)	Límite de reproducibilidad CV (%)	Conclusión
5.0	11.45	20	Cumple el objetivo de validación
10.0	7.01	20	Cumple el objetivo de validación
15.0	7.80	20	Cumple el objetivo de validación
20.0	4.74	20	Cumple el objetivo de validación

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.7.5 Veracidad De Pb (II)

Para la veracidad de Pb (II) se aplicó el mismo criterio que para Cd (II) se comparó mediante una prueba t-Student el valor promedio de los resultados de 3 y 5 ppb reportados por ICP con el promedio de los resultados obtenidos por voltametría de redisolución anódica. El análisis de veracidad nos indica que el sesgo es aceptable al comparar los dos métodos mencionados. Los resultados de veracidad para 3 y 5 ppb de plomo se resumen en las TABLAS 4.26 a la 4.28.

TABLA 4.26 RESULTADOS DE 3 ppb DE PLOMO POR ICP

Resultados obtenidos de la variable respuesta por ICP Pb (II)				
Nivel ppb	Días de determinación			
	día	día	día	día
	1	2	3	4
3	2.397	2.726	2.547	2.902
	2.961	2.856	2.687	2.487
PROMEDIO	2.679	2.791	2.617	2.6945

ELABORADO POR: Jorge Tafur

TABLA 4.27 SEGOS PROMEDIOS POR DÍA PARA 3 ppb DE Pb (II)

Resultados obtenidos de los sesgos de la variable respuesta por ICP				
Nivel ppb	Días de determinación			
	día	día	día	día
	1	2	3	4
3	0.603	0.274	0.453	0.098
	0.039	0.144	0.313	0.513
PROMEDIO SEGOS	0.321	0.209	0.383	0.3055

ELABORADO POR: Jorge Tafur

TABLA 4.28 ANÁLISIS DE SESGO 3 ppb Pb (II)

Nivel ppb	Media Nive ppbl	s (Desviación Estándar)	t _{cal}	t _{crí}	Conclusión
3	2.69	0.072	5.98	12.71	El sesgo es aceptable

ELABORADO POR: Jorge Tafur

Las TABLAS 4.29 a la 4.31 se encuentra los resultados de sesgo para 5 ppb de plomo, criterio es $t_{crítico} < t_{tabulado}$ el sesgo es aceptable.

TABLA 4.29 RESULTADOS DE 5 ppb DE PLOMO POR ICP

Resultados obtenidos de la variable respuesta por ICP Pb (II)				
Nivel ppb	Días de determinación			
	día	día	día	día
	1	2	3	4
5	4.18	4.36	4.59	5.01
	4.82	4.53	4.36	4.88
PROMEDIO	4.50	4.44	4.48	4.94

ELABORADO POR: Jorge Tafur

TABLA 4.30 SEGOS PROMEDIOS POR DÍA PARA 5 ppb DE Pb (II)

Resultados obtenidos de los sesgos de la variable respuesta por ICP				
Nivel ppb	Días de determinación			
	día	día	día	día
	1	2	3	4
5	0.816	0.645	0.406	0.009
	1.816	1.526	1.369	1.875
PROMEDIO SEGOS	1.316	1.0855	0.8875	0.942

ELABORADO POR: Jorge Tafur

TABLA 4.31 ANÁLISIS DE SESGO 5 ppb Pb (II)

Nivel ppb	Media Nivel ppb	s (Desviación Estándar)	t _{cal}	t _{crí}	Conclusión
5	4.59	0.24	2.46	12.71	El sesgo es aceptable

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.2.7.6 Exactitud De Pb (II)

A la exactitud se la medio evaluó a través de la incertidumbre de medida típica (TABLA 4.32) de cada una de las componentes asociadas a este parámetro (Ver ANEXO 8).

TABLA 4.32 INCERTIDUMBRE TÍPICA DE 5 ppb DE Pb (II)

DETERMINACIÓN	INCERTIDUMBRE TÍPICA μ				
	D1	D2	D3	D4	D5
1	0.69	0.78	0.85	0.71	0.55
2	0.69	0.78	0.85	0.71	0.55
3	0.69	0.78	0.85	0.71	0.55
PROMEDIO	0.71 $\mu\text{g.L}^{-1}$				
U_{EXPA}	1.42 $\mu\text{g.L}^{-1}$				

ELABORADO POR: Jorge Tafur

$$U_{\text{EXPANDIDA}} = k \times \mu_{\text{TÍPICA}} \quad (4.6)$$

$$k = 2$$

$U_{\text{EXPANDIDA}}$ es la incertidumbre expandida, k es el factor de cobertura y $\mu_{\text{TÍPICA}}$ es la incertidumbre típica.

$$U_{\text{EXPANDIDA}} = 2 \times 0.71 = 1.42 \text{ ppb} \sim 28.5\%$$

Este porcentaje representa el máximo valor de incertidumbre en los cuatro niveles de validación que se obtiene a partir del nivel mas bajo 5 ppb de concentración, ya que este abarca mayor cantidad de errores.

4.2.7.7 Muestra Certificada Para Pb (II)

Adicional se realizó el análisis de una muestra sólida en la cual se determinó Pb (II) ver TABLA 4.33, dicha muestra de referencia proviene de la Agencia Internacional de Energía Atómica y es un patrón trazable (Ver ANEXO 6).

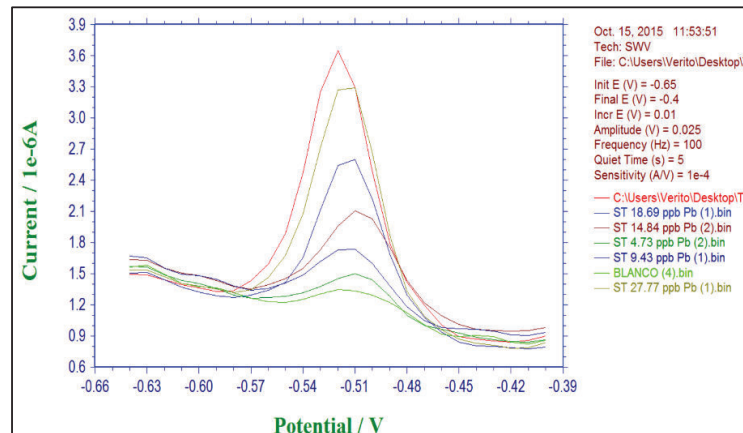
TABLA 4.33 DETERMINACIÓN DE Pb (II) EN MUESTRA CERTIFICADA

Concentración ppb	Señal
0	2.069E-07
4.739	3.987E-07
9.433	5.607E-07
14.08	9.286E-07
18.69	1.120E-06
27.77	1.800E-06
Pendiente (m)	5.75E-08
intersección (a)	1.20E-07
Correlación R	0.99090753
Factor de dilución	263
concentración ppb	550.15
Concentración mg/Kg	0.14

ELABORADO POR: Jorge Tafur

En la figura 4.21 se presentan las adiciones estándar sobre una muestra certificada con una rango de 0.10 a 0.14 mg /Kg ver ANEXO 6.

FIGURA 4.21 MUESTRA CERTIFICADA DE Pb (II)



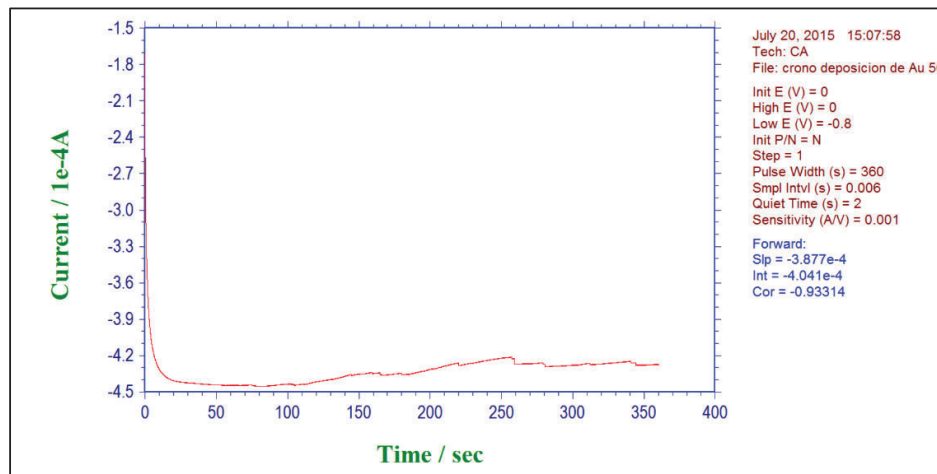
ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.3 RESPUESTA Y ELECCIÓN DE LA SEÑAL

4.3.1 MERCURIO Hg (II)

En la determinación de mercurio II se necesita aplicar una capa de oro sobre la superficie del electrodo de trabajo (BDD) para aumentar la detección del analito, en la Fig. 4.22, se observa la disminución del potencial inicial en función del tiempo, según (Laffont et al., 2015) esto sucede cuando se deposita una capa de oro (50 ppm) sobre el electrodo de trabajo al someterlo a una cronoamperometría (potencial-tiempo).

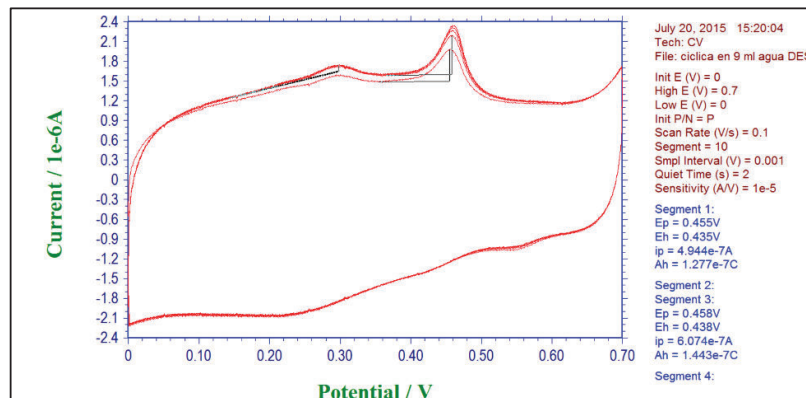
FIGURA 4.22 DEPOSICIÓN DE UN FILM DE ORO SOBRE BDD



ELABORADO POR: Jorge Tafur

Una vez depositado el film de oro se lo activa con ácido clorhídrico 0.06 N (Fig.4.23) para que el electrodo de trabajo sea funcional, mediante una voltamperometría cíclica.

FIGURA 4.23 ACTIVACIÓN DEL FILM DE ORO EN HCl 0.06 N



ELABORADO POR: Jorge Tafur

El equipo de medición es capaz de detectar la intensidad de corriente eléctrica que es directamente proporcional a la concentración del analito de interés, dicha concentración se la puede calcular a partir de la altura de pico y del área de pico para discriminar una de estas dos medidas se determina el coeficiente de variación, el porcentaje mínimo indica menor dispersión (TABLA 4.33) de datos con respecto a la media aritmética por lo tanto éste es tomado en cuenta para todos los cálculos de concentración posteriores.

TABLA 4.34 VARIACIÓN DE INTENSIDAD DE CORRIENTE DEL Hg (II)

# Determinación	MERCURIO Hg (II) AMPERIOS			
	ALTURA	ÁREA	ALTURA	ÁREA
	5 ppb	5 ppb	20 ppb	20 ppb
1	9.07E-08	4.67E-09	4.56E-08	3.33E-09
2	9.51E-08	7.44E-09	5.02E-08	3.53E-09
3	1.37E-07	4.99E-09	5.34E-08	4.05E-09
4	9.75E-08	5.26E-09	5.16E-08	3.61E-09
5	8.82E-08	4.33E-09	4.53E-08	2.74E-09
DES	2.01E-08	1.23E-09	3.60E-09	4.75E-10
media	1.02E-07	5.34E-09	4.92E-08	3.45E-09
%CV	19.72	22.96	7.32	13.75

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.3.2 ESTABILIZACIÓN DE MEDIDAS

Se realizó un barrido de las variables de la técnica de voltimetría de onda cuadrada para definir las en base a la repetibilidad y forma de pico, en la TABLA 4.34 se expone una tendencia de su respuesta para tener una idea del comportamiento de cada una de ellas.

TABLA 4.35 VARIABLES PARA LA FORMACIÓN DE PICO Hg (II)

Señales intensidad de corriente Amperios Hg (II)		
Variación	<i>i_p</i>	<i>E_p</i>
FRECUENCIA		
30.00	6.478E-07	0.482
50.00	2.726E-07	0.459
100.00	5.068E-07	0.512
150.00	4.040E-07	0.501
200.00	1.690E-07	0.488
INCREMENTO		
0.001	1.594E-07	0.464
0.002	2.648E-07	0.478
0.003	3.324E-07	0.486
0.004	3.231E-07	0.484
AMPLITUD		
0.005	9.628E-08	0.471
0.01	2.115E-07	0.472
0.02	3.922E-07	0.469
0.03	4.838E-07	0.449
0.04	4.803E-07	0.452

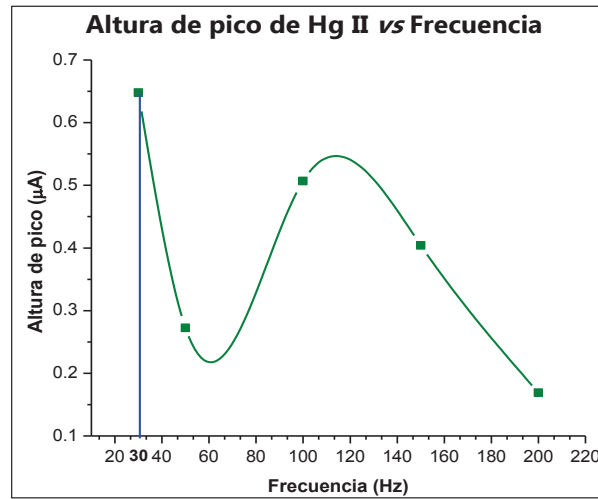
*(*i_p*)= altura de pico. *E_p*= potencial de señal

ELABORADO POR: Jorge Tafur

Para evaluar la magnitud de la frecuencia se estudió la modulación de la altura de pico por efecto de la manipulación de distintas frecuencias (30, 50, 100, 150 y 200 Hz), a un valor de 30 Hz se logra la mejor simetría y mayor altura de señal de pico (Fig. 4.24).

A medida que se aumenta la frecuencia a más de 30 Hz existe una variabilidad de la altura de pico sin llegar a tener una tendencia definida en su comportamiento, conforme se modifica esta variable.

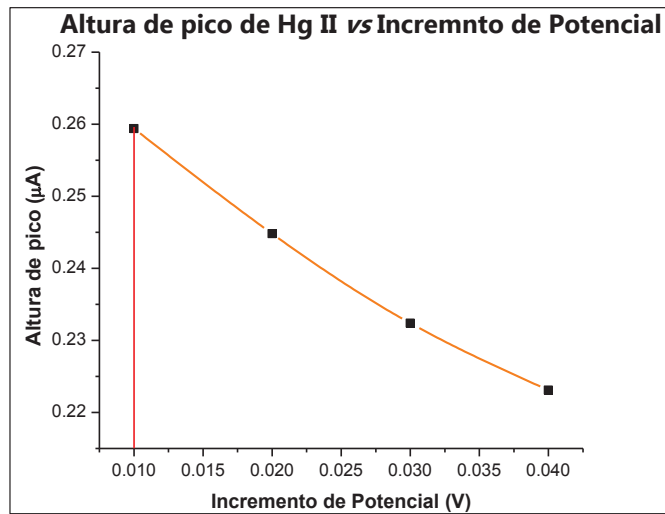
FIGURA 4.24 MODULACIÓN DE LA FRECUENCIA DEL Hg (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

En la Fig. 4.25 los incrementos de potencial son prácticamente semejantes y no hay mayor afectación en la altura de pico por lo que se selecciona 0.01 V de incremento.

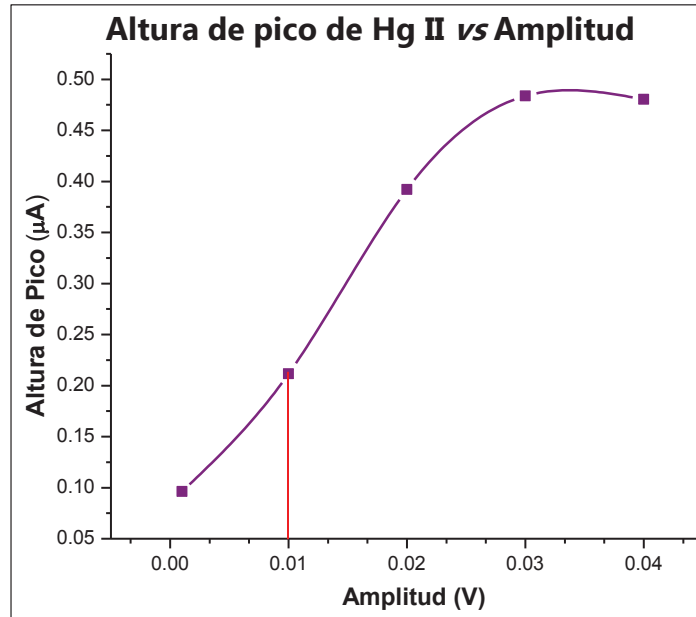
FIGURA 4.25 INCREMENTO DE VOLTAJE DEL Hg (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

La altura de pico respecto a la amplitud de potencial presenta una relación aproximadamente lineal (Fig. 4.26), pero para este parametro el valor a seleccionar se lo realizó en función de la simetría y altura, de tal forma que aplicando 0.01 V de amplitud se logra mayor estabilidad y repetibilidad de resultados.

FIGURA 4.26 AMPLITUD DE VOLTAJE DEL Hg (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

Hay que señalar que para la determinación de mercurio no se recurrió a la redisolución anódica, es decir se cuantificó sin preconcentración, debido a que las alturas de pico en función del tiempo se incrementan en valores mínimos, en la TABLA 4.35, se muestra la exploración del tiempo y potencial de preconcentración respecto a la altura de pico.

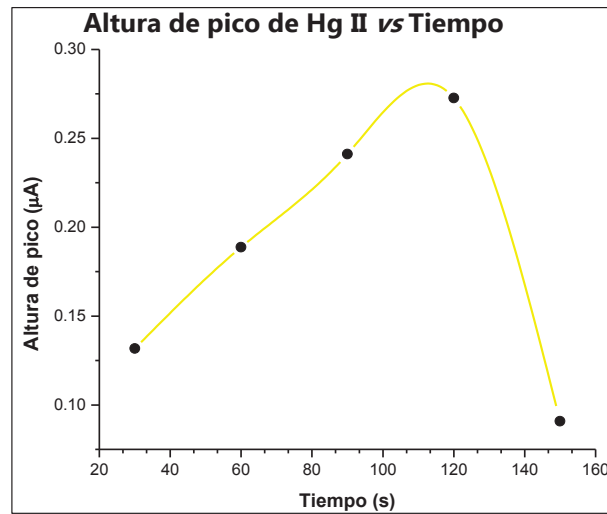
En la Fig. 4.27 se observa que a un tiempo de 120 segundos la magnitud de pico es la mayor, de todas formas en comparación con el resto de alturas de pico la diferencia es pequeña por lo que no amerita realizar una previa concentración.

TABLA 4.36 BARRIDOS DE POTENCIAL PARA Hg (II)

Señales intensidad de corriente (Mercurio)		
Variación	i_p	E_p
DEPOSICION		
-0.10	7.04E-08	0.452
0.00	1.20E-07	0.456
0.10	2.12E-07	0.482
0.20	1.31E-07	0.456
0.30	1.75E-07	0.466
0.40	1.99E-07	0.477
TIEMPO		
30.00	1.32E-07	0.490
60.00	1.89E-07	0.497
90.00	2.41E-07	0.496
120.00	2.73E-07	0.490
150.00	9.08E-08	0.410

ELABORADO POR: Jorge Tafur

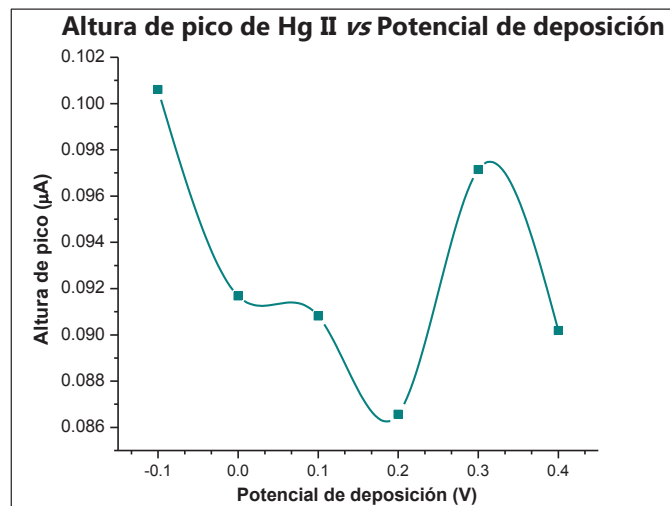
FIGURA 4.27 TIEMPO DE PRECONCENTRACIÓN Hg (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

Para comprobar que la preconcentración es innecesaria se realizó un barrido del potencial de preconcentración desde -0.1 hasta 0.4 V (Fig. 4.28) en todo este rango la variación de la altura de pico difiere en el tercer decimal y no hay necesidad de aplicar un determinado potencial de preconcentración para Hg II si las alturas de la señal de pico son casi de la misma magnitud.

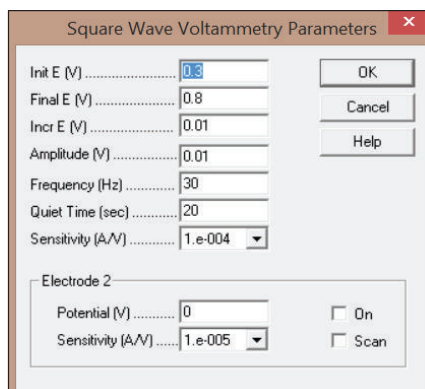
FIGURA 4.28 POTENCIAL DE PRECONCENTRACIÓN Hg (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

Las condiciones ideales de la voltametría de onda cuadrada (SWV) para la determinación de Hg II en muestras de agua se presentan en la Fig. 4.29.

FIGURA 4.29 PARÁMETROS EN LA DETERMINACIÓN DE Hg (II)



FUENTE: Software CHI 1200 A

4.3.3 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE Hg (II)

Para la determinación del límite de detección y cuantificación se preparó 10 soluciones individuales de 1 ppb, concentración mínima a la cual el equipo es capaz de detectar el analito, en la TABLA 4.36, se presentan los resultados de las 10 determinaciones.

TABLA 4.37 LÍMITE DE DETECCIÓN DEL Hg (II)

Nº Muestra	Concentración Hg (II) ppb
1	1.29
2	1.35
3	1.73
4	1.50
5	1.26
6	1.42
7	1.44
8	1.35
9	1.73
10	1.69

ELABORADO POR: Jorge Tafur

Bajo las condiciones de voltametría descrito en la Fig. 4.29 se determina la concentración de 10 muestras, el potencial típico de manifestación de mercurio es de 0.5 voltios aproximadamente. En la TABLA 4.37 se muestra el cálculo de los valores de límite de detección y cuantificación.

TABLA 4.38 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE Hg II

Media \bar{x}	Desviación Estándar s	$3s$	$10s$	Límite de Detección L_D (ppb)	Límite de Cuantificación L_C (ppb)
1.47	0.181	0.542	1.086	2.01	3.28

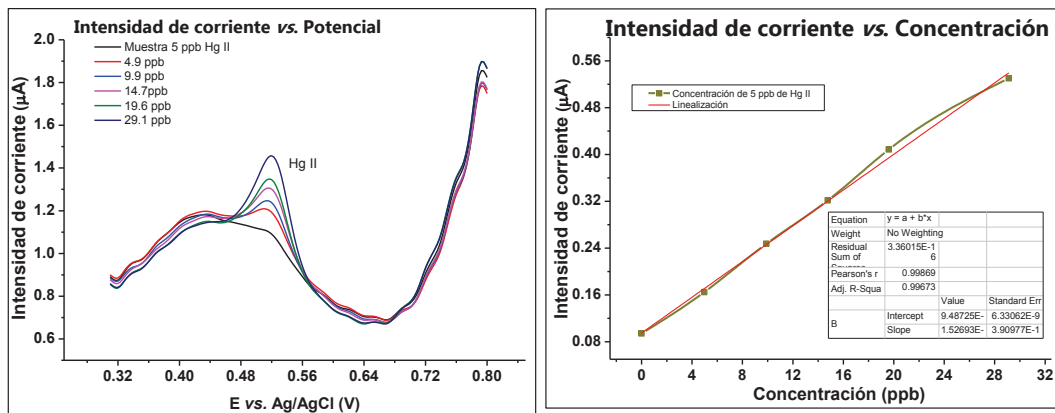
ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.3.4 SEÑALES DE RESPUESTA E INTERVALO LINEAL DE Hg (II)

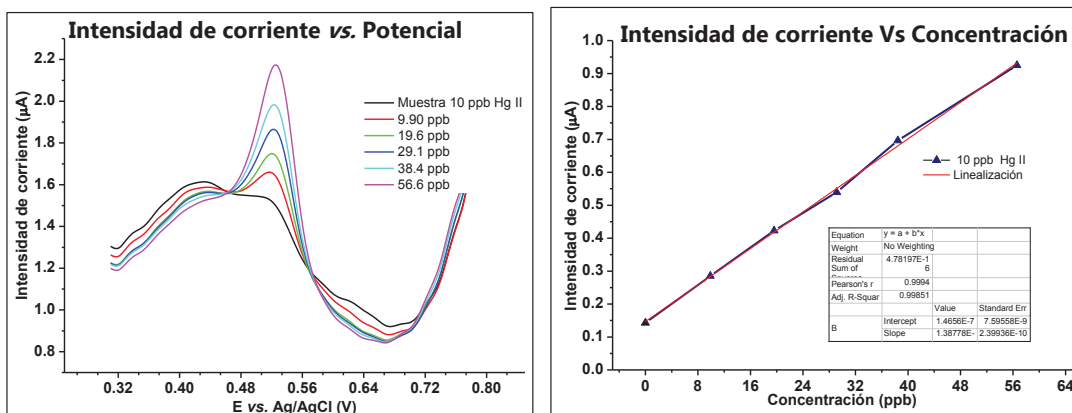
Las señales de respuesta de Hg (II) se lo realizó a cuatro niveles de concentración 5, 10, 15 y 20 ppb, en cada nivel se determinó tres concentraciones durante 5 días los resultados de las señales por adición del estándar y su respectiva linealidad ($r^2=0.99$) se presenta en la Fig.4.30, donde se observa que el Hg (II) tiene potenciales de oxidación positivos aproximadamente a 0.52 V debido a que no existen estudios de detección de Hg (II) con electrodo de diamante dopado con boro (BDD).

FIGURA 4.30 CUANTIFICACIÓN DE 5 ppb Y 10 ppb DE Hg II

a) 5ppb



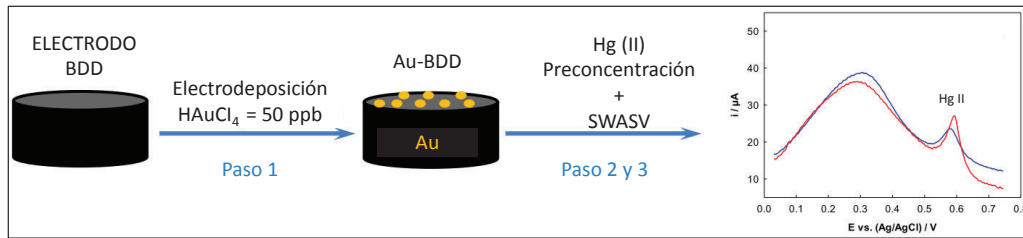
b) 10ppb



ELABORADO POR: Jorge Tafur

En la Fig. 4.31 se presenta la electrodeposición de partículas de oro sobre la superficie del electrodo BDD para la detección de Hg (II), la señal se espera que aparezca en potenciales cercanos a 0.5 V.

FIGURA 4.31 FILM DE ORO SOBRE EL ELECTRODO DE BDD



ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.3.5 ANÁLISIS DE VARIANZA (ADEVA) PARA Hg (II)

En La TABLA 4.38 se describe variables tomadas en cuenta al momento de realizar el experimento. En la TABLA 4.39 se presenta la cuantificación del Hg (II) a los cuatro niveles de concentración (5, 10, 15, 20 ppb).

TABLA 4.39 CARACTERÍSTICAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL Hg (II)

Factor:	Día de validación (D_i)	
Tratamientos:	D1, D2, D3, D4, D5	
Unidad experimental:	AGUA	
Variable respuesta:	Corriente, Amperios (A)	
Nivel de significancia:	0.05	
Modelo:	Diseño a un criterio de clasificación	
Hipótesis:	Ho: No existe diferencia significativa en la concentración de cadmio determinada en el agua, por efecto del día de validación	
Estadística de prueba:	$F_c = DCM_B / DCM_W$	
Criterio de decisión:	Rechazar la hipótesis nula si $F_c > F_t$	
Número de tratamientos (a):	5	
Número de repeticiones (n):	3	
Número total de observaciones (N):	15	
Nivel de validación 1	5.0000	ppb
Nivel de validación 2	10.0000	ppb
Nivel de validación 3	15.0000	ppb
Nivel de validación 4	20.0000	ppb

ELABORADO POR: Jorge Tafur

TABLA 4.40 CONCENTRACIONES DE Hg II

Nivel (µg/L)	Días de validación				
	D1	D2	D3	D4	D5
5.0	6.21	6.79	5.29	5.78	5.91
	6.05	6.29	5.70	5.80	6.10
	5.79	5.77	5.70	5.71	6.20
10.0	10.56	10.78	10.38	10.96	10.90
	10.87	11.61	10.87	10.70	9.80
	9.41	11.47	11.04	11.01	9.70
15.0	15.83	15.34	15.11	15.18	15.91
	16.40	15.02	15.18	15.81	14.50
	16.36	15.67	14.95	15.89	14.77
20.0	18.53	20.10	21.11	21.73	21.09
	20.38	20.53	20.42	19.53	20.89
	19.92	18.23	21.17	20.70	21.80

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.3.5.1 Homogeneidad de varianza para Hg (II)

La verificación de supuestos antes de iniciar el análisis de varianzas se los comprueba con el test de Cochran (homogeneidad de varianzas) y test de Kolmogorov-Smirnov (comprobación de la distribución normal) en las TABLAS 4.40 y 4.41 se presentan las conclusiones de estos supuestos.

TABLA 4.41 TEST DE COCHRAN (HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS)

Nivel (µg/L)	Test de Cochran		Conclusión
	G_{exp}	G_{tab}	
5.0	0.676	0.6838	Las varianzas son homogéneas
10.0	0.429	0.6838	Las varianzas son homogéneas
15.0	0.602	0.6838	Las varianzas son homogéneas
20.0	0.370	0.6838	Las varianzas son homogéneas

ELABORADO POR: Jorge Tafur

TABLA 4.42 TEST DE KOLMOGOROV-SMIRNOV (NORMALIDAD)

Nivel (µg/L)	Promedio (µg/L)	Desviación estándar	Valor máximo ($D_{máx}$) $F_i - z_n$	D_{crit}	Conclusión
5.94	5.94	0.352	0.189	0.337	Se ajusta a una distribución normal
10.67	10.67	0.621	0.142	0.337	Se ajusta a una distribución normal
15.46	15.46	0.569	0.157	0.337	Se ajusta a una distribución normal
20.41	20.41	1.033	0.099	0.337	Se ajusta a una distribución normal

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.3.5.2 Prueba de Fisher para Hg (II)

Una vez comprobados los supuestos estadísticos de homogeneidad de varianzas y de distribución normal, verificados en todos los niveles de validación se puede continuar con el análisis de varianza TABLA 4.42 con el cual se puede concluir que no existe diferencia significativa de las concentraciones en todos los niveles de estudio por efecto de variar el día de análisis.

TABLA 4.43 RESULTADOS DE LA PRUEBA F Hg (II)

Nivel (µg/L)	Fc	Ft	Conclusión
5.0	3.062	3.478	Se acepta la hipótesis nula
10.0	2.387	3.478	Se acepta la hipótesis nula
15.0	3.546	3.478	Se rechaza la hipótesis nula
20.0	2.111	3.478	Se acepta la hipótesis nula

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.3.5.3 Repetibilidad y reproducibilidad para Hg (II)

La repetibilidad y reproducibilidad del método se calculó a partir del porcentaje del coeficiente de variación (TABLAS 4.43 y 4.44) y se lo comparó con límites teóricos bajo los cuales se llega a la conclusión que se cumple los objetivos de validación para los parámetros antes mencionados.

TABLA 4.44 LÍMITE DE REPETIBILIDAD DEL Hg (II)

Nivel (µg/L)	CV (%)	Límite de Repetibilidad CV(%)	Conclusión
5.0	4.69	15	Cumple el objetivo de validación
10.0	4.92	15	Cumple el objetivo de validación
15.0	2.80	15	Cumple el objetivo de validación
20.0	0.59	15	Cumple el objetivo de validación

ELABORADO POR: Jorge Tafur

TABLA 4.45 LÍMITE DE REPRODUCIBILIDAD DEL Hg (II)

Nivel (µg/L)	CV (%)	Límite de reproducibilidad CV (%)	Conclusión
5.0	4.69	20	Cumple el objetivo de validación
10.0	4.92	20	Cumple el objetivo de validación
15.0	3.81	20	Cumple el objetivo de validación
20.0	0.70	20	Cumple el objetivo de validación

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.3.5.4 Exactitud para Hg (II)

A la exactitud se la medio evaluó a través de la incertidumbre de medida típica de cada una de las componentes asociadas a este parámetro (Ver ANEXO 8).

En la TABLA 4.45 se presenta la incertidumbre típica y expandida de 5 ppb de Hg (II) para las tres repeticiones de concentración durante cinco días, es decir la concentración del analito se reporta como 5 ppb ± 28% de Hg (II).

TABLA 4.46 INCERTIDUMBRE TÍPICA DE 5 ppb DE Hg (II)

DETERMINACIÓN	INCERTIDUMBRE TÍPICA µ				
	D1	D2	D3	D4	D5
1	0.75	1.10	0.48	0.52	0.73
2	0.75	1.10	0.48	0.52	0.73
3	0.75	1.10	0.48	0.52	0.73
PROMEDIO µ _{típica}	0.72 µg.L ⁻¹				
U _{EXPA}	1.44 µg.L ⁻¹				

ELABORADO POR: Jorge Tafur

$$U_{EXPANDIDA} = k \times \mu_{TÍPICA}$$

$$k = 2$$

$U_{EXPANDIDA}$ es la incertidumbre expandida, k es el factor de cobertura y $\mu_{TÍPICA}$ es la incertidumbre típica.

$$U_{EXPANDIDA} = 2 \times 0.72 = 1.44 \text{ ppb} \sim 28.8\%$$

Este porcentaje representa el máximo valor de incertidumbre en los cuatro niveles de validación que se obtiene a partir del nivel mas bajo 5ppb de concentración, ya que este abarca mayor cantidad de errores.

4.3.5.5 Muestra Certificada Para Hg (II)

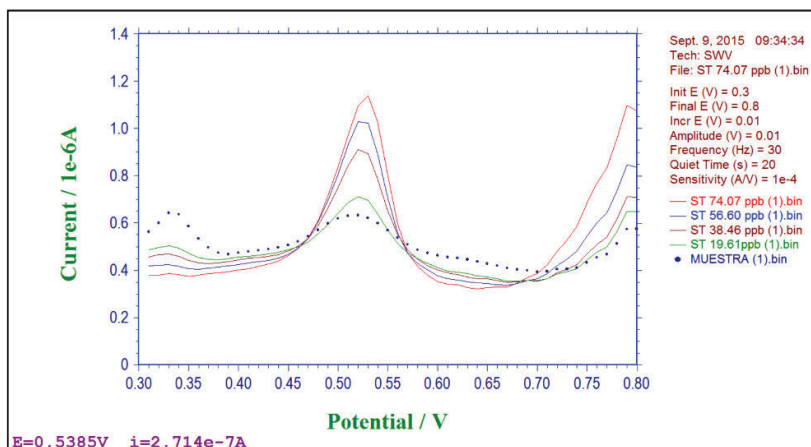
En la TABLA 4.53 se presenta la concentración promedio de la cuantificación de Hg (II) en una muestra certificada de concentración conocida cuyo valor oscila entre 0.216 a 0.228 mg/Kg, y en la Fig. 4.32 se presenta la adición de estándares sobre la muestra certificada cuya linealidad es de 0.996.

TABLA 4.47 DETERMINACIÓN DE Hg (II) EN MUESTRA CERTIFICADA

Concentración (ppb)	Señal (A)
0.0000	1.091E-07
19.61	3.095E-07
38.46	5.140E-07
56.6	6.513E-07
74.07	7.790E-07
Pendiente (m)	9.101E-09
intersección (a)	1.29E-07
Correlación R	0.9960511
Factor de dilución	100
concentración ppb	1417.99
mg/Kg	0.35

ELABORADO POR: Jorge Tafur

FIGURA 4.32 MUESTRA CERTIFICADA DE Hg (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.4 MUESTRAS REALES

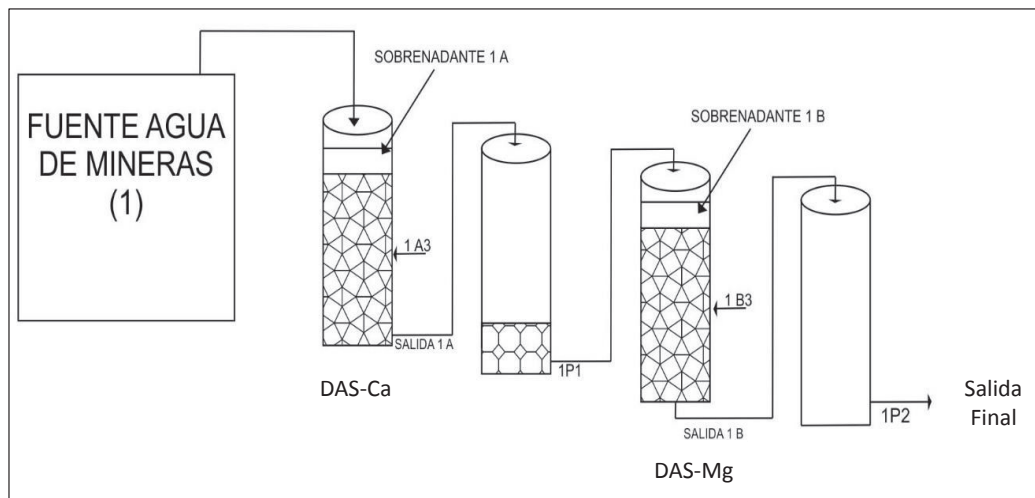
4.4.1 DETERMINACIÓN DE Cd (II) Y Pb (II)

EL DAM (Drenaje Ácido de Mina) es una de las principales causas de contaminación a nivel mundial, es producto de actividades mineras abandonadas, e implica la exposición de residuos mineros ricos en sulfuros que se oxidan al ambiente. Esto da lugar a lixiviados altamente ácidos con altas concentraciones de metales, metaloides y sulfatos (Delgado, Sarmiento, Condesso de Melo, & Nieto, 2009).

La determinación de Cd (II), Pb (II) y Hg (II) se analizó en muestras de aguas estancadas de minas abandonadas del cantón Zaruma provincia de El Oro. Adicional se realizó un monitoreo de estas aguas al ser sometidas a un tratamiento de descontaminación de metales pesados a través de columnas diseñadas en el laboratorio (CICAM), denominado DAS (Dispersed Alkaline Substrate), que consiste en una mezcla de virutas de madera y un material reactivo que puede ser caliza (DAS-Ca) u óxido magnésico (DAS-Mg) cuya efectividad ha sido probada a escala de laboratorio y a nivel de campo, en la eliminación de metales trivalentes y divalentes respectivamente (Rötting, Thomas, Ayora, & Carrera, 2008) dichos

análisis se concluyeron en colaboración con un tesista de pregrado de la EPN quien diseñó y construyó este sistema de descontaminación de aguas residuales Fig. 4.33.

FIGURA 4.33 SISTEMA DE COLUMNAS DAS



ELABORADO POR: Jorge Tafur

Este sistema de tratamiento pasivo es basado en la disolución de los granos de calcita gruesas que son ampliamente utilizados para remediar drenaje ácido de minas (AMD).

Desafortunadamente, toleran sólo una baja concentración de metales o cargas de acidez, ya que son propensos a la pasivación (pérdida de reactividad debido a revestimiento) y a la obstrucción (pérdida de permeabilidad) por precipitados. Para superar estos problemas, se desarrolló un sustrato disperso alcalino (DAS) compuesto de un reactivo alcalino de grano fino (arena calcita) mezclado con una matriz inerte gruesa (virutas de madera).

Los granos pequeños proporcionan una gran superficie reactiva y se disuelven casi completamente antes de la capa creciente de precipitados, mientras que la dispersión de los núcleos para la precipitación sobre las superficies inertes retarda la obstrucción (Rötting, Ayora, & Carrera, 2008). En la TABLA 4.48 se presenta la curva de calibración para cuantificar Cd II en muestras reales.

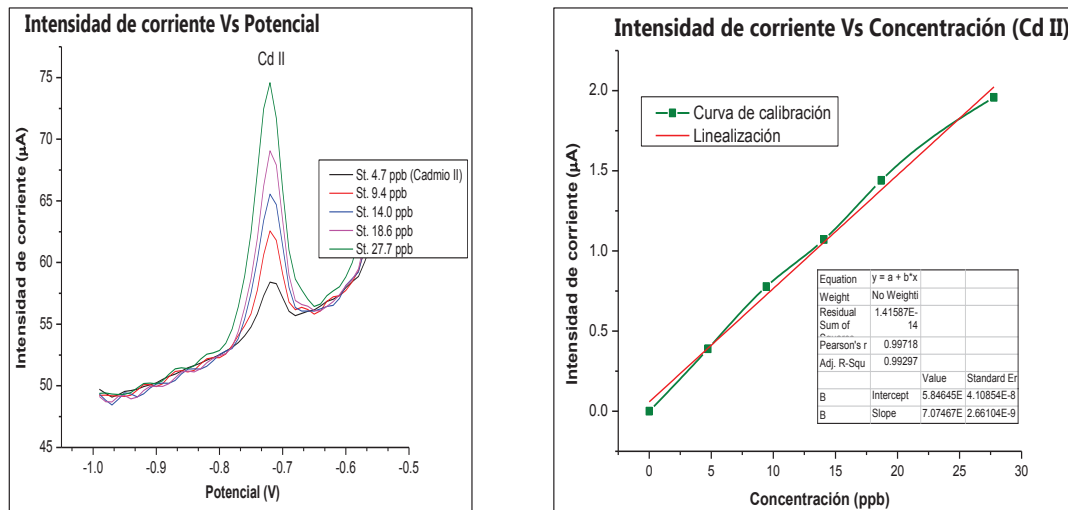
TABLA 4.48 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR Cd (II)

Concentración $\mu\text{g.L}^{-1}$	Señal (A)
0	0
4.73	3.90E-07
9.43	7.78E-07
14.08	1.071E-06
18.69	1.440E-06
27.77	1.958E-06
Pendiente (m)	7.0747E-08
intersección (a)	5.8464E-08
Correlación R ²	0.99718239

ELABORADO POR: Jorge Tafur

En la Fig. 4.34 a) se observa la adición de volúmenes constantes de estándar de Cd II de concentración conocida con su medida en microamperios (μA) y b) la recta de calibrado con $r^2 > 0.99$.

FIGURA 4.34 SEÑALES DE CORRIENTE DE DETECCIÓN Cd (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

Los resultados de la TABLA 4.49 muestran que hasta el punto de muestreo (salida 1A) del sistema de columnas, el potenciostato puede generar señal para detectar Cd II y se puede calcular la concentración que se la calculó por duplicado, conforme el flujo de muestra ingresa por el resto puntos el equipo no detecta pico alguno de

señal y debido que el método cuantifica 5 ppb se reporta concentraciones < 5 ppb porque puede existir aún trazas del analito.

TABLA 4.49 ANÁLISIS DE Cd (II) EN EL SISTEMA DE COLUMNAS

Puntos de Muestreo	Señal (A)	Promedio	Concentración de Cd II (ppb)
FUENTE 1	4.607E-07	4.604E-07	149.41
	4.600E-07		
SOBRENADANTE 1A	3.152E-06	3.031E-06	110.50
	2.909E-06		
1A3	1.782E-06	1.679E-06	60.24
	1.575E-06		
SALIDA 1A	6.959E-07	6.910E-07	23.51
	6.860E-07		
1P1	No detecta	--	<5
1B	No detecta	--	<5
1B3	No detecta	--	<5
SALIDA 1B	No detecta	--	<5
SALIDA 1P2	No detecta	--	<5

ELABORADO POR: Jorge Tafur

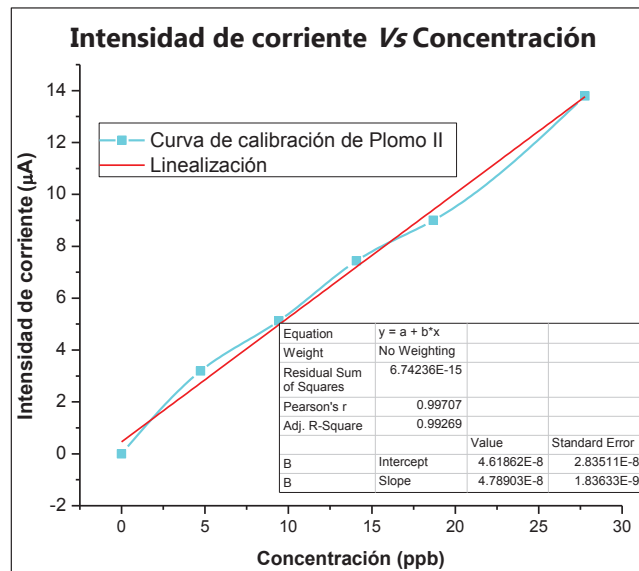
Para determinar Pb II se realizó de igual forma una curva de calibración que se presenta en la TABLA 4.50 con una linealidad de 0.997 Fig. 4.35 como coeficiente de correlación se aplicó una dilución de diez veces para el primer punto de muestreo (fuente) para el resto de muestras se midió directamente.

TABLA 4.50 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA PLOMO Pb (II)

Concentración	Señal
0	0
4.739	3.192E-07
9.433	5.129E-07
14.08	7.440E-07
18.69	9.000E-07
27.77	1.379E-06
Pendiente (m)	4.79E-08
intersección (a)	4.62E-08
Correlación R ²	0.9970723

ELABORADO POR: Jorge Tafur

FIGURA 4.35 CURVA DE INTERPOLACIÓN DEL Pb (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

En la TABLA 4.51 se presenta las concentraciones de Pb (II) en el sistema de columnas que solo fue posible determinar su concentración hasta el segundo punto de muestreo (sobrenadante 1A) a partir del tercer punto las columnas debido a su función que es reducir la cantidad de metales pesados, los elimina a éstos hasta concentraciones inferiores a 5 ppb de Pb (II) que el método no es capaz de cuantificar.

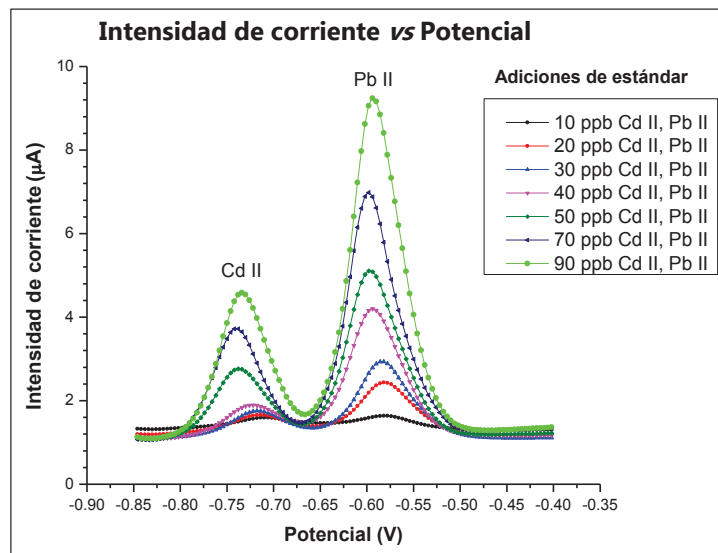
TABLA 4.51 CONCENTRACIÓN MUESTRAS REALES DE Pb (II)

Puntos de Muestreo	Señal (A)	Promedio	Concentración de Pb (II) ppb
FUENTE 1	6.56E-07	6.095E-07	309.355
	5.629E-07		
SOBRENADANTE 1A	3.720E-07	3.720E-07	18.233
	3.720E-07		
1A3	No detecta	--	<5
SALIDA 1A	No detecta	--	<5
1P1	No detecta	--	<5
1B	No detecta	--	<5
1B3	No detecta	--	<5
SALIDA 1B	No detecta	--	<5
SALIDA 1P2	No detecta	--	<5

ELABORADO POR: Jorge Tafur

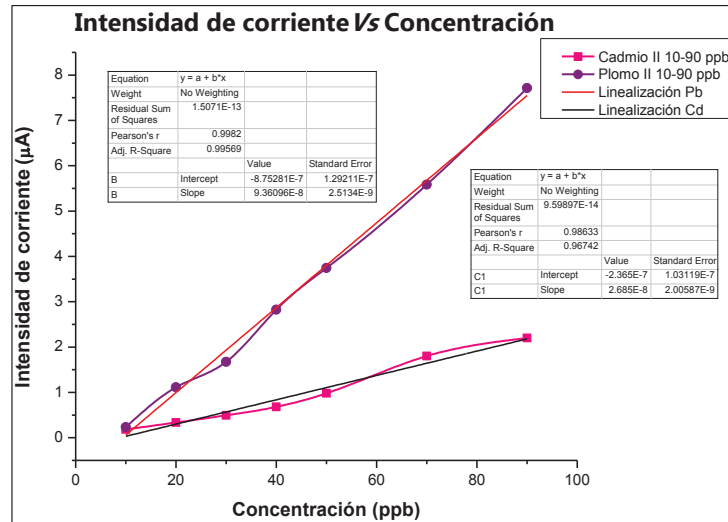
Para el resto de muestreos se analizaron preparando una curva de calibración de 0 a 90 ppb para cuantificar en una sola corrida Cd II y Pb II en la Fig. 4.36 y 4.37 se señalan las adiciones de estándar y las linealidades que están alrededor de 0.99 para los dos analitos mencionados lo cual nos indica una relación lineal entre la señal generada en microamperios μA y la concentración en ppb (partes por billón).

FIGURA 4.36 SEÑALES DE CORRIENTE DE Cd (II) Y Pb (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

FIGURA 4.37 INTERPOLACIÓN DE Cd (II) Y Pb (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

En la TABLA 4.52 se muestran los valores de concentración de Cd (II) y Pb (II) en el sistema de columnas. Se realizó un muestreo mensual durante 4 meses (Abril, Mayo, Junio y Julio del 2015 en la mina abandonada de Pacchapamba cantón Zaruma, en el primer muestreo se midió Cd (II) y Pb (II) individualmente (TABLA 4.49 y 4.51) y en los siguientes muestreos se analizaron los dos analitos en mención al mismo tiempo mediante la interpolación de las curvas que se muestran la Fig. 4.37.

Los puntos de muestreo en los que se reportan concentraciones menores a 5 ppb son en los cuales los voltamperogramas no generan señal alguna (TABLA 4.52), dado que el método se ajusta a 5 ppb como límite de cuantificación, bajo otras condiciones experimentales existe la probabilidad de encontrar concentraciones inferiores en el sistema de columnas si es que existiesen.

TABLA 4.52 CUANTIFICACIÓN DE Cd II Y Pb II EN MUESTRAS REALES

MUESTREO 2				
PUNTOS DE MUESTREO	CADMIO (II)		PLOMO (II)	
	CORRIENTE (A)	CONCENTRACIÓN $\mu\text{g.L}^{-1}$	CORRIENTE (A)	CONCENTRACIÓN $\mu\text{g.L}^{-1}$
FUENTE 1	2.56E-06	91.86	3.34E-06	47.11
SOBRENADANTE 1A	2.26E-06	81.86	1.21E-06	23.43
1A3	2.02E-06	73.86	1.61E-06	27.85
SALIDA 1A	1.11E-06	43.60	1.63E-06	28.15
SALIDA 1P1	1.47E-07	11.55	2.49E-07	12.76
SOBRENADANTE 1B	4.57E-08	8.18	2.15E-07	12.38
1B3	4.76E-08	8.25	4.34E-07	14.82
SALIDA 1B	<	5	1.85E-07	12.05
MUESTREO 3				
FUENTE 1	2.23E-06	80.833	1.603E-06	27.81
SOBRENADANTE 1A	3.12E-09	6.771	3.000E-09	10.03
1A3	3.23E-06	114.367	1.195E-06	23.27
SALIDA 1A	4.77E-07	22.550	4.05E-07	14.50
SALIDA 1P1	<	5.000	<	5.00
MUESTREO 4				
FUENTE 1	3.55E-06	124.83	6.06E-06	77.300
SOBRENADANTE 1A	2.40E-06	86.80	4.88E-06	64.167
1A3	1.13E-06	44.20	4.96E-07	15.513
SALIDA 1A	1.44E-06	54.73	5.52E-07	16.133
SALIDA 1P1	1.83E-07	12.75	4.89E-07	15.430
SOBRENADANTE 1B	<	5.00	1.74E-07	11.930
1B3	<	5.00	1.25E-07	11.386

ELABORADO POR: Jorge Tafur

4.4.2 DETERMINACIÓN DE Hg (II)

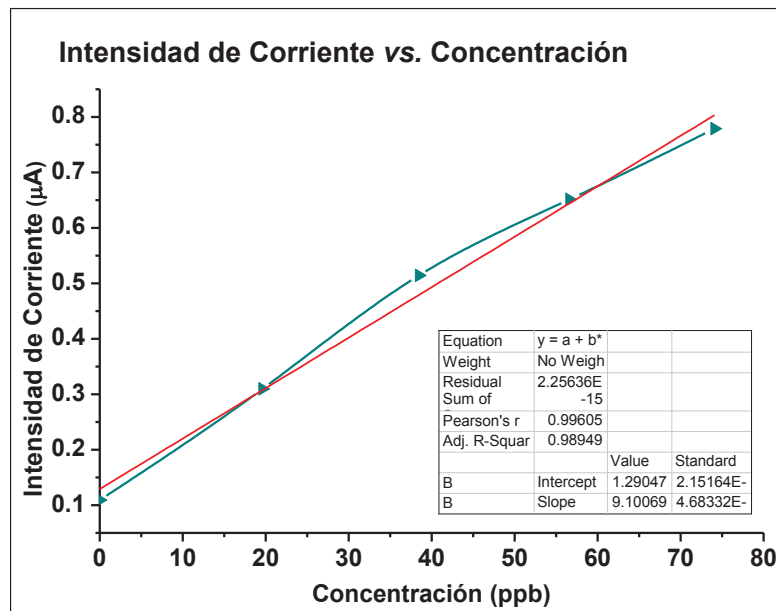
Para el análisis de Hg (II) se determinó su concentración únicamente en la fuente y no en el sistema de columnas, ya que este metal no era de interés en el proyecto de eliminación de metales pesados (sistema DAS), sin embargo la concentración promedio de Hg II en muestras reales provenientes de minas abandonadas del cantón Zaruma es de 708, 89 ppb (TABLA 4.53). La adición de estándar en la muestra real se visualiza en la Fig. 4.38.

TABLA 4.53 CURVA DE CALIBRACIÓN DEL Hg (II)

Concentración (ppb)	Señal (A)
0.0000	1.091E-07
19.61	3.095E-07
38.46	5.140E-07
56.6	6.513E-07
74.07	7.790E-07
Pendiente (m)	9.101E-09
intersección (a)	1.29E-07
Correlación R	0.9960511
Factor de dilución	50
Concentración ppb	708.99
ppm	0.790

ELABORADO POR: Jorge Tafur

FIGURA 4.38 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICAR Hg (II)



ELABORADO POR: Jorge Tafur

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- De acuerdo a las micrografías realizadas por AFM y c-AFM, es evidente que una limpieza superficial de cualquier electrodo de BDD nuevo es necesario antes de que éste sea utilizado en cualquier tipo de estudio electroanalítico. La limpieza superficial puede ser química, electroquímica o por otros métodos. Una adecuada limpieza no solo permite eliminar todas las impurezas de carbón residual de la superficie, sino que también permitirían tener una respuesta electroquímica sin interferencias y con una buena reproducibilidad.
- La validación de Cd (II), Pb (II) y Hg (II) se estudió en muestras preparadas en el laboratorio a partir de estándares certificados a cuatro niveles de concentración (5, 10, 15 y 20 µg/L) diaria por triplicado durante cinco días y con los datos obtenidos se calcularon los siguientes parámetros de validación: selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, repetibilidad, reproducibilidad, veracidad y exactitud.
- La señal emitida por el potenciostato y que se selecciona es la altura de pico para el cálculo de todas las concentraciones de Cd (II), Pb (II) y Hg (II), debido a que el coeficiente de variación de medida es menor al 20% en contraste a la variación de medida del área de pico.
- En este estudio cuantificó Cd(II), Pb(II) y Hg(II) mediante voltamperometría de redisolución anódica, con electrodo de diamante dopado con boro (BDD) con los siguientes límites de detección L_{OD} y cuantificación L_C según la TABLA 5.1:

TABLA 5.1 Ld Y Lc DE Cd (II), Pb (II) y Hg (II)

	Cadmio Cd(II)	Plomo Pb (II)	Mercurio Hg (II)
LOD $\mu\text{g/L}$	0.69	0.86	2.01
LC $\mu\text{g/L}$	1.45	1.97	3.28

ELABORADO POR: Jorge Tafur

A pesar que en los objetivos de validación se plantean como límite de detección 5 ppb el método responde eficientemente para concentraciones inferiores, de este modo para la determinación de Cd(II), Pb(II) y Hg(II) se toma como límite de cuantificación 5 $\mu\text{g/L}$, es decir una concentración menor a la planteada que fue de 10 $\mu\text{g/L}$ debido a la sensibilidad del método.

- Para cada nivel de estudio y metal se aplicó el test de Cochran y de Kolmogorov- Smirnov, los mismos que nos confirman varios supuestos estadísticos antes realizar un análisis de varianzas, nos informan que: las varianzas son homogéneas y que los datos se ajustan a una distribución normal respectivamente.

Con la prueba de Fisher se llega a la conclusión que no existe diferencia significativa de la concentración obtenida entre repeticiones y entre días de análisis, con este parámetro estadístico se acepta la hipótesis nula planteada en el diseño experimental.

- La repetibilidad y la reproducibilidad se la calculó en términos de coeficiente de variación (CV%) los cuales se encuentran dentro de los límites, es decir menores que el 15 y 20% respectivamente (planteados en los objetivos de validación), cabe recalcar que el coeficiente de variación calculado de cada nivel disminuye conforme aumenta la concentración debido a que a mayores concentraciones del analito las lecturas de corriente tienen mayor estabilidad.
- La determinación de la veracidad se la realizó a niveles de 3 y 5 ppb para cadmio y plomo durante cuatro días por duplicado, se escogió estas

concentraciones porque es el punto inferior del rango de validación y es el sesgo más grande en comparación al resto de concentraciones, de esta forma se asegura la veracidad para el resto de niveles (10, 15 y 20 ppb), se aplica una prueba de t-Student simple con 0.05 de probabilidad de error, en el caso de mercurio no se logró realizar esta prueba porque el método acreditado paralelo con el que se determinó las concentraciones todavía no se encuentra a punto, éstas concentraciones se las determinó mediante ICP.

A la exactitud se la evaluó mediante la incertidumbre de medición, en el nivel más bajo de concentración de los tres metales (5ppb), en este nivel se encuentra la mayor medida de incertidumbre asociada a errores aleatorios y sistemáticos. La incertidumbre expandida de Cd (II), Pb (II) y Hg (II) son las siguientes presentadas en la TABLA 5.2, con un factor de cobertura k igual a 2:

TABLA 5.2 INCERTIDUMBRE DE Cd (II), Pb (II) y Hg (II)

	Resultado de Incertidumbre Expandida		
	Cd	Pb	Hg
μ típica promedio	0.91	0.71	0.72
$U_{EXPAndida}$	1.83	1.42	1.44
%	36.6	28.5	28.8

ELABORADO POR: Jorge Tafur

- El principal interferente en la cuantificación de Cd (II) es el Zn (II) debido a la cercanía de potencial al momento de la generación de señal que existe entre estos dos, en el presente estudio, la presencia de aproximadamente 400 ppb de Zn (II) logra disminuir hasta en un 50% la señal de pico de Cd (II). El interferente primario de Pb (II) es el Cu (II) que a pesar de la influencia de hasta 1000 ppb de Cu (II) éste no logró disminuir significativamente la señal de respuesta del Pb (II).
- La concentración de los analitos propuestos, en muestras reales de agua provenientes de minas abandonadas de Zaruma se los expone a continuación así como también la muestra de control que es el material de

referencia certificado que está formado de una matriz similar a las muestras analizadas TABLA 5.3:

TABLA 5.3 CUANTIFICACIÓN DE Cd (II), Pb (II) y Hg (II)

Muestra de agua de minas abandonadas provincia de El Oro, cantón Zaruma (SWVAS)		
Cd (II) µg/L	Pb (II) µg/L	Hg (II) µg/L
149.4	309.3	708.9
*Muestras analizadas del material de referencia certificado MRC (SWV)		
Cd (II) mg/kg	Pb (II) mg/Kg	Hg (II) mg/Kg
0.21	0.14	0.35
Valor certificado del material de referencia*		
Cd (II) mg/Kg	Pb (II) mg/Kg	Hg (II) mg/Kg
0.189	0.12	0.22

* ANEXO 6

ELABORADO POR: Jorge Tafur

- La técnica aplicada en este estudio (voltimetría de redisolución anódica) para la cuantificación de Cd (II), Pb (II) y Hg (II), es muy sensible que llegó a determinar concentraciones en niveles de ppb (partes por billón µg/L), es una metodología en la cual se necesita tiempos relativamente cortos de análisis y preparación de muestras en comparación con técnicas como: espectroscopía de absorción atómica (EAA), cromatografía e incluso la espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). La técnica propuesta tiene la ventaja de realizar análisis *in-situ*, el mantenimiento del equipo es mínimo y el costo por analito determinado aproximadamente es tres veces menos que las técnicas convencionales.

5.2 RECOMENDACIONES

- Aplicar el método de análisis en muestras de ríos donde se han descargado aguas residuales de mineras y realizar un modelado de la distribución y concentración de los analitos para contribuir a una base de datos de la propagación de la contaminación por Cd (II), Pb (II) y Hg (II).
- Desarrollar la técnica de voltametría de redisolución anódica para diferentes matrices como son sedimentos, lodos, aguas naturales, potables e incluso alimentos y desarrollar nuevos procedimientos de tratamientos de muestras.
- Comparar resultados obtenidos por el potenciostato CHI frente al prototipo elaborados por estudiantes de la EPN.
- Explorar el comportamiento de electrodos desechables versus electrodos normales de diamante, determinar la desviación de los datos y conocer los costos beneficios de cada uno de ellos.
- Dentro del análisis electroquímico un punto aparte de estudio es la especiación de metales de número de oxidación variable, por lo que se requiere de estudios individuales y exhaustivos que demuestren de forma satisfactoria la concentración de cada ion.
- El proceso de la metodología de cuantificación del analito por voltametría es por adiciones sucesivas de estándar de concentración conocida y los datos tabulados se los obtiene de esta manera sin embargo se los puede comparar con los obtenidos con una curva de calibración externa e interpolando las señales, de esta forma saber cual tiene mayor desviación.
- En la determinación de cadmio y plomo, modificar el metal que se necesita (mercurio) con el cual se forma la amalgama necesario para la cuantificación, por otro de similar efectividad y menor toxicidad que cumpla con la detección del analito problema en el momento de la preconcentración.

- Se requiere de un estudio a profundidad para comprender a que parámetros afectan el resto de metales frente a los analitos de interés, es decir su forma de interacción y encontrar los mecanismos de inhibición de los mismos.
- Realizar la búsqueda o modificación de nuevos materiales que sirvan de electrodos de trabajo para aumentar aún más la sensibilidad y selectividad del método.
- Elaborar un manual de prácticas de electroquímica para estudiantes de pregrado con el fin de que se involucren y se relacionen con técnicas alternativas de análisis.

BIBLIOGRAFÍA

- Amezaga, J. M., Rötting, T. S., Younger, P. L., Nairn, R. W., Noles, A.-J., Oyarzún, R., & Quintanilla, J. (2011). A Rich Vein? Mining and the Pursuit of Sustainability. *Environmental Science & Technology*, 45(1), 21-26. doi: 10.1021/es101430e
- Arantes, T. M., Sardinha, A., R. Baldan, M., H. Cristovan, F., & G. Ferreira, N. (2014). Lead detection using micro/nanocrystalline boron-doped diamond by square-wave anodic stripping voltammetry. *Talanta*, 128, 132-140. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.04.074>
- ASECAL. (2012). ESTADÍSTICA BÁSICA EN LABORATORIOS FÍSICO-QUÍMICOS. 4, 26.
- Baeza, A., & García, A. (2011). Principios de electroquímica analítica. *Colección de documentos de apoyo. UNAM*.
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2000). *Electrochemical methods : fundamentals and applications* (2nd ed.). New York: John Wiley.
- Benvenuto Mark, A., Ahuja, S., Duncan Timothy, V., Noonan Gregory, O., & Roberts-Kirchhoff Elizabeth, S. (Eds.). (2014). *Chemistry of Food, Food Supplements, and Food Contact Materials: From Production to Plate* (Vol. 1159): American Chemical Society.
- Blanco, F. (2011). Implementación de dos métodos voltamperométricos Determinación de mercurio y cianuro libre en agua potable y fuentes de agua sin tratamiento en el laboratorio departamental de salud pública de santander.
- Bonfil, Y., & Kirowa-Eisner, E. (2002). Determination of nanomolar concentrations of lead and cadmium by anodic-stripping voltammetry at the silver electrode. *Analytica Chimica Acta*, 457(2), 285-296. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00016-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00016-8)
- Bonsignore, M., Andolfi, N., Barra, M., Madeddu, A., Tisano, F., Ingallinella, V., . . . Sprovieri, M. (2016). Assessment of mercury exposure in human populations: A status report from Augusta Bay (southern Italy). *Environmental Research*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.016>
- Brieve, P. d. (1998). Métodos analíticos adecuados a su propósito. *Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. Copyright LGC (Teddington) Ltd.
- Daher, R. T. (1995). Trace metals (lead and cadmium exposure screening). *Analytical Chemistry*, 67(12), 405-410. doi: 10.1021/ac00108a022
- Davis, F., & Higson, S. P. J. (2013). Arrays of microelectrodes: technologies for environmental investigations. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15(8), 1477-1489. doi: 10.1039/C3EM00234A
- Delgado, J., Sarmiento, A. M., Condesso de Melo, M. T., & Nieto, J. M. (2009). Environmental Impact of Mining Activities in the Southern Sector of the Guadiana Basin (SW of the Iberian Peninsula). *Water, Air, and Soil Pollution*, 199(1-4), 323-341. doi: 10.1007/s11270-008-9882-x
- Dragoe, D., Spătaru, N., Kawasaki, R., Manivannan, A., Spătaru, T., Tryk, D. A., & Fujishima, A. (2006). Detection of trace levels of Pb²⁺ in tap water at boron-doped diamond electrodes with anodic stripping voltammetry. *Electrochimica*

- Acta*, 51(12), 2437-2441. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2005.07.022>
- Duffau, B., Guerrero, I., Roa, L., & Rodríguez, L. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "aspectos generales sobre la validación de métodos". *Santiago: Instituto de Salud Pública*.
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., & Soto, M. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. *Aspectos generales sobre la validación de métodos. Santiago de Chile: Departamento de salud ambiental. Instituto de Salud Pública*.
- Fischer, E., & van den Berg, C. M. G. (1999). Anodic stripping voltammetry of lead and cadmium using a mercury film electrode and thiocyanate. *Analytica Chimica Acta*, 385(1-3), 273-280. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00582-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00582-0)
- González, J. C. (2012). La historia de la teoría electroquímica y su contribución a la promoción de la explicación científica en la química escolar. *Revista Científica*(14), 8-20.
- Gumpu, M. B., Sethuraman, S., Krishnan, U. M., & Rayappan, J. B. B. (2015). A review on detection of heavy metal ions in water – An electrochemical approach. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 213, 515-533. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.02.122>
- Harris, D. (2007). Quantitative Chemical Analysis. 7, 650.
- Kavan, L., Vlckova Zivcova, Z., Petrak, V., Frank, O., Janda, P., Tarabkova, H., . . . Mortet, V. Boron-doped Diamond Electrodes: Electrochemical, Atomic Force Microscopy and Raman Study towards Corrosion-modifications at Nanoscale. *Electrochimica Acta*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.04.124>
- Kinard, J. T., & Propst, R. C. (1974). Determination of lead at the parts per billion level by cathodic stripping analysis. *Analytical Chemistry*, 46(8), 1106-1109. doi: 10.1021/ac60344a020
- Laffont, L., Hezard, T., Gros, P., Heimbürger, L.-E., Sonke, J. E., Behra, P., & Evrard, D. (2015). Mercury(II) trace detection by a gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode using square-wave anodic stripping voltammetry including a chloride desorption step. *Talanta*, 141, 26-32. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.036>
- Langeloth, M., Chiku, M., & Einaga, Y. (2010). Anodic stripping voltammetry of zinc at boron-doped diamond electrodes in ammonia buffer solution. *Electrochimica Acta*, 55(8), 2824-2828. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2009.12.097>
- Mirceski, V., Hocevar, S. B., Ogorevc, B., Gulaboski, R., & Drangov, I. (2012). Diagnostics of Anodic Stripping Mechanisms under Square-Wave Voltammetry Conditions Using Bismuth Film Substrates. *Analytical Chemistry*, 84(10), 4429-4436. doi: 10.1021/ac300135x
- Osteryoung, J. G., & Osteryoung, R. A. (1985). Square Wave Voltammetry. *Analytical Chemistry*, 57(1), 101A-110A. doi: 10.1021/ac00279a789
- Palacios, M. A. S. (2014). Métodos de Calibrado. 1.
- Pamo, E. L., Aduvire, O., & Baretino, D. (2002). Tratamientos pasivos de drenajes ácidos de mina: estado actual y perspectivas de futuro. *Boletín Geológico y minero*, 113, 3-21.

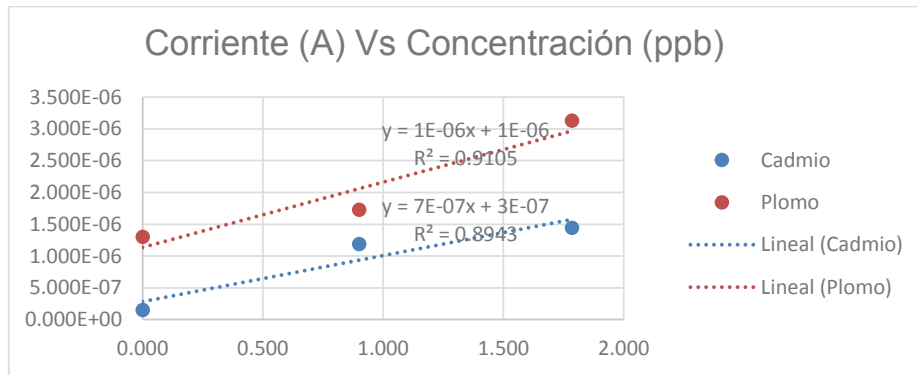
- Pleskov, Y. V., Evstefeeva, Y. E., & Baranov, A. M. (2002). Threshold effect of admixtures of platinum on the electrochemical activity of amorphous diamond-like carbon thin films. *Diamond and Related Materials*, 11(8), 1518-1522. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-9635\(02\)00057-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-9635(02)00057-2)
- Pleskov, Y. V., Evstefeeva, Y. E., Krotova, M. D., Mishuk, V. Y., Laptev, V. A., Palyanov, Y. N., & Borzdov, Y. M. (2002). Effect of Crystal Structure on the Behavior of Diamond Electrodes: Electrochemical Characteristics of Individual Crystal Faces. *Journal of the Electrochemical Society*, 149(7), E260-E264. doi: 10.1149/1.1481719
- Pleskov, Y. V., Krotova, M. D., Elkin, V. V., & Ekimov, E. A. (2015). Electrochemical Behaviour of Boron-doped Diamond Compacts – a New Electrode Material. *Electrochimica Acta*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.09.075>
- Pleskov, Y. V., Krotova, M. D., Elkin, V. V., Varnin, V. P., Teremetskaya, I. G., Saveliev, A. V., & Ralchenko, V. G. (2012). Benzene Oxidation at Diamond Electrodes: Comparison of Microcrystalline and Nanocrystalline Diamonds. *ChemPhysChem*, 13(12), 3047-3052. doi: 10.1002/cphc.201101059
- Pleskov, Y. V., Krotova, M. D., Polyakov, V. I., Khomich, A. V., Rukovishnikov, A. I., Druz, B. L., & Zaritskiy, I. (2002). Electrochemical behaviour of a-C:N:H films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 519(1–2), 60-64. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728\(01\)00722-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728(01)00722-7)
- Pleskov, Y. V., Krotova, M. D., Ralchenko, V. G., Khomich, A. V., & Khmel'nitskiy, R. A. (2003). Vacuum-annealed undoped polycrystalline CVD diamond: a new electrode material. *Electrochimica Acta*, 49(1), 41-49. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2003.05.005>
- Rao, T. N., Tryk, D., Hashimoto, K., & Fujishima, A. (1999). Band-Edge Movements of Semiconducting Diamond in Aqueous Electrolyte Induced by Anodic Surface Treatment. *Journal of the Electrochemical Society*, 146(2), 680-684.
- Rice, E. W., Bridgewater, L., & Association, A. P. H. (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater*: American Public Health Association Washington, DC.
- Rosolina, S. M., Chambers, J. Q., Lee, C. W., & Xue, Z.-L. (2015). Direct determination of cadmium and lead in pharmaceutical ingredients using anodic stripping voltammetry in aqueous and DMSO/water solutions. *Analytica Chimica Acta*, 893, 25-33. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.010>
- Rötting, T. S., Ayora, C., & Carrera, J. (2008). Improved Passive Treatment of High Zn and Mn Concentrations Using Caustic Magnesia (MgO): Particle Size Effects. *Environmental Science & Technology*, 42(24), 9370-9377. doi: 10.1021/es801761a
- Rötting, T. S., Thomas, R. C., Ayora, C., & Carrera, J. (2008). Passive Treatment of Acid Mine Drainage with High Metal Concentrations Using Dispersed Alkaline Substrate All rights reserved. No part of this periodical may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher. *Journal of Environmental Quality*, 37(5). doi: 10.2134/jeq2007.0517
- Schiewe, J., Oldham, K. B., Myland, J. C., Bond, A. M., Vicente-Beckett, V. A., & Fletcher, S. (1997). Linear-Scan Anodic Stripping Voltammetry with Thin-

- Film Electrodes: Theory of the Stripping Stage and Experimental Tests. *Analytical Chemistry*, 69(14), 2673-2681. doi: 10.1021/ac961255r
- Suteerapataranon, S., Jakmunee, J., Vaneesorn, Y., & Grudpan, K. (2002). Exploiting flow injection and sequential injection anodic stripping voltammetric systems for simultaneous determination of some metals. *Talanta*, 58(6), 1235-1242. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00445-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00445-9)
- Trzeciakowski, J. P., Gardiner, L., & Parrish, A. R. (2014). Effects of environmental levels of cadmium, lead and mercury on human renal function evaluated by structural equation modeling. *Toxicology Letters*, 228(1), 34-41. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.04.006>
- van den Berg, C. M. G. (2006). Chemical Speciation of Iron in Seawater by Cathodic Stripping Voltammetry with Dihydroxynaphthalene. *Analytical Chemistry*, 78(1), 156-163. doi: 10.1021/ac051441+
- Vinokur, N., Miller, B., Avyigal, Y., & Kalish, R. (1996). Electrochemical Behavior of Boron-Doped Diamond Electrodes. *Journal of the Electrochemical Society*, 143(10), L238-L240. doi: 10.1149/1.1837157
- Wang, J., Lu, J., Hocevar, S. B., Farias, P. A. M., & Ogorevc, B. (2000). Bismuth-Coated Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry. *Analytical Chemistry*, 72(14), 3218-3222. doi: 10.1021/ac000108x
- Zárate, E., & Mendoza, J. (2009). Implementación del Método Voltamperométrico de Redisolución Anódica con Electrodo de Oro para la Determinación de Mercurio en Agua Potable Universidad de Santander. *Universidad de Santander*, 1, 1-18.
- Zhu, L., Xu, L., Huang, B., Jia, N., Tan, L., & Yao, S. (2014). Simultaneous determination of Cd(II) and Pb(II) using square wave anodic stripping voltammetry at a gold nanoparticle-graphene-cysteine composite modified bismuth film electrode. *Electrochimica Acta*, 115, 471-477. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.10.209>

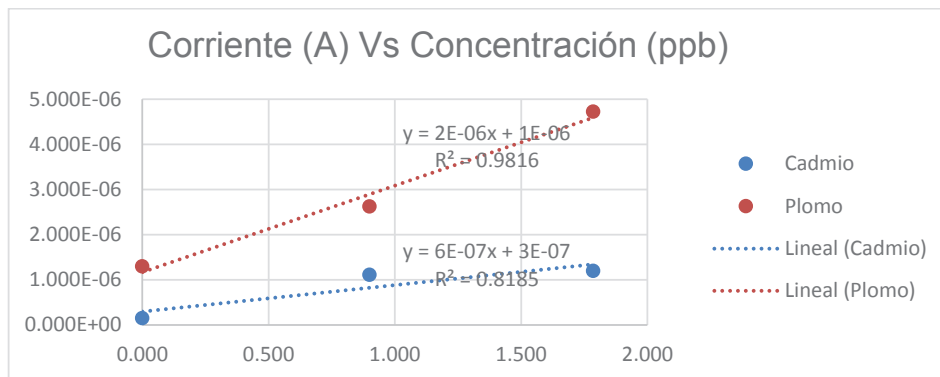
ANEXOS

ANEXO N° 1
CURVAS DE CONCENTRACIÓN PARA DETERMINAR EL
LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
CADMIO (Cd II) Y PLOMO (Pb II)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL Cd	SEÑAL Pb
0.000	1.549E-07	1.302E-06
0.900	1.191E-06	1.729E-06
1.785	1.446E-06	3.134E-06
PENDIENTE	7.24514E-07	1.02477E-06
INTERSECCIÓN	2.82193E-07	1.13783E-06
CORRELACIÓN	0.9456559	0.95419844
CONCENTRACIÓN	0.389493214	1.11032474

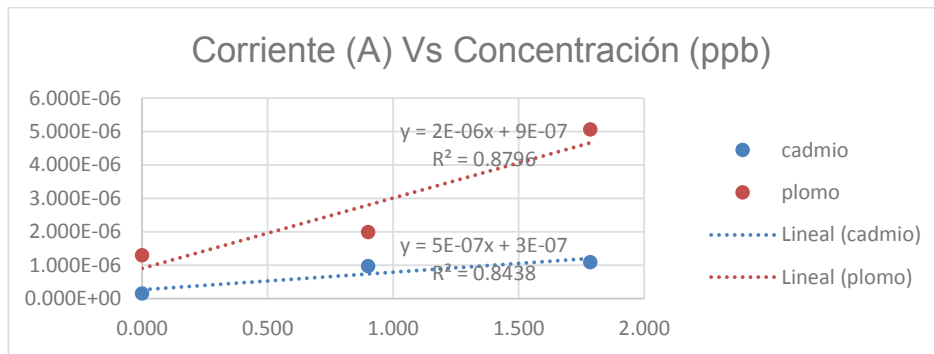


CONCENTRACIÓN	SEÑAL Cd	SEÑAL Pb
0.000	1.549E-07	1.302E-06
0.900	1.110E-06	2.623E-06
1.785	1.201E-06	4.726E-06
PENDIENTE	5.87393E-07	1.91694E-06
INTERSECCIÓN	2.9625E-07	1.16801E-06
CORRELACIÓN	0.904688473	0.990772333
CONCENTRACIÓN	0.504348042	0.609311133



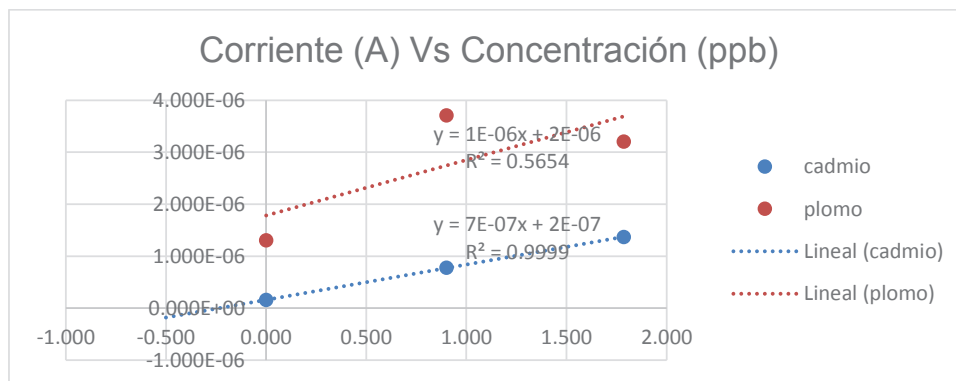
1)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL Cd	SEÑAL Pb
0.000	1.549E-07	1.302E-06
0.900	9.755E-07	1.995E-06
1.785	1.090E-06	5.062E-06
PENDIENTE	5.24961E-07	2.10267E-06
INTERSECCIÓN	2.70293E-07	9.04446E-07
CORRELACIÓN	0.918602746	0.937851082
CONCENTRACIÓN	0.514881867	0.430142043



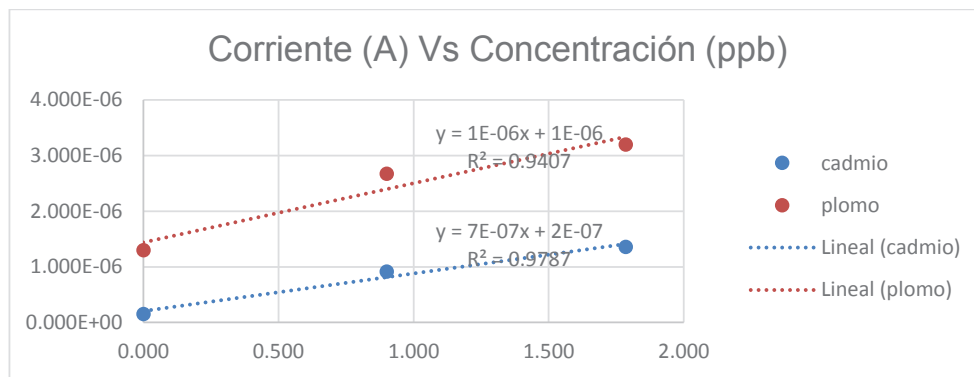
2)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL Cd	SEÑAL Pb
0.000	1.549E-07	1.302E-06
0.900	7.770E-07	3.710E-06
1.785	1.368E-06	3.203E-06
PENDIENTE	6.79641E-07	1.06954E-06
INTERSECCIÓN	1.58355E-07	1.7811E-06
CORRELACIÓN	0.999950512	0.758466342
CONCENTRACIÓN	0.23299806	1.665302213



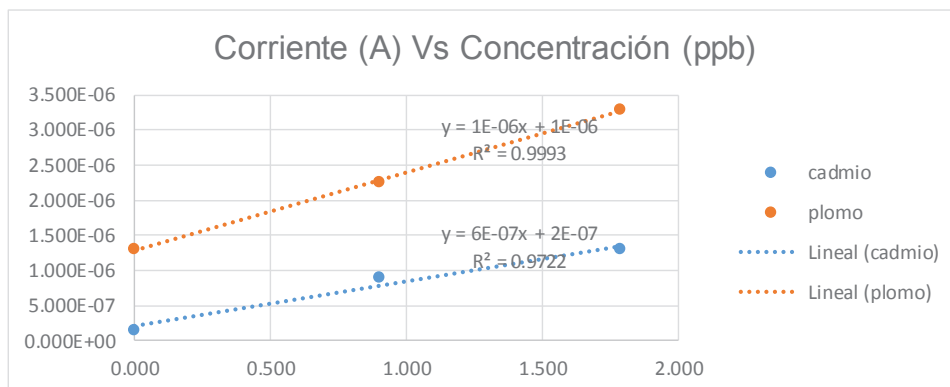
3)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL Cd	SEÑAL Pb
0.000	1.549E-07	1.302E-06
0.900	9.167E-07	2.673E-06
1.785	1.360E-06	3.201E-06
PENDIENTE	6.7561E-07	1.06516E-06
INTERSECCIÓN	2.05862E-07	1.43868E-06
CORRELACIÓN	0.989277801	0.969883588
CONCENTRACIÓN	0.304706024	1.350664937



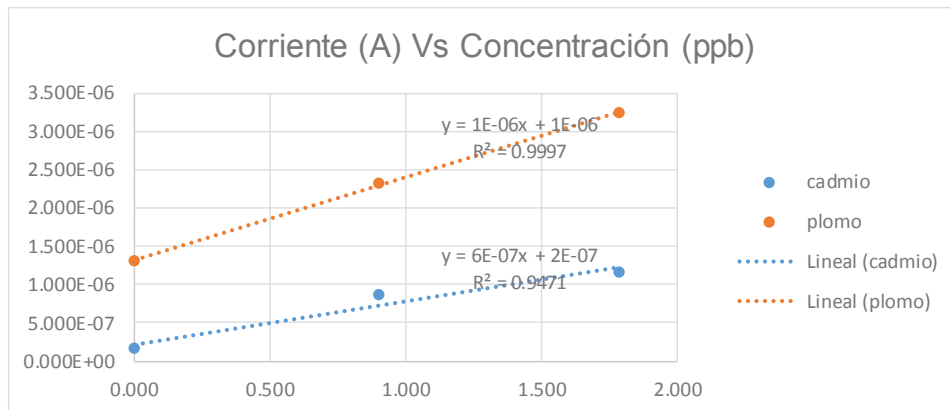
4)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL Cd	SEÑAL Pb
0.000	1.549E-07	1.302E-06
0.900	8.980E-07	2.260E-06
1.785	1.297E-06	3.293E-06
PENDIENTE	6.40357E-07	1.11526E-06
INTERSECCIÓN	2.10181E-07	1.28684E-06
CORRELACIÓN	0.98602576	0.981246728
CONCENTRACIÓN	0.328224226	1.153845524



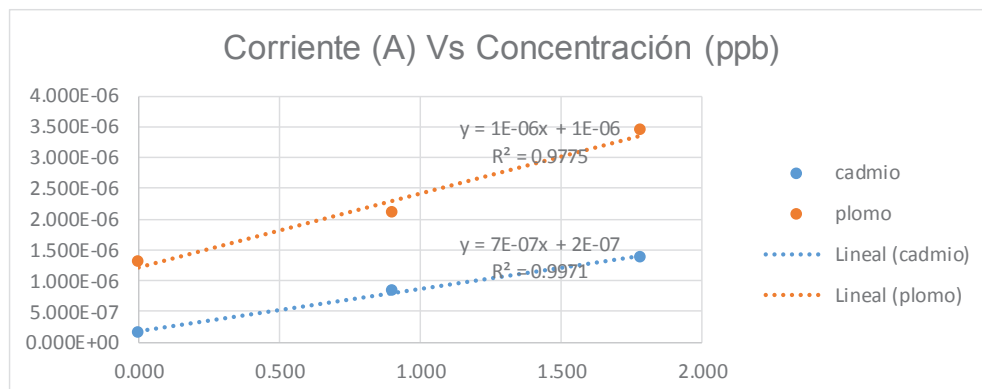
5)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL Cd	SEÑAL Pb
0.000	1.549E-07	1.302E-06
0.900	8.620E-07	2.310E-06
1.785	1.152E-06	3.241E-06
PENDIENTE	5.59241E-07	1.08637E-06
INTERSECCIÓN	1.31203E-06	1.31203E-06
CORRELACIÓN	0.973180063	0.999836713
CONCENTRACIÓN	2.346095564	1.207721739



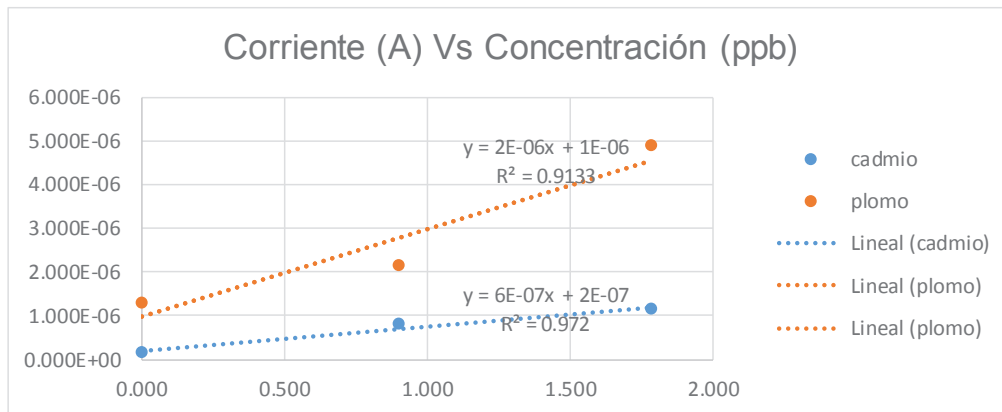
6)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL Cd	SEÑAL Pb
0.000	1.549E-07	1.302E-06
0.900	8.330E-07	2.105E-06
1.785	1.385E-06	3.456E-06
PENDIENTE	6.89313E-07	1.20583E-06
INTERSECCIÓN	1.74031E-07	1.20844E-06
CORRELACIÓN	0.998528031	0.988667326
CONCENTRACIÓN	0.252470468	1.002164947



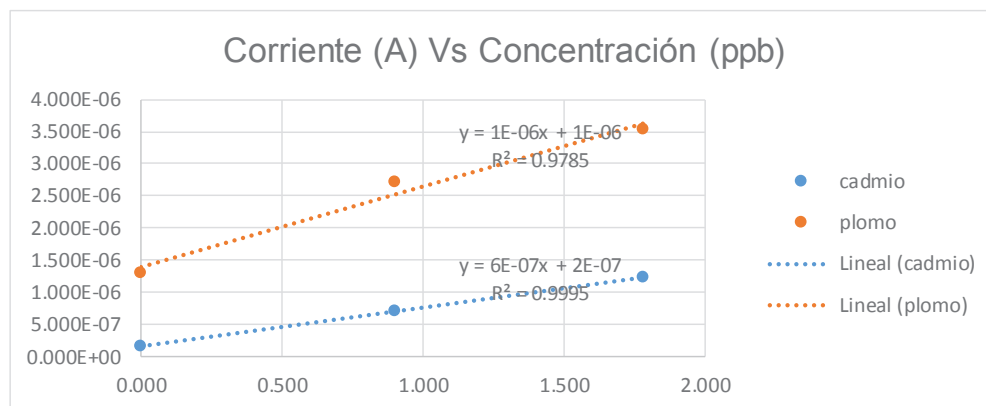
7)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL Cd	SEÑAL Pb
0.000	1.549E-07	1.302E-06
0.900	7.952E-07	2.155E-06
1.785	1.138E-06	4.890E-06
PENDIENTE	5.5121E-07	2.00708E-06
INTERSECCIÓN	2.027E-07	9.85994E-07
CORRELACIÓN	0.985901611	0.955658735
CONCENTRACIÓN	0.367736715	0.491256925



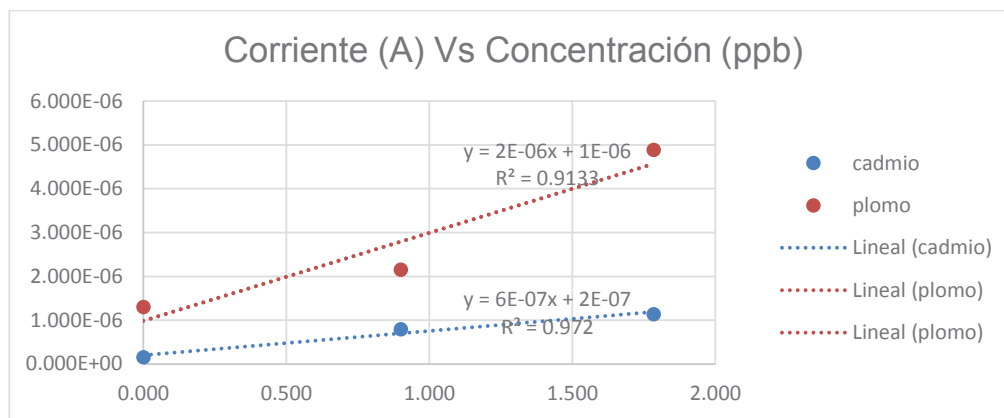
8)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL Cd	SEÑAL Pb
0.000	1.549E-07	1.302E-06
0.900	7.161E-07	2.710E-06
1.785	1.225E-06	3.527E-06
PENDIENTE	5.99564E-07	1.2474E-06
INTERSECCIÓN	1.62057E-07	1.39658E-06
CORRELACIÓN	0.999727208	0.989168392
CONCENTRACIÓN	0.270291694	1.119595731



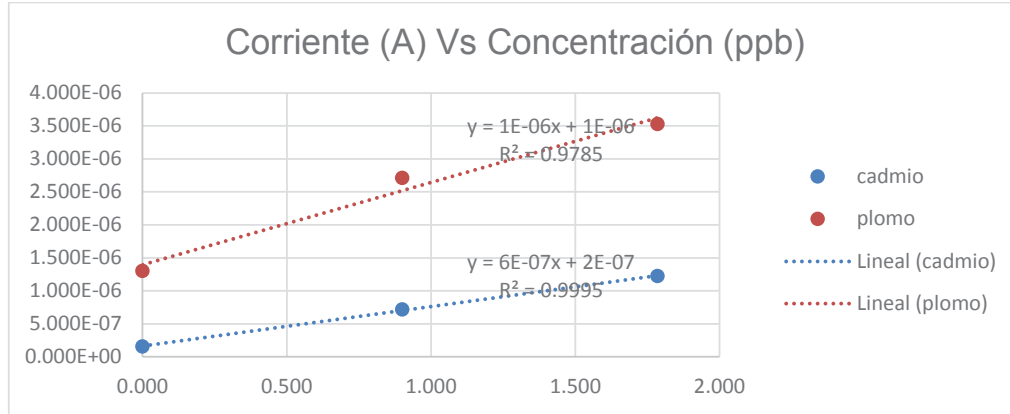
9)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL Cd	SEÑAL Pb
0.000	1.549E-07	1.302E-06
0.900	7.952E-07	2.155E-06
1.785	1.138E-06	4.890E-06
PENDIENTE	5.5121E-07	2.00708E-06
INTERSECCIÓN	2.027E-07	9.85994E-07
CORRELACIÓN	0.985901611	0.955658735
CONCENTRACIÓN	0.367736715	0.491256925



10)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL Cd	SEÑAL Pb
0.000	1.549E-07	1.302E-06
0.900	7.161E-07	2.710E-06
1.785	1.225E-06	3.527E-06
PENDIENTE	5.99564E-07	1.2474E-06
INTERSECCIÓN	1.62057E-07	1.39658E-06
CORRELACIÓN	0.999727208	0.989168392
CONCENTRACIÓN	0.270291694	1.119595731

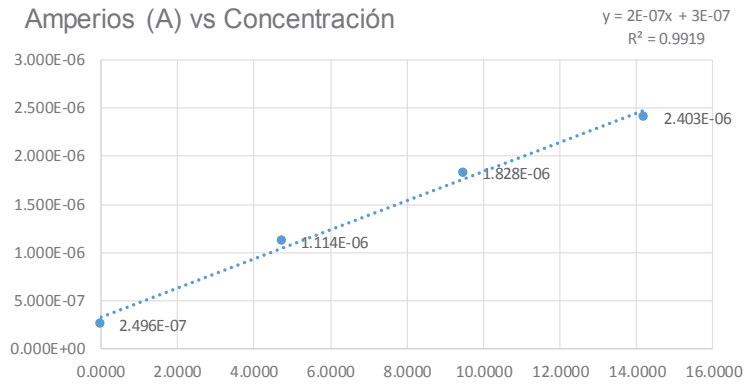


ANEXO N° 2
CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA 5, 10, 15 Y 20 ppb DE
CADMIO Cd(II)

5 ppb de Cadmio

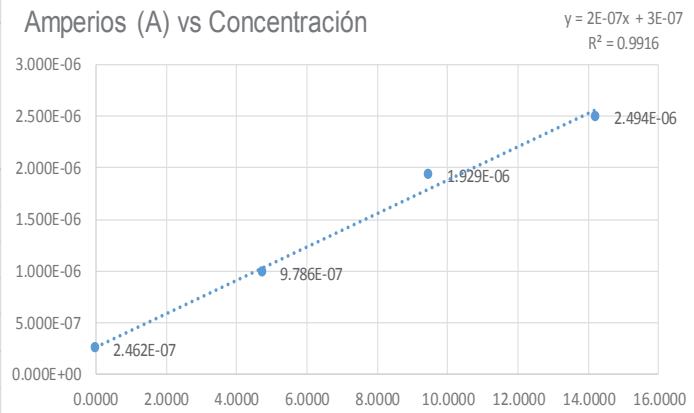
Concentración	Señal
0.0000	2.496E-07
4.7393	1.114E-06
9.4786	1.828E-06
14.2180	2.403E-06
Pendiente (m)	1.51376E-07
Intersección (a)	3.22523E-07
Correlación R ²	0.995954903
Vol. Total (ml)	10.65
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.6625
Concentración	5.672762607

Amperios (A) vs Concentración



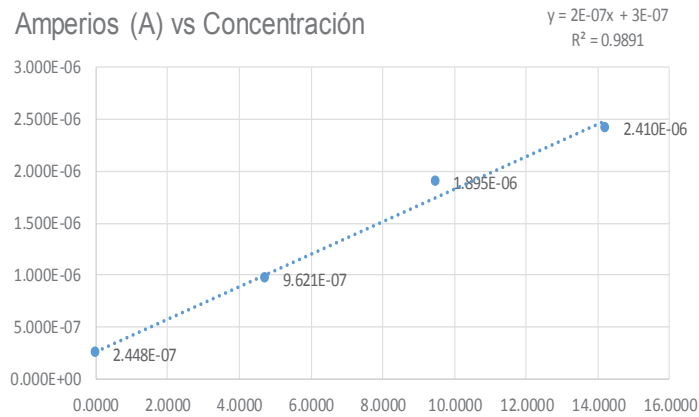
Concentración	Señal
0.0000	2.462E-07
4.7393	9.786E-07
9.4786	1.929E-06
14.2180	2.494E-06
Pendiente (m)	1.62339E-07
Intersección (a)	2.57884E-07
Correlación R ²	0.995767739
Vol. Total (ml)	10.65
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.6625
Concentración	4.229506944

Amperios (A) vs Concentración



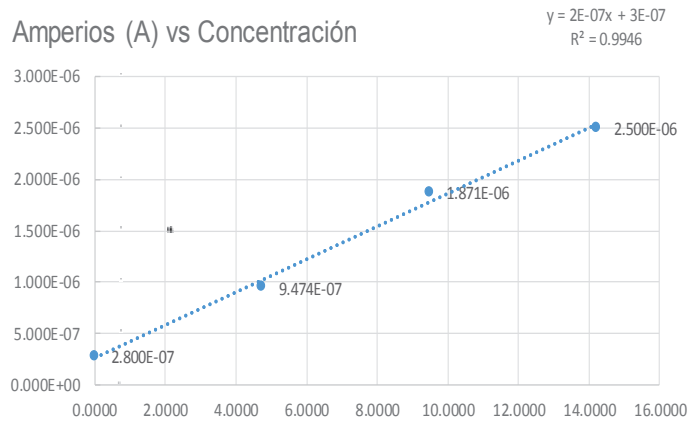
Concentración	Señal
0.0000	2.448E-07
4.7393	9.621E-07
9.4786	1.895E-06
14.2180	2.410E-06
Pendiente (m)	1.56743E-07
Intersección (a)	2.63683E-07
Correlación R ²	0.994553876
Vol. Total (ml)	10.65
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.6625
Concentración	4.479009088

Amperios (A) vs Concentración



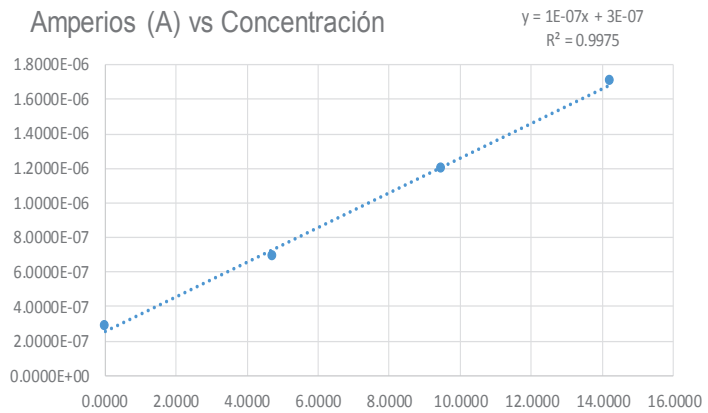
Concentración	Señal
0.0000	2.800E-07
4.7393	9.474E-07
9.4786	1.871E-06
14.2180	2.500E-06
Pendiente (m)	1.60014E-07
Intersección (a)	2.62063E-07
Correlación R ²	0.997309006
Vol. Total (ml)	10.65
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.6625
Concentración	4.360513827

Amperios (A) vs Concentración



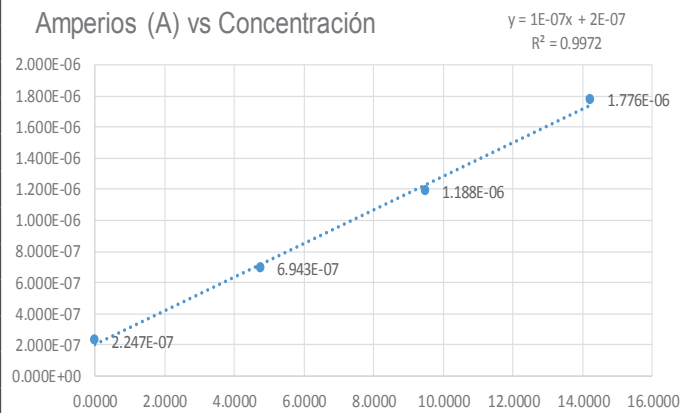
Concentración	Señal
0.0000	2.8480E-07
4.7393	6.9340E-07
9.4786	1.2010E-06
14.2180	1.7060E-06
Pendiente (m)	1.00672E-07
Intersección (a)	2.55622E-07
Correlación R ²	0.99875521
Vol. Total (ml)	10.65
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.6625
Concentración	6.760470439

Amperios (A) vs Concentración



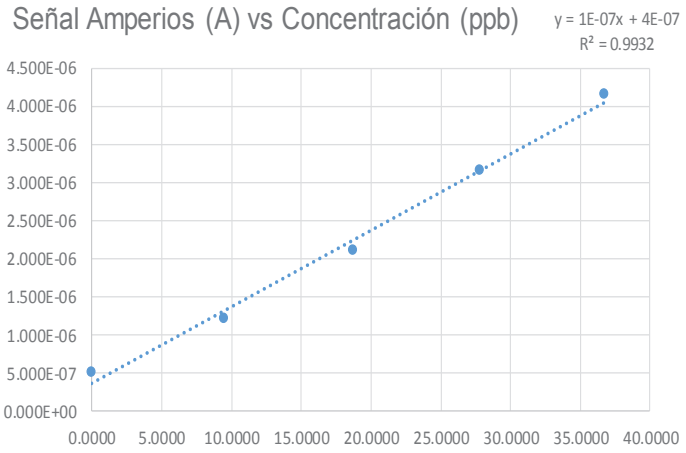
Concentración	Señal
0.0000	2.247E-07
4.7393	6.943E-07
9.4786	1.188E-06
14.2180	1.776E-06
Pendiente (m)	1.08615E-07
Intersección (a)	1.98612E-07
Correlación R ²	0.998587664
Vol. Total (ml)	10.65
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.6625
Concentración	4.868633234

Amperios (A) vs Concentración

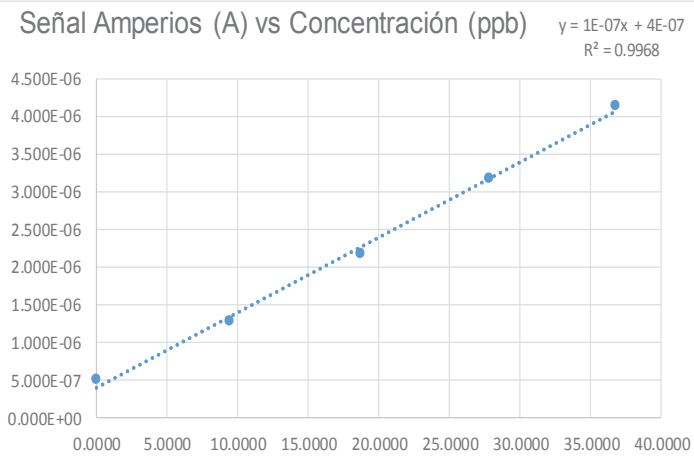


10 ppb de Cadmio

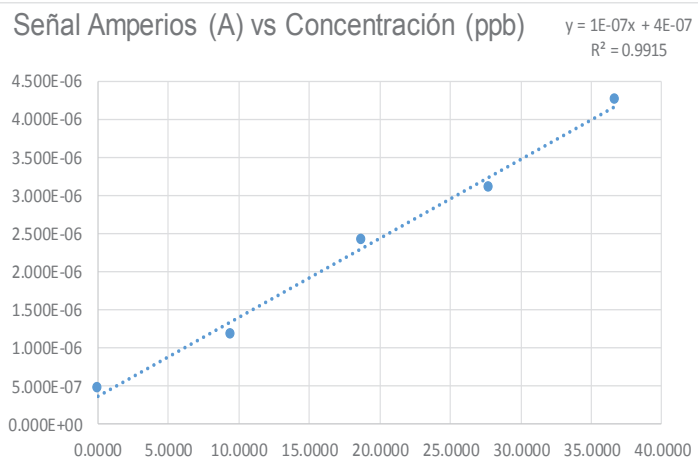
Concentración	Señal
0.0000	5.008E-07
9.4339	1.215E-06
18.6915	2.102E-06
27.7777	3.164E-06
36.6972	4.158E-06
Pendiente (m)	1.00889E-07
Intersección (a)	3.59489E-07
Correlación R^2	0.996573737
Vol. Total (ml)	10.65
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.725
Concentración	9.709752764



Concentración	Señal
0.0000	5.001E-07
9.4339	1.285E-06
18.6915	2.179E-06
27.7777	3.174E-06
36.6972	4.146E-06
Pendiente (m)	1.00015E-07
Intersección (a)	4.04531E-07
Correlación R^2	0.998384279
Vol. Total (ml)	10.65
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.725
Concentración	11.02177325

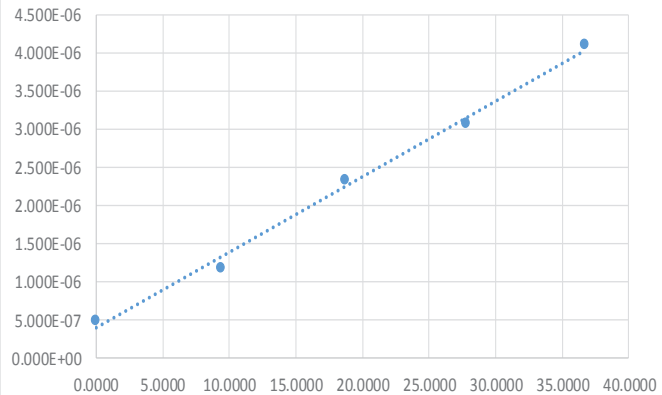


Concentración	Señal
0.0000	4.793E-07
9.4339	1.186E-06
18.6915	2.414E-06
27.7777	3.110E-06
36.6972	4.267E-06
Pendiente (m)	1.03499E-07
Intersección (a)	3.74457E-07
Correlación R^2	0.995727165
Vol. Total (ml)	10.65
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.725
Concentración	9.859018621



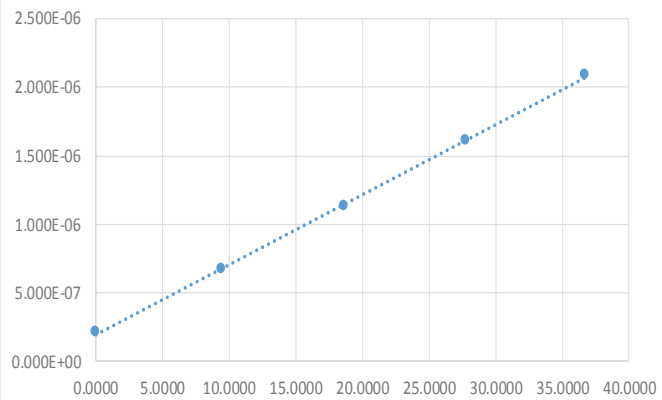
Concentración	Señal
0.0000	4.813E-07
9.4339	1.186E-06
18.6915	2.340E-06
27.7777	3.080E-06
36.6972	4.098E-06
Pendiente (m)	9.946E-08
Intersección (a)	3.95055E-07
Correlación R ²	0.997284942
Vol. Total (ml)	10.65
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.725
Concentración	10.82370644

Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb) $y = 1E-07x + 4E-07$
 $R^2 = 0.9946$



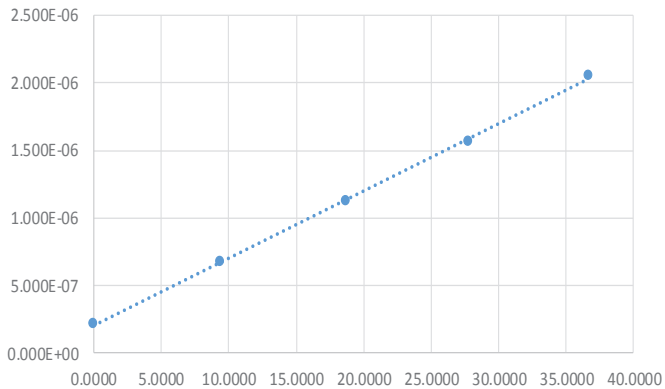
Concentración	Señal
0.0000	2.153E-07
9.4339	6.751E-07
18.6915	1.129E-06
27.7777	1.613E-06
36.6972	2.088E-06
Pendiente (m)	5.10383E-08
Intersección (a)	1.98848E-07
Correlación R ²	0.999739931
Vol. Total (ml)	10.65
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.725
Concentración	10.61672744

Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb) $y = 5E-08x + 2E-07$
 $R^2 = 0.9995$



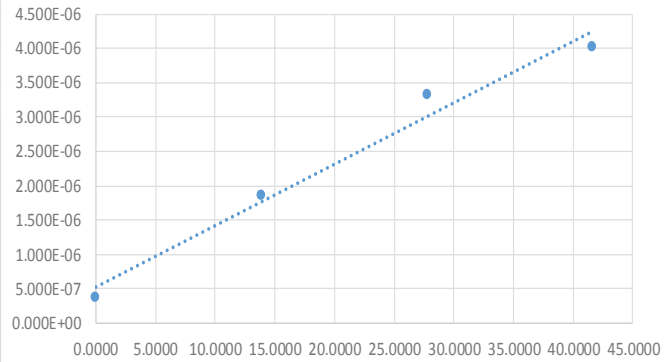
Concentración	Señal
0.0000	2.113E-07
9.4339	6.712E-07
18.6915	1.127E-06
27.7777	1.561E-06
36.6972	2.056E-06
Pendiente (m)	4.9905E-08
Intersección (a)	2.01056E-07
Correlación R ²	0.999666303
Vol. Total (ml)	10.65
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.725
Concentración	10.97843524

Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb) $y = 5E-08x + 2E-07$
 $R^2 = 0.9993$

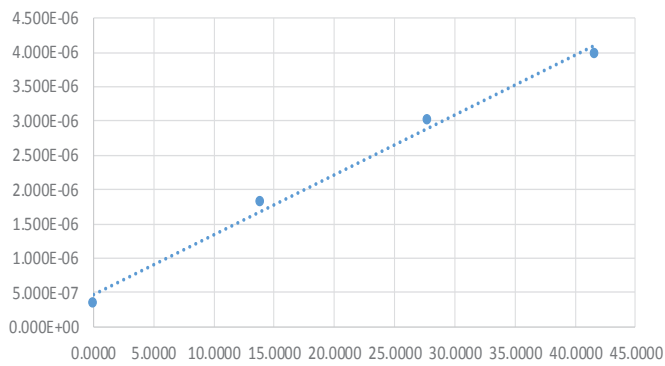


15 ppb de Cadmio

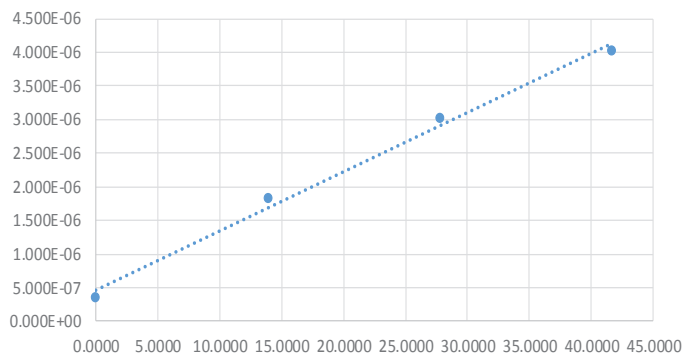
Concentración	Señal
0.0000	3.710E-07
13.8888	1.851E-06
27.7777	3.328E-06
41.6640	4.015E-06
Pendiente (m)	8.93506E-08
Intersección (a)	5.29843E-07
Correlación R ²	0.988005604
Vol. Total (ml)	10.8
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.7
Concentración	16.01083018

Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb) $y = 9E-08x + 5E-07$
 $R^2 = 0.9762$ 

Concentración	Señal
0.0000	3.450E-07
13.8888	1.808E-06
27.7777	3.009E-06
41.6640	3.979E-06
Pendiente (m)	8.71469E-08
Intersección (a)	4.69751E-07
Correlación R ²	0.995877907
Vol. Total (ml)	10.8
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.7
Concentración	14.55389216

Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb) $y = 9E-08x + 5E-07$
 $R^2 = 0.9918$ 

Concentración	Señal
0.0000	3.409E-07
13.8888	1.826E-06
27.7777	3.011E-06
41.6640	4.025E-06
Pendiente (m)	8.81139E-08
Intersección (a)	4.65081E-07
Correlación R ²	0.996263623
Vol. Total (ml)	10.8
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.7
Concentración	14.25107798

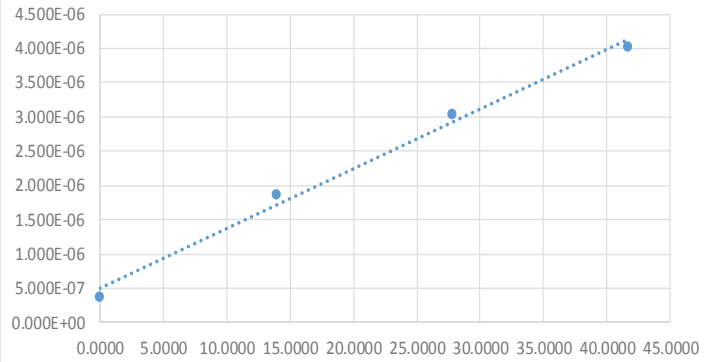
Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb) $y = 9E-08x + 5E-07$
 $R^2 = 0.9925$ 

Concentración	Señal
0.0000	3.710E-07
13.8888	1.862E-06
27.7777	3.042E-06
41.6640	4.018E-06
Pendiente (m)	8.72765E-08
Intersección (a)	5.05051E-07
Correlación R^2	0.995482393
Vol. Total (ml)	10.8
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.7
Concentración	15.62432049

Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb)

$$y = 9E-08x + 5E-07$$

$$R^2 = 0.991$$

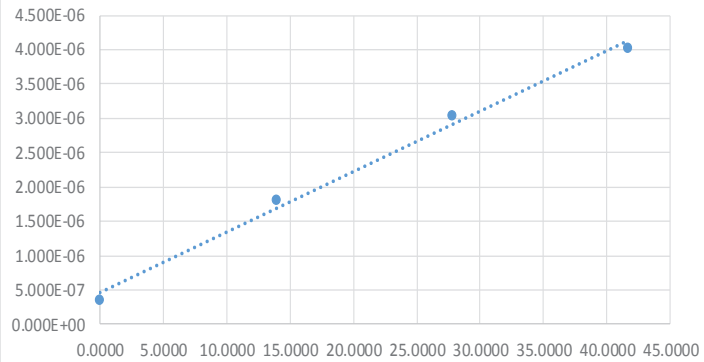


Concentración	Señal
0.0000	3.457E-07
13.8888	1.801E-06
27.7777	3.042E-06
41.6640	4.015E-06
Pendiente (m)	8.81975E-08
Intersección (a)	4.6354E-07
Correlación R^2	0.996140536
Vol. Total (ml)	10.8
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.7
Concentración	14.1904102

Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb)

$$y = 9E-08x + 5E-07$$

$$R^2 = 0.9923$$

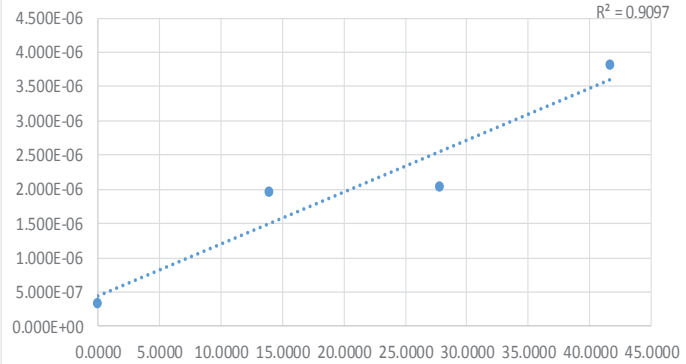


Concentración	Señal
0.0000	3.214E-07
13.8888	1.961E-06
27.7777	2.024E-06
41.6640	3.816E-06
Pendiente (m)	7.59408E-08
Intersección (a)	4.48554E-07
Correlación R^2	0.953768862
Vol. Total (ml)	10.8
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.7
Concentración	15.94791806

Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb)

$$y = 8E-08x + 4E-07$$

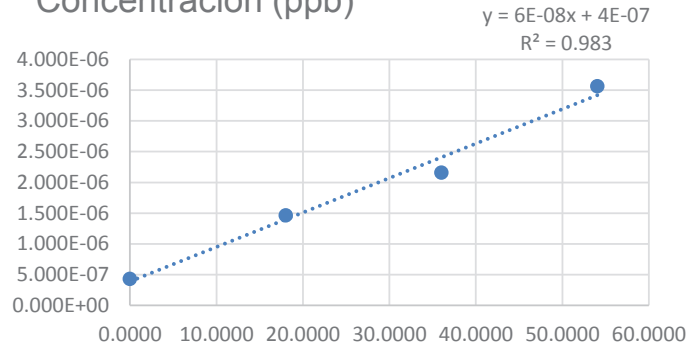
$$R^2 = 0.9097$$



20 ppb de Cd

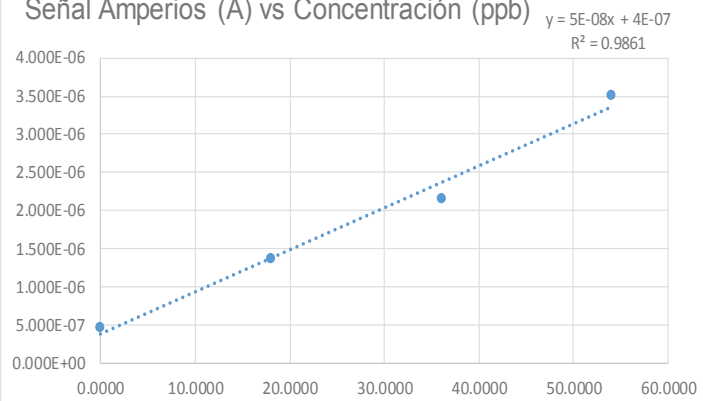
Concentración	Señal
0.0000	4.308E-07
18.0100	1.465E-06
36.0300	2.161E-06
54.0540	3.562E-06
Pendiente (m)	5.59973E-08
Intersección (a)	3.91457E-07
Correlación R ²	0.991471994
Vol. Total (ml)	11.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.775
Concentración	19.39900778

Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb)



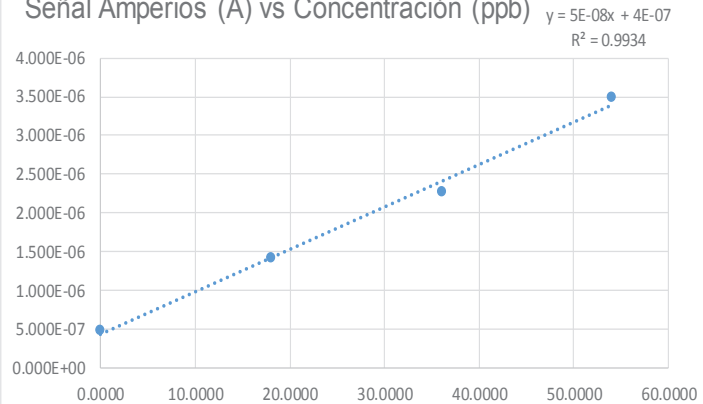
Concentración	Señal
0.0000	4.636E-07
18.0100	1.374E-06
36.0300	2.162E-06
54.0540	3.503E-06
Pendiente (m)	5.49797E-08
Intersección (a)	3.89907E-07
Correlación R ²	0.993040311
Vol. Total (ml)	11.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.775
Concentración	19.67987225

Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb)



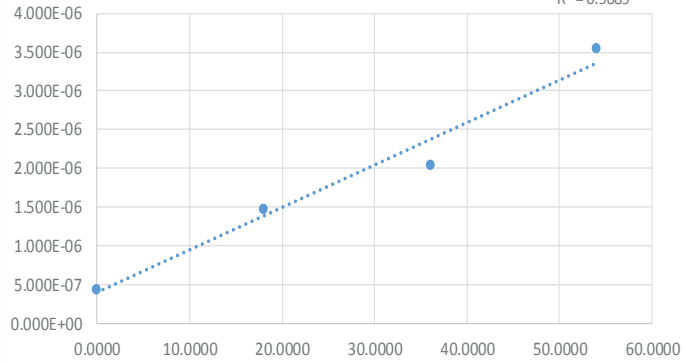
Concentración	Señal
0.0000	4.899E-07
18.0100	1.415E-06
36.0300	2.270E-06
54.0540	3.496E-06
Pendiente (m)	5.47968E-08
Intersección (a)	4.36923E-07
Correlación R ²	0.996706783
Vol. Total (ml)	11.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.775
Concentración	22.12648488

Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb)



Concentración	Señal
0.0000	4.400E-07
18.0100	1.471E-06
36.0300	2.038E-06
54.0540	3.550E-06
Pendiente (m)	5.49286E-08
Intersección (a)	3.90388E-07
Correlación R ²	0.984350616
Vol. Total (ml)	11.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.775
Concentración	19.72245215

Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb) $y = 5E-08x + 4E-07$
 $R^2 = 0.9689$

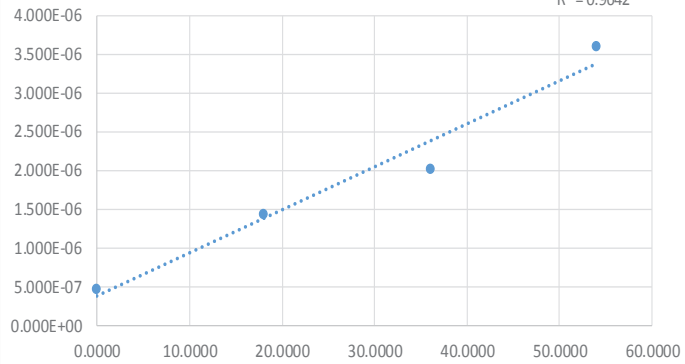


Concentración	Señal
0.0000	4.596E-07
18.0100	1.435E-06
36.0300	2.017E-06
54.0540	3.590E-06
Pendiente (m)	5.53517E-08
Intersección (a)	3.79602E-07
Correlación R ²	0.981911647
Vol. Total (ml)	11.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.775
Concentración	19.03096486

Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb)

$$y = 6E-08x + 4E-07$$

$$R^2 = 0.9642$$

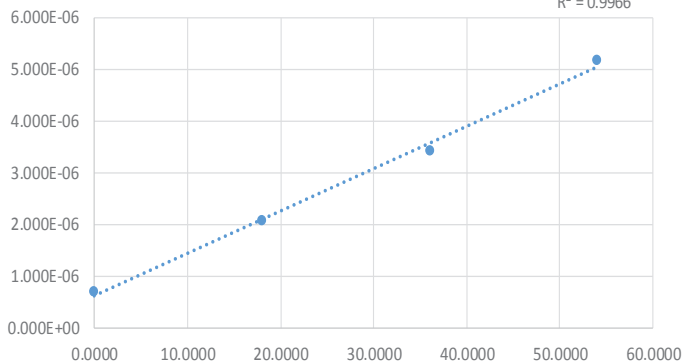


Concentración	Señal
0.0000	6.843E-07
18.0100	2.073E-06
36.0300	3.425E-06
54.0540	5.155E-06
Pendiente (m)	8.19406E-08
Intersección (a)	6.20004E-07
Correlación R ²	0.99828204
Vol. Total (ml)	11.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.775
Concentración	20.99704415

Señal Amperios (A) vs Concentración (ppb)

$$y = 8E-08x + 6E-07$$

$$R^2 = 0.9966$$

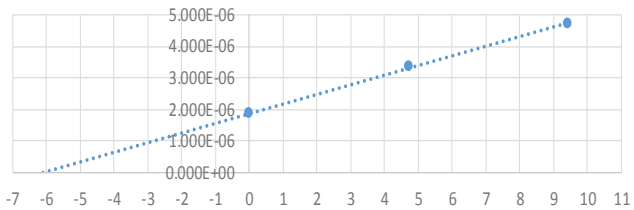


ANEXO N^o 3
CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA 5, 10, 15 Y 20 ppb DE
PLOMO (Pb II)

5 ppb Pb

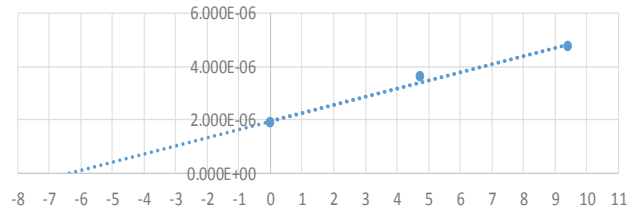
1)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	1.848E-06
4.739	3.353E-06
9.43E+00	4.727E-06
m	3.0522E-07
a	1.8675E-06
R	0.99972365
[Pb] ppb	6.11827842

Señal Amperios (A) vs Concentración(ppb) $y = 3E-07x + 2E-06$
 $R^2 = 0.9994$ 

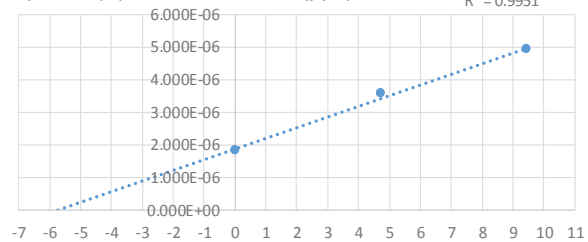
2)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	1.848E-06
4.739	3.583E-06
9.43E+00	4.725E-06
m	3.0509E-07
a	1.9441E-06
R	0.99331529
[Pb] ppb	6.37215165

Señal Amperios (A) vs Concentración(ppb) $y = 3E-07x + 2E-06$
 $R^2 = 0.9867$ 

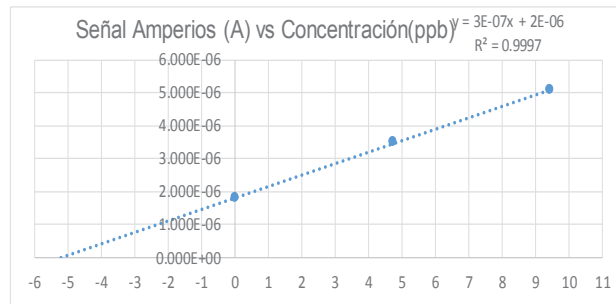
3)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	1.824E-06
4.739	3.565E-06
9.43E+00	4.917E-06
m	3.2795E-07
a	1.8861E-06
R	0.9975698
[Pb] ppb	5.75102929

Señal Amperios (A) vs Concentración(ppb) $y = 3E-07x + 2E-06$
 $R^2 = 0.9951$ 

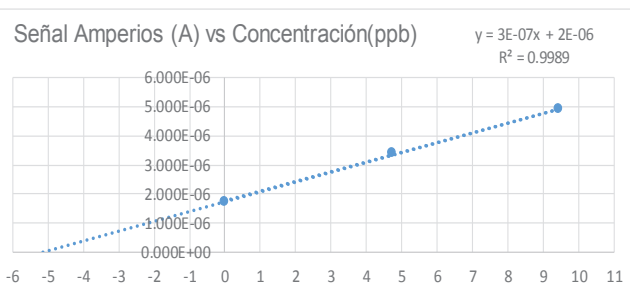
4)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	1.799E-06
4.739	3.497E-06
9.43E+00	5.079E-06
m	3.4773E-07
a	1.8156E-06
R	0.99984404
[Pb] ppb	5.22138759



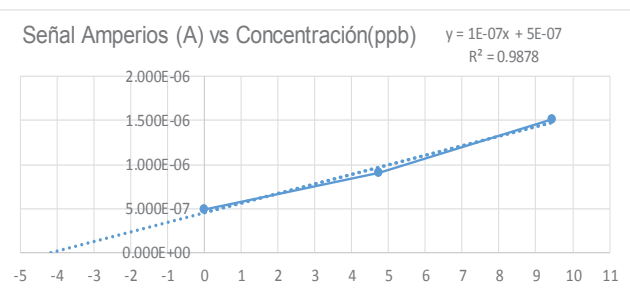
5)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	1.716E-06
4.739	3.411E-06
9.43E+00	4.905E-06
m	3.381E-07
a	1.7468E-06
R	0.99943491
[Pb] ppb	5.16657072



6)

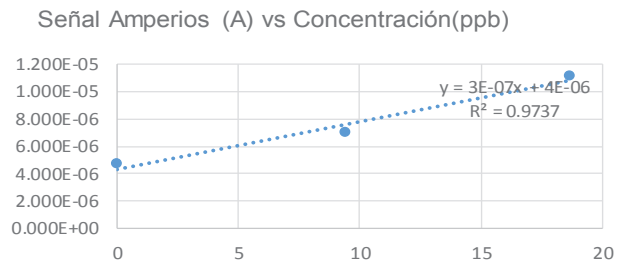
CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	4.859E-07
4.739	9.031E-07
9.43E+00	1.513E-06
m	1.089E-07
a	4.531E-07
R	9.939E-01
[Pb] ppb	4.163E+00



10 ppb (Pb)

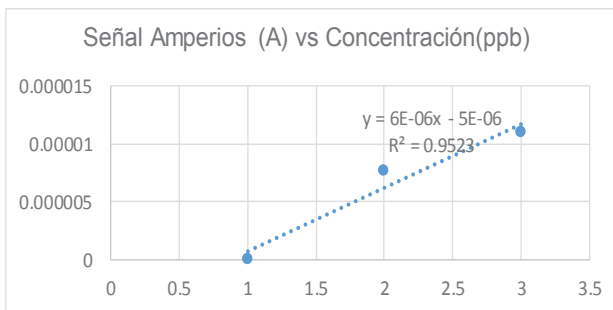
1)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	4.646E-06
9.433	7.003E-06
18.6915	1.115E-05
m	3.4766E-07
a	4.3404E-06
R	0.98675004
[Pb] ppb	12.4848011



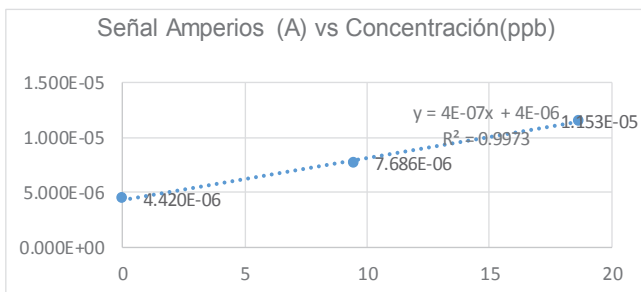
2)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL
9.433	7.638E-06
18.6915	1.101E-05
m	3.6421E-07
a	4.2024E-06
R	1
[Pb] ppb	11.5386557



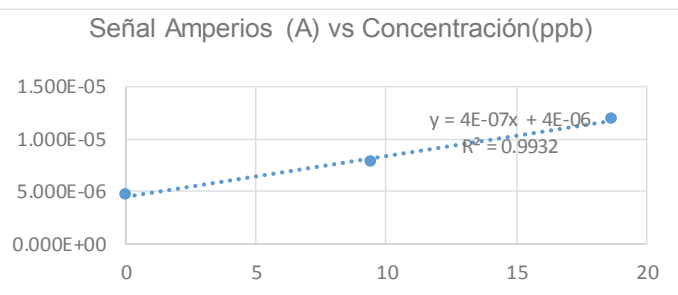
3)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	4.420E-06
9.433	7.686E-06
18.6915	1.153E-05
m	3.8028E-07
a	4.3136E-06
R	0.99863316
[Pb] ppb	11.3432598



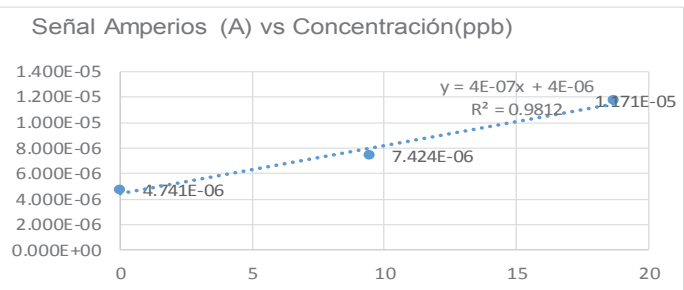
4)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	4.608E-06
9.433	7.792E-06
18.6915	1.196E-05
m	3.9316E-07
a	4.4342E-06
R	0.99659799
[Pb] ppb	11.2784083



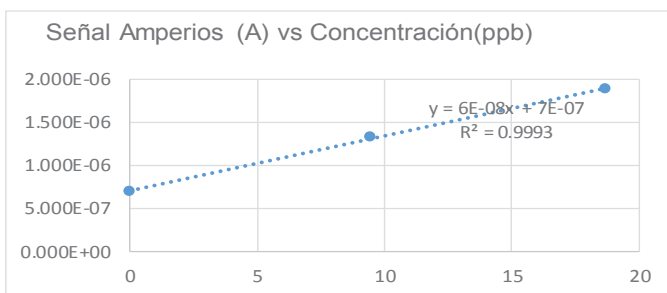
5)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	4.741E-06
9.433	7.424E-06
18.6915	1.171E-05
m	3.7257E-07
a	4.4656E-06
R	0.99057289
[Pb] ppb	11.9860601



6)

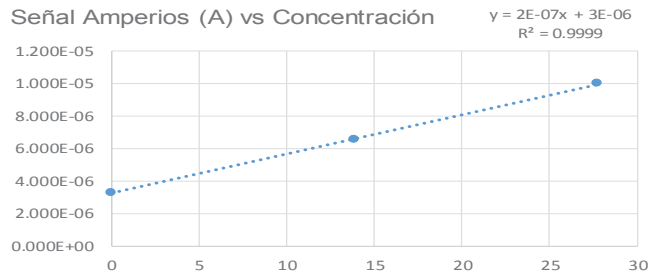
CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	6.947E-07
9.433	1.327E-06
18.6915	1.893E-06
m	6.4119E-08
a	7.038E-07
R	0.99964775
[Pb] ppb	10.9765378



15 ppb (Pb)

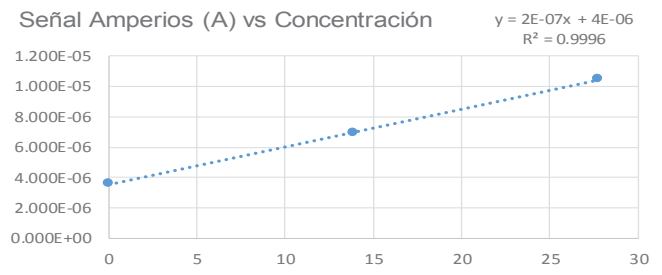
1)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	3.278E-06
13.888	6.577E-06
27.77	9.999E-06
m	2.42E-07
a	3.257E-06
R	0.9999429
[Pb] ppb	13.458458



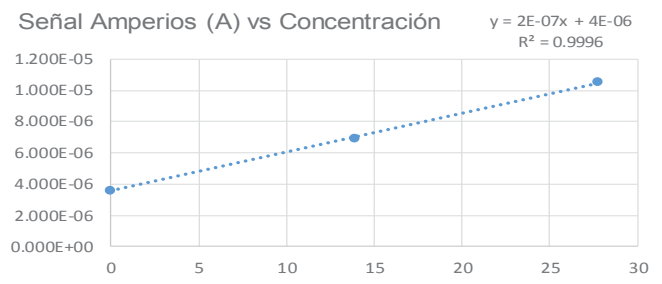
2)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	3.605E-06
13.888	6.928E-06
27.77	1.050E-05
m	2.483E-07
a	3.563E-06
R	0.9997801
[Pb] ppb	14.35127

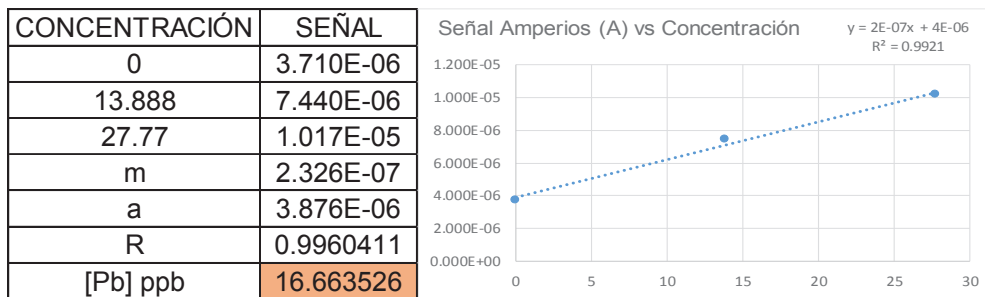


3)

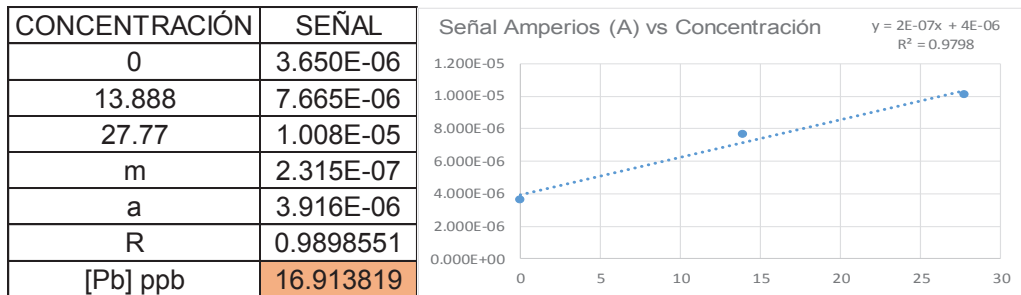
CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	3.680E-06
13.888	7.172E-06
27.77	1.071E-05
m	2.532E-07
a	3.672E-06
R	0.9999924
[Pb] ppb	14.505514



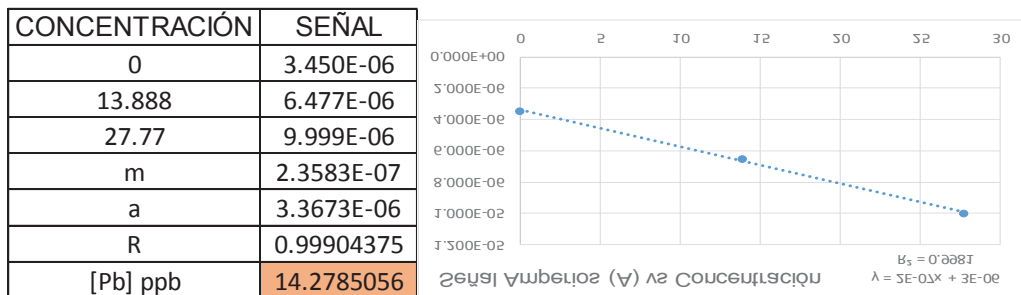
4)



5)



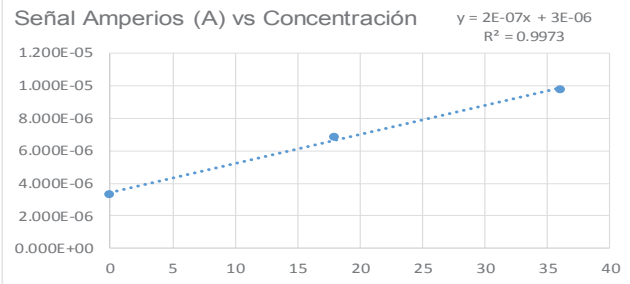
6)



20 ppb (Pb)

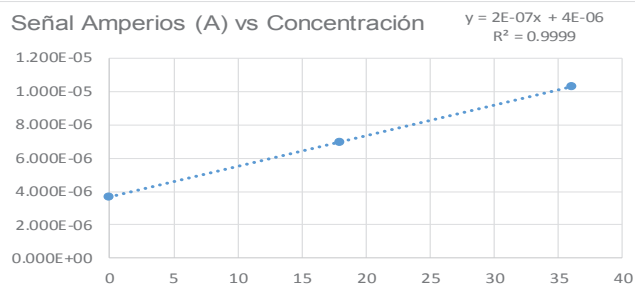
1)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	3.326E-06
18.01	6.826E-06
36.03	9.752E-06
m	1.783E-07
a	3.422E-06
R	0.9986646
[Pb] ppb	19.18695



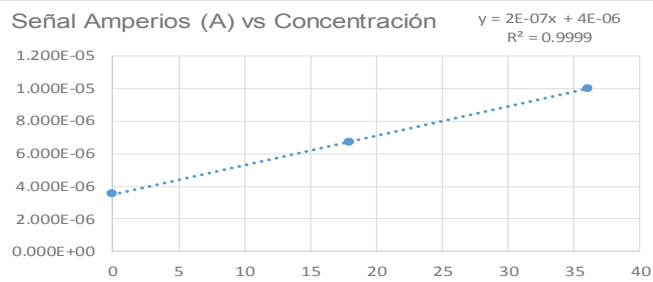
2)

CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	3.671E-06
18.01	6.935E-06
36.03	1.030E-05
m	1.84E-07
a	3.654E-06
R	0.9999627
[Pb] ppb	19.862774

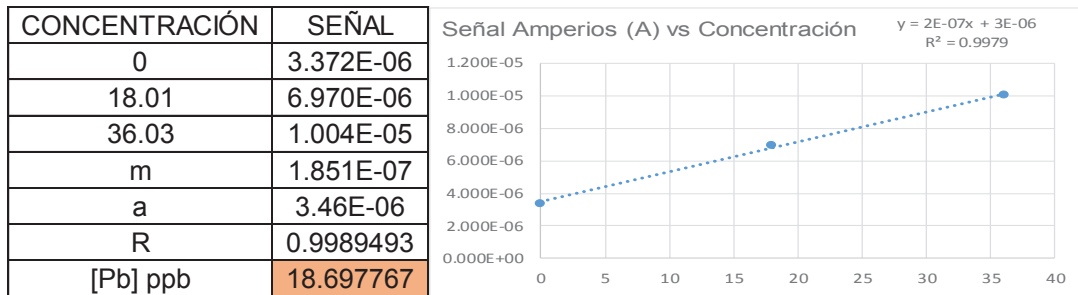


3)

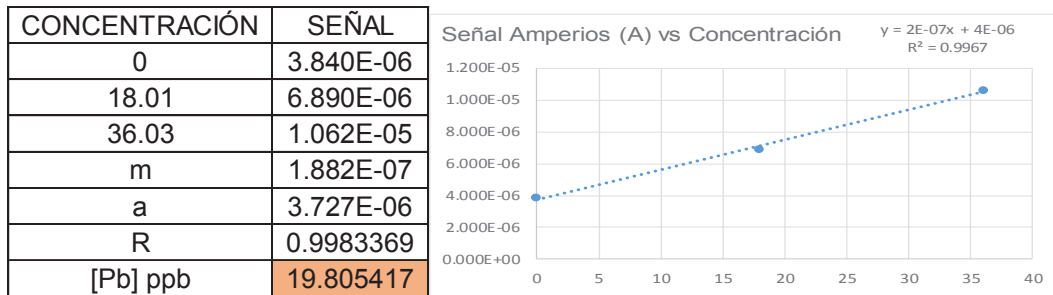
CONCENTRACIÓN	SEÑAL
0	3.527E-06
18.01	6.710E-06
36.03	1.000E-05
m	1.797E-07
a	3.509E-06
R	0.999956
[Pb] ppb	19.534327



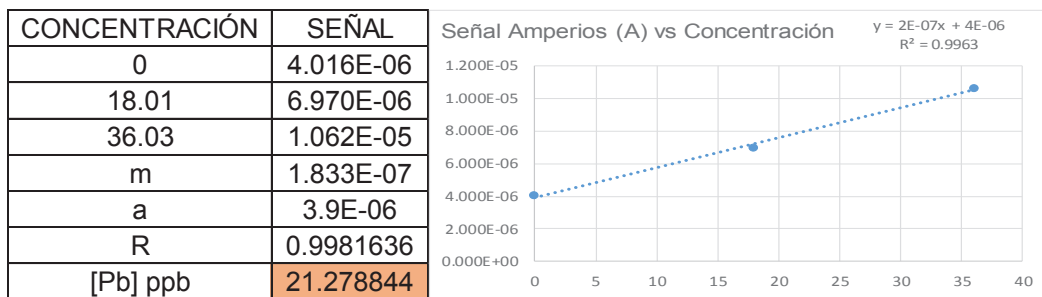
4)



5)



6)



ANEXO N^o 4
CONCENTRACIONES PARA DETERMINAR EL LÍMITE
DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO
Hg(II)

Muestras de 1 ppb de Mercurio (Hg(II))

Concentración	Señal
0.000	3.889E-07
0.990	8.663E-07
1.960	1.524E-06
2.912	2.213E-06
Pendiente (m)	6.311E-07
Intersección (a)	3.232E-07
Correlación R ²	0.996025
Vol. Total (ml)	10.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.525
Concentración	1.2930799

Concentración	Señal
0.000	3.921E-07
0.990	9.214E-07
1.960	1.519E-06
2.912	2.249E-06
Pendiente (m)	6.351E-07
Intersección (a)	3.397E-07
Correlación R ²	0.9966389
Vol. Total (ml)	10.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.525
Concentración	1.3506105

Concentración	Señal
0.000	4.185E-07
0.990	1.081E-06
1.960	1.422E-06
2.912	2.249E-06
Pendiente (m)	6.006E-07
Intersección (a)	4.125E-07
Correlación R ²	0.9880689
Vol. Total (ml)	10.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.525
Concentración	1.7343706

Concentración	Señal
0.000	3.985E-07
0.990	9.214E-07
1.960	1.521E-06
2.912	2.166E-06
Pendiente (m)	6.078E-07
Intersección (a)	3.61E-07
Correlación R ²	0.9984739
Vol. Total (ml)	10.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.525
Concentración	1.4997367

Concentración	Señal
0.000	3.650E-07
0.990	9.214E-07
1.960	1.519E-06
2.912	2.249E-06
Pendiente (m)	6.435E-07
Intersección (a)	3.206E-07
Correlación R ²	0.9973928
Vol. Total (ml)	10.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.525
Concentración	1.2578495

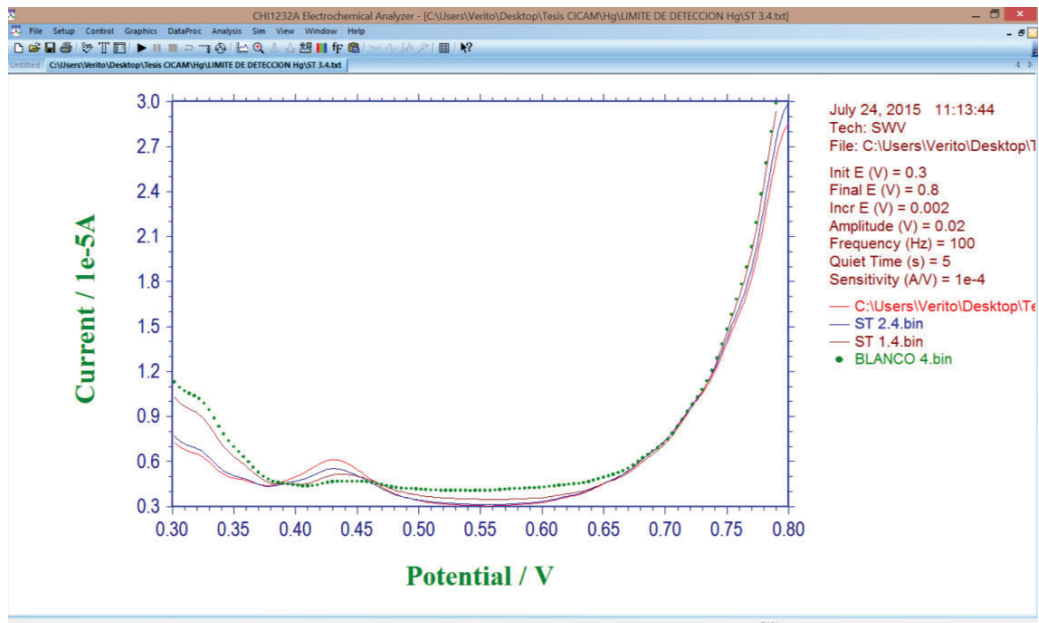
Concentración	Señal
0.000	3.789E-07
0.990	9.214E-07
1.960	1.519E-06
2.912	2.169E-06
Pendiente (m)	6.146E-07
Intersección (a)	3.464E-07
Correlación R ²	0.998799
Vol. Total (ml)	10.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.525
Concentración	1.4230237

Concentración	Señal
0.000	3.958E-07
0.990	9.214E-07
1.960	1.511E-06
2.912	2.199E-06
Pendiente (m)	6.177E-07
Intersección (a)	3.515E-07
Correlación R ²	0.9975907
Vol. Total (ml)	10.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.525
Concentración	1.4369428

Concentración	Señal
0.000	3.857E-07
0.990	9.214E-07
1.960	1.586E-06
2.912	2.239E-06
Pendiente (m)	6.41E-07
Intersección (a)	3.436E-07
Correlación R ²	0.998448
Vol. Total (ml)	10.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.525
Concentración	1.3535269

Concentración	Señal
0.000	3.990E-07
0.990	9.214E-07
1.960	1.452E-06
2.912	2.030E-06
Pendiente (m)	5.586E-07
Intersección (a)	3.819E-07
Correlación R ²	0.9994738
Vol. Total (ml)	10.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.525
Concentración	1.726267

Concentración	Señal
0.000	4.185E-07
0.990	9.214E-07
1.960	1.446E-06
2.912	2.091E-06
Pendiente (m)	5.707E-07
Intersección (a)	3.829E-07
Correlación R ²	0.9976671
Vol. Total (ml)	10.1
Vol. muestra (ml)	4
Factor dilución	2.525
Concentración	1.6942332

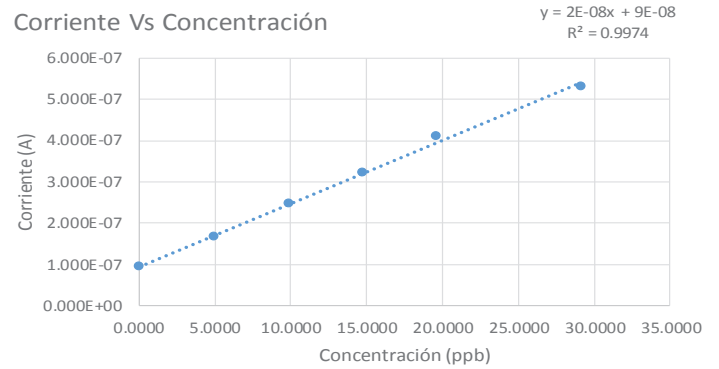


ANEXO N° 5
CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA 5, 10, 15 Y 20 ppb DE
MERCURIO (Hg(II))

5 ppb (Hg(II))

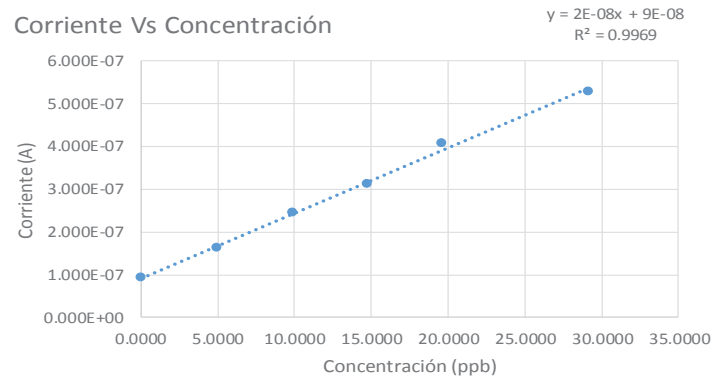
1)

Concentración	Señal
0.0000	9.401E-08
4.9750	1.646E-07
9.9000	2.473E-07
14.7700	3.215E-07
19.6000	4.084E-07
29.1200	5.300E-07
Pendiente (m)	1.527E-08
interseccion (a)	9.487E-08
Correlación R^2	0.9986913
concentracion	6.2133033



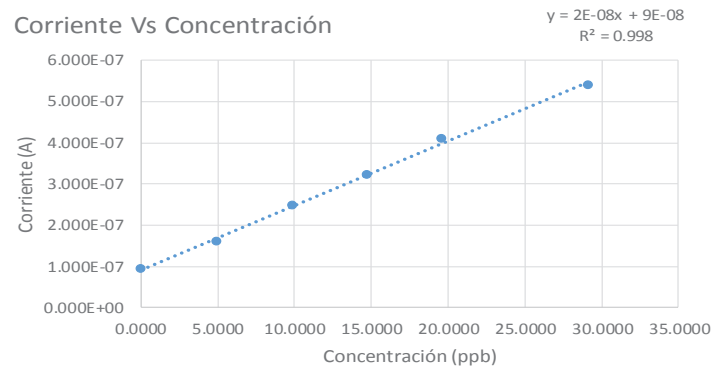
2)

Concentración	Señal
0.0000	9.350E-08
4.9750	1.636E-07
9.9000	2.453E-07
14.7700	3.115E-07
19.6000	4.084E-07
29.1200	5.300E-07
Pendiente (m)	1.528E-08
interseccion (a)	9.253E-08
Correlación R^2	0.9984553
concentracion	6.0568192



3)

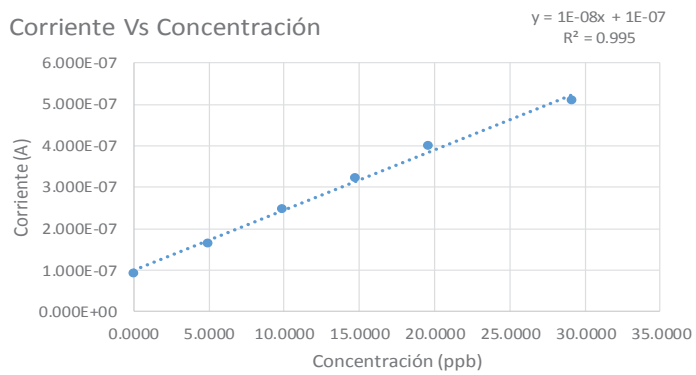
Concentración	Señal
0.0000	9.301E-08
4.9750	1.596E-07
9.9000	2.483E-07
14.7700	3.215E-07
19.6000	4.094E-07
29.1200	5.400E-07
Pendiente (m)	1.566E-08
interseccion (a)	9.07E-08
Correlación R^2	0.9989752
concentracion	5.7902523



4)

Concentración	Señal
0.0000	9.280E-08
4.9750	1.656E-07
9.9000	2.483E-07
14.7700	3.225E-07
19.6000	4.004E-07
29.1200	5.100E-07
Pendiente (m)	1.46E-08
interseccion (a)	9.923E-08
Correlación R ²	0.9974854
concentracion	6.7963021

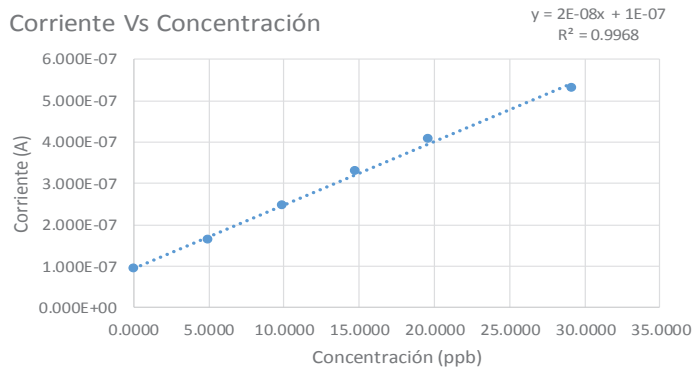
Corriente Vs Concentración



5)

Concentración	Señal
0.0000	9.401E-08
4.9750	1.646E-07
9.9000	2.473E-07
14.7700	3.295E-07
19.6000	4.084E-07
29.1200	5.300E-07
Pendiente (m)	1.529E-08
interseccion (a)	9.588E-08
Correlación R ²	0.9984221
concentracion	6.2691261

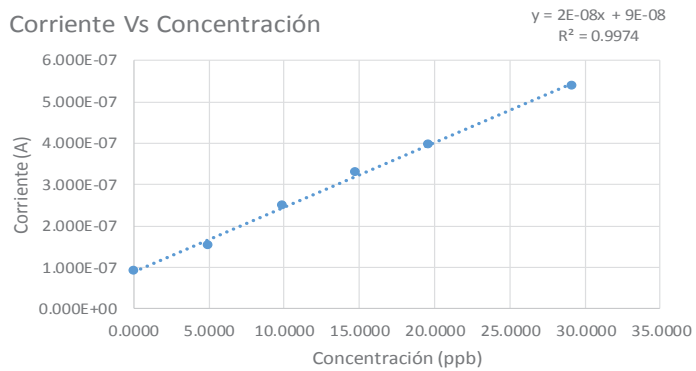
Corriente Vs Concentración



6)

Concentración	Señal
0.0000	9.290E-08
4.9750	1.546E-07
9.9000	2.493E-07
14.7700	3.315E-07
19.6000	3.984E-07
29.1200	5.400E-07
Pendiente (m)	1.564E-08
interseccion (a)	9.024E-08
Correlación R ²	0.9987155
concentracion	5.7712193

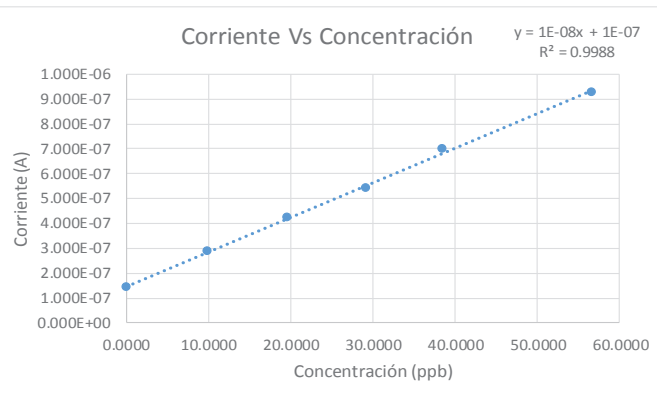
Corriente Vs Concentración



10 ppb (Hg(II))

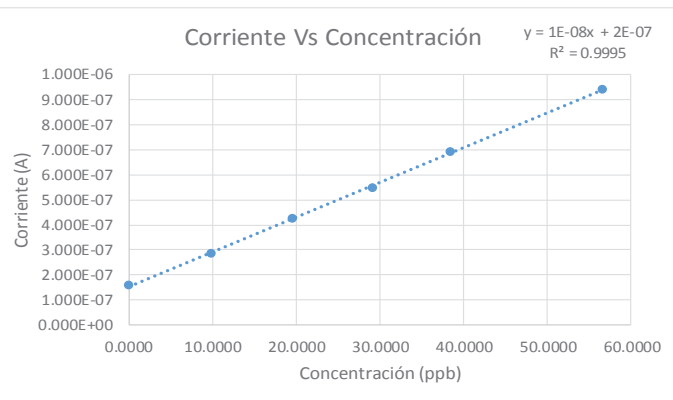
1)

Concentración	Señal
0.0000	1.428E-07
9.9000	2.853E-07
19.6000	4.230E-07
29.1200	5.394E-07
38.4600	6.966E-07
56.6000	9.250E-07
Pendiente (m)	1.388E-08
interseccion (a)	1.466E-07
Correlación R ²	0.9994027
concentracion	10.560735



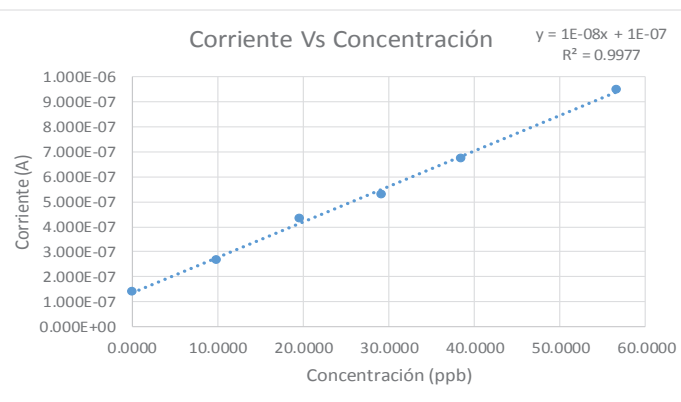
2)

Concentración	Señal
0.0000	1.572E-07
9.9000	2.845E-07
19.6000	4.255E-07
29.1200	5.456E-07
38.4600	6.914E-07
56.6000	9.402E-07
Pendiente (m)	1.39E-08
interseccion (a)	1.513E-07
Correlación R ²	0.9997487
concentracion	10.879453



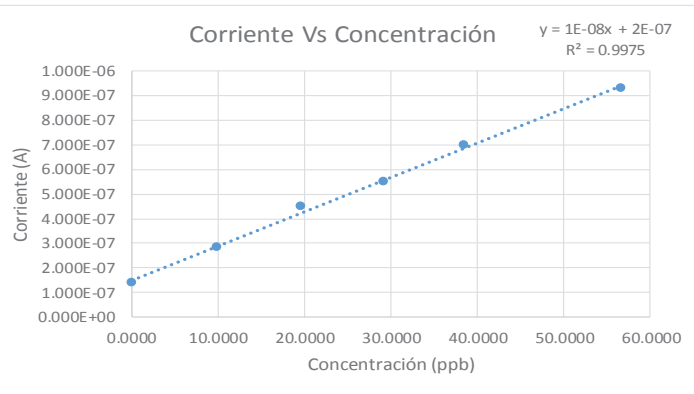
3)

Concentración	Señal
0.0000	1.392E-07
9.9000	2.673E-07
19.6000	4.324E-07
29.1200	5.299E-07
38.4600	6.730E-07
56.6000	9.493E-07
Pendiente (m)	1.423E-08
interseccion (a)	1.34E-07
Correlación R ²	0.9988464
concentracion	9.4151592



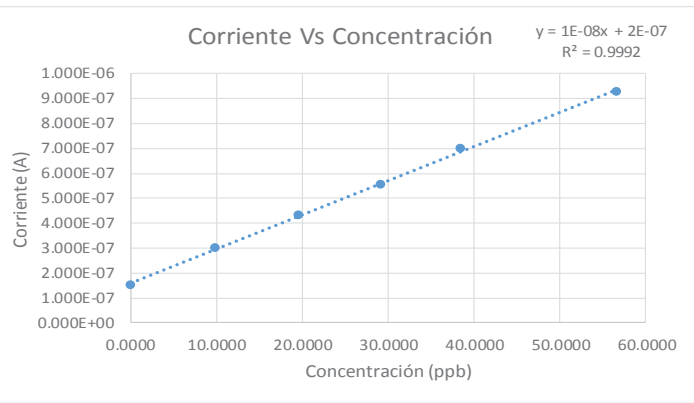
4)

Concentración	Señal
0.0000	1.399E-07
9.9000	2.821E-07
19.6000	4.489E-07
29.1200	5.523E-07
38.4600	6.984E-07
56.6000	9.304E-07
Pendiente (m)	1.398E-08
interseccion (a)	1.507E-07
Correlación R^2	0.9987507
concentracion	10.781652



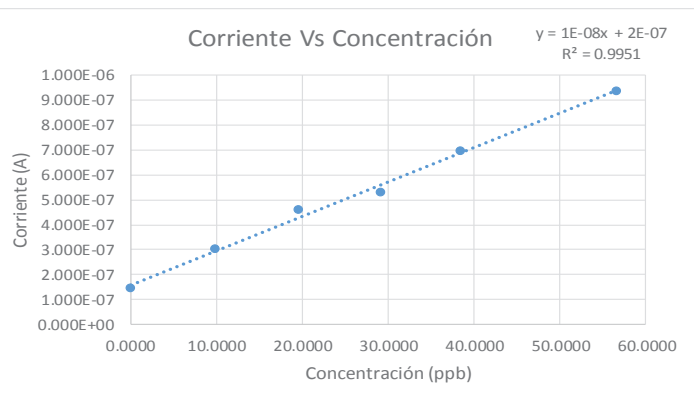
5)

Concentración	Señal
0.0000	1.528E-07
9.9000	2.985E-07
19.6000	4.319E-07
29.1200	5.525E-07
38.4600	6.984E-07
56.6000	9.280E-07
Pendiente (m)	1.371E-08
interseccion (a)	1.593E-07
Correlación R^2	0.9996179
concentracion	11.619925



6)

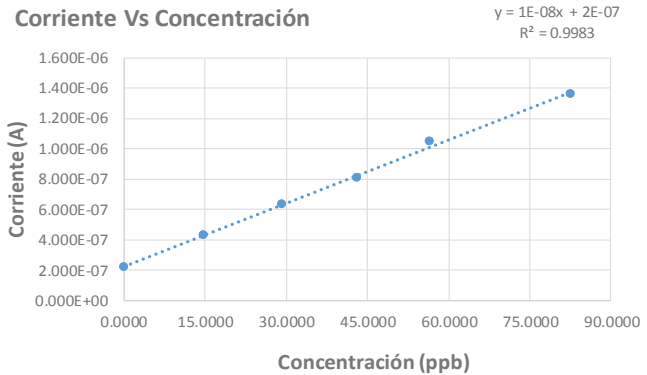
Concentración	Señal
0.0000	1.453E-07
9.9000	2.998E-07
19.6000	4.578E-07
29.1200	5.310E-07
38.4600	6.968E-07
56.6000	9.355E-07
Pendiente (m)	1.378E-08
interseccion (a)	1.581E-07
Correlación R^2	0.9975289
concentracion	11.471249



15 ppb (Hg(II))

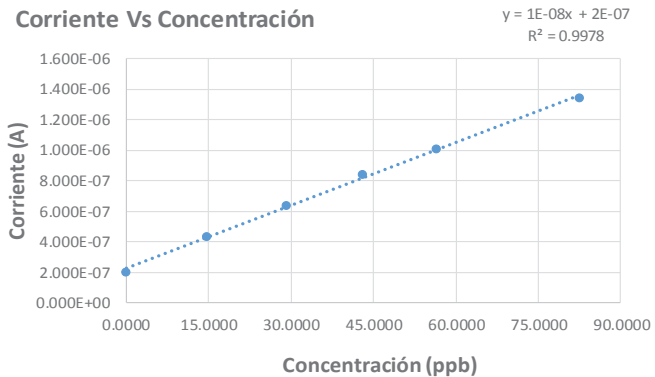
1)

Concentración	Señal
0.0000	2.171E-07
14.7700	4.269E-07
29.1200	6.290E-07
43.0600	8.096E-07
56.6000	1.044E-06
82.5600	1.359E-06
Pendiente (m)	1.39697E-08
interseccion (a)	2.21152E-07
Correlación R ²	0.999152533
concentracion	15.83083906



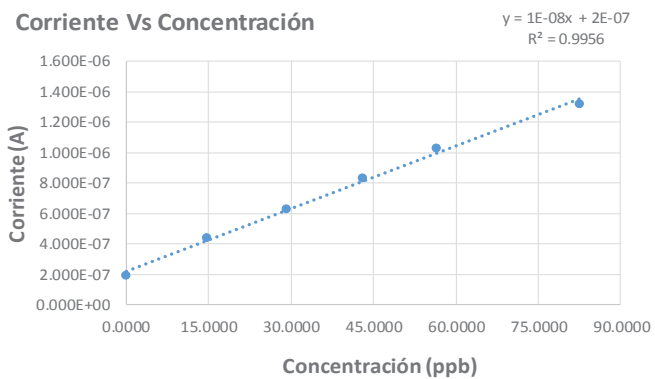
2)

Concentración	Señal
0.0000	2.003E-07
14.7700	4.332E-07
29.1200	6.386E-07
43.0600	8.403E-07
56.6000	1.008E-06
82.5600	1.339E-06
Pendiente (m)	1.37418E-08
interseccion (a)	2.25372E-07
Correlación R ²	0.998910361
concentracion	16.4004318



3)

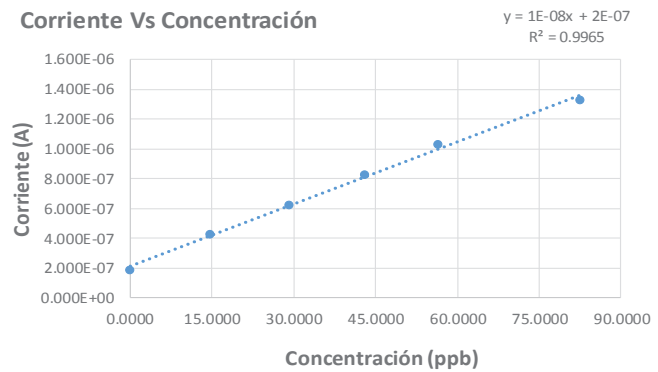
Concentración	Señal
0.0000	1.910E-07
14.7700	4.384E-07
29.1200	6.299E-07
43.0600	8.310E-07
56.6000	1.028E-06
82.5600	1.319E-06
Pendiente (m)	1.36822E-08
interseccion (a)	2.23935E-07
Correlación R ²	0.9977786
concentracion	16.366809



4)

Concentración	Señal
0.0000	1.863E-07
14.7700	4.267E-07
29.1200	6.224E-07
43.0600	8.268E-07
56.6000	1.030E-06
82.5600	1.328E-06
Pendiente (m)	1.38924E-08
interseccion (a)	2.13166E-07
Correlación R^2	0.99823714
concentracion	15.344081

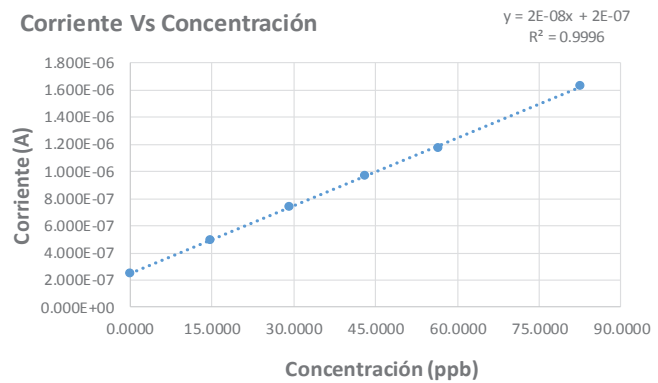
Corriente Vs Concentración



5)

Concentración	Señal
0.0000	2.525E-07
14.7700	4.934E-07
29.1200	7.394E-07
43.0600	9.665E-07
56.6000	1.171E-06
82.5600	1.632E-06
Pendiente (m)	1.66157E-08
interseccion (a)	2.49636E-07
Correlación R^2	0.999785387
concentracion	15.02409636

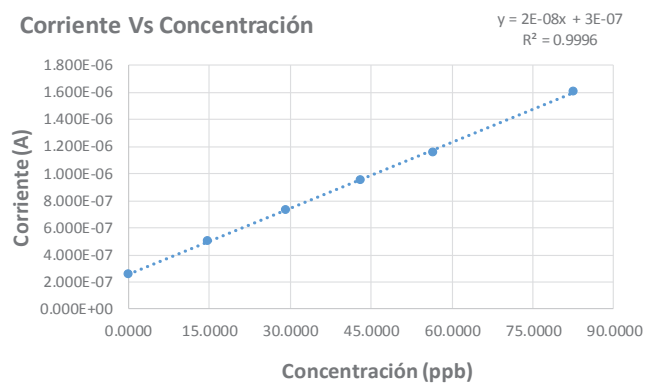
Corriente Vs Concentración



6)

Concentración	Señal
0.0000	2.533E-07
14.7700	5.012E-07
29.1200	7.334E-07
43.0600	9.503E-07
56.6000	1.160E-06
82.5600	1.607E-06
Pendiente (m)	1.62594E-08
interseccion (a)	2.54797E-07
Correlación R^2	0.999823294
concentracion	15.67071309

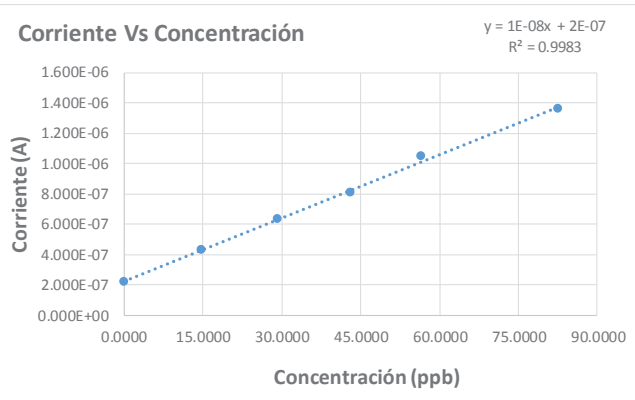
Corriente Vs Concentración



20 ppb (Hg(II))

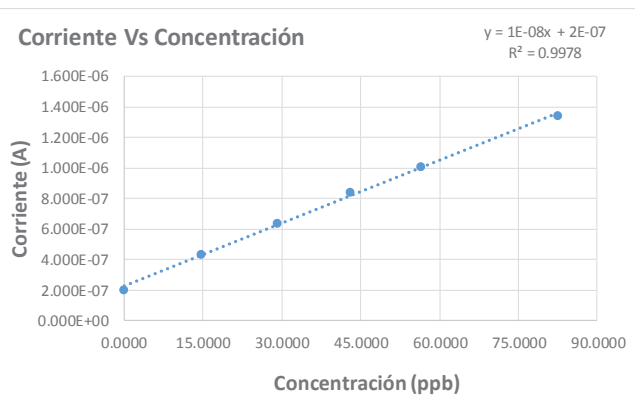
1)

Concentración	Señal
0.0000	7.135E-08
19.61	1.170E-07
38.46	1.776E-07
56.6	2.470E-07
74.07	3.075E-07
107.14	4.131E-07
Pendiente (m)	3.276E-09
interseccion (a)	6.07079E-08
Correlación R ²	0.998256816
concentracion	18.53110364



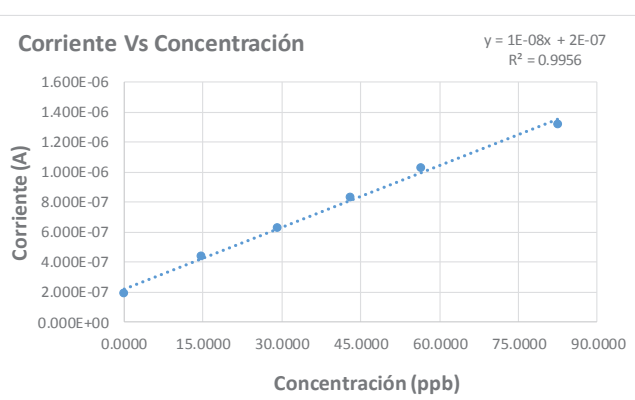
2)

Concentración	Señal
0.0000	7.048E-08
19.61	1.176E-07
38.46	1.876E-07
56.6	2.531E-07
74.07	3.137E-07
107.14	4.038E-07
Pendiente (m)	3.21912E-09
interseccion (a)	6.56346E-08
Correlación R ²	0.997950333
concentracion	20.3889916



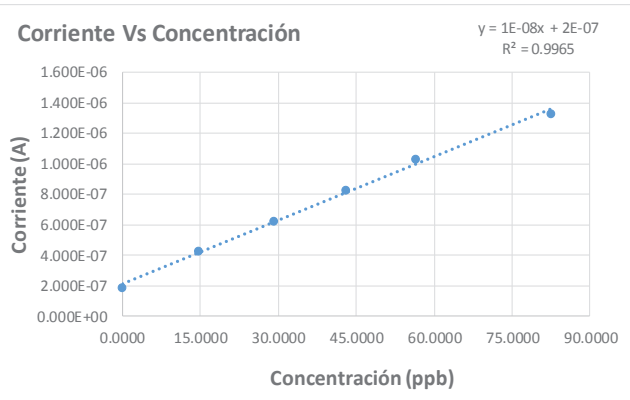
3)

Concentración	Señal
0.0000	7.286E-08
19.61	1.224E-07
38.46	1.934E-07
56.6	2.596E-07
74.07	3.166E-07
107.14	4.230E-07
Pendiente (m)	3.34094E-09
interseccion (a)	6.65574E-08
Correlación R ²	0.999035266
concentracion	19.92177597



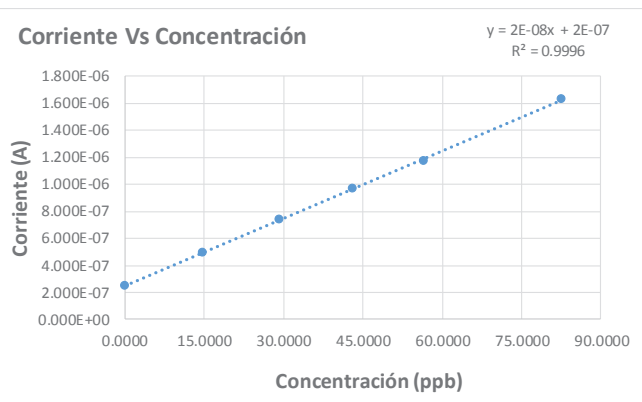
4)

Concentración	Señal
0.0000	7.105E-08
19.61	1.260E-07
38.46	2.019E-07
56.6	2.638E-07
74.07	3.290E-07
107.14	4.277E-07
Pendiente (m)	3.40805E-09
interseccion (a)	6.85128E-08
Correlación R ²	0.998815667
concentracion	20.10322949



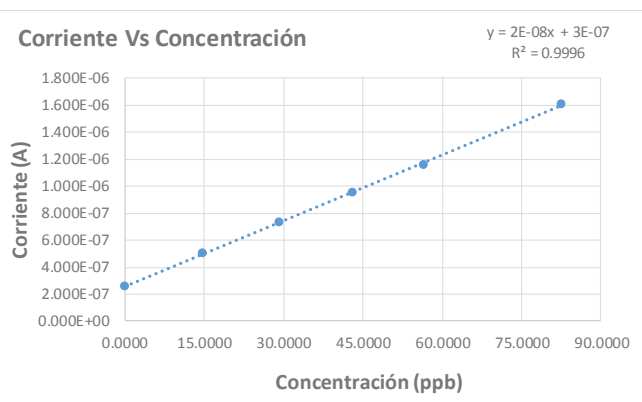
5)

Concentración	Señal
0.0000	7.202E-08
19.61	1.281E-07
38.46	1.970E-07
56.6	2.612E-07
74.07	3.256E-07
107.14	4.243E-07
Pendiente (m)	3.36011E-09
interseccion (a)	6.90052E-08
Correlación R ²	0.999153132
concentracion	20.53659305



6)

Concentración	Señal
0.0000	1.756E-07
19.61	3.293E-07
38.46	5.343E-07
56.6	7.186E-07
74.07	8.422E-07
107.14	1.163E-06
Pendiente (m)	9.28526E-09
interseccion (a)	1.6928E-07
Correlación R ²	0.998929448
concentracion	18.2310243



ANEXO N° 6
HOJA DE MATERIAL DE REFERENCIA



International Atomic Energy Agency
Analytical Quality Control Services
 Wagramer Strasse 5, P.O. Box 100, A-1400 Vienna, Austria

REFERENCE SHEET

REFERENCE MATERIAL

IAEA-407

TRACE ELEMENTS AND METHYLMERCURY IN FISH TISSUE

Date of issue: 24 January 2003

Recommended values: Trace Elements
(Based on dry weight)

Element	Concentration ¹ (mg kg ⁻¹)	Std Deviation ² (mg kg ⁻¹)	95% Confidence Interval ³ (mg kg ⁻¹)	N ⁴
Aluminium	13.8	3.7	12.4 – 15.2	31
Arsenic	12.6	1.2	12.3 – 12.9	60
Bromine	94	9	86 – 102	7
Cadmium	0.189	0.019	0.185 – 0.193	75
Cobalt	0.10	0.02	0.09 – 0.11	27
Chromium	0.73	0.22	0.67 – 0.79	65
Copper	3.28	0.40	3.20 – 3.36	90
Iron	146	14	143 – 149	71
Mercury	0.222	0.024	0.216 – 0.228	74
Lithium	0.685	0.094	0.62 – 0.74	13
Manganese	3.52	0.32	3.44 – 3.60	64
Nickel	0.60	0.18	0.55 – 0.65	49
Lead	0.12	0.06	0.10 – 0.14	61
Rubidium	2.86	0.40	2.45 – 3.27	6
Antimony	0.011	0.002	0.010 – 0.012	12
Selenium	2.83	0.38	2.70 – 2.96	38
Strontium	130	11	125 – 135	26
Vanadium	1.43	0.20	1.34 – 1.52	22
Zinc	67.1	3.8	66.3 – 67.9	93
Me-Hg ⁵	0.200	0.021	0.188 – 0.212	16

¹ Mean values expressed on a dry-weight basis.

² 1 standard deviation of the mean.

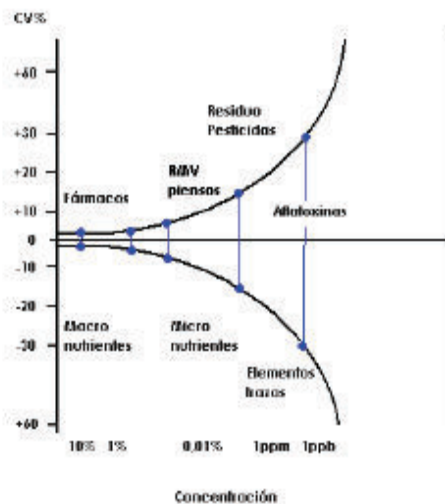
³ 95% Confidence Interval, μ , defined as $\bar{x} \pm t \left(\frac{s}{\sqrt{N}} \right)$, where t is the Student's t value.

⁴ Number of accepted laboratory means which were used to calculate the Recommended values and confidence intervals about the mean values.

⁵ Concentration reported as mg Hg kg⁻¹.

ANEXO N^o 7
COEFICIENTE DE VARIACIÓN SEGÚN HORWITZ

Coefficiente de Variación de Horwitz (CV_h): Es el coeficiente de variación definido por W. Horwitz, a través de la ecuación obtenida de un estudio estadístico. En dicho estudio, Horwitz después de reunir una serie de datos (provenientes de 150 ensayos de interlaboratorios organizados por AOAC), observó que el coeficiente de variación de los valores medios dados por los diferentes laboratorios aumentaban a medida que disminuía la concentración del analito. Comportándose como muestra la siguiente gráfica, conocida como la trompeta de Horwitz.



La ecuación de Horwitz, esta definida como:

$$CV_h = 2^{(1-0.5 \cdot \log c)} \quad \text{ó} \quad \sigma_H = 0.02 \times c^{0.8495}$$

Dónde:

CV_h = Coeficiente de variación de Horwitz

σ_H = Desviación estándar calculada conforme al modelo de precisión de Horwitz.

C = concentración del analito expresado en potencia de 10 (Ver tabla N° 1).

Este coeficiente de variación (CV_h) esta expresado en potencia de 2, y la concentración media del analito expresado como potencia de 10, de esta forma independiente del analito y el método utilizado se puede estimar el CV esperado para la precisión.

Tabla N° 1:

Concentración	Razón (Potencia de 10)	Unidad
100	1	100% (100 g/100 g)
> 10	10 ⁻¹	> 10 % (10 g/100 g)
> 1	10 ⁻²	> 1 % (1 g/100g)
> 0,1	10 ⁻³	> 0,1 % (1 mg/g ó 0,1 g/100 g)
0,01	10 ⁻⁴	100 mg/kg
0,001	10 ⁻⁵	10 mg/Kg
0,0001	10 ⁻⁶	1 mg/Kg
0,00001	10 ⁻⁷	100 µg/Kg
0,000001	10 ⁻⁸	10 µg/Kg
0,0000001	10 ⁻⁹	1 µg/Kg

ANEXO N° 8
MODELO DE CALCULO DE INCERTIDUMBRE

CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE

El cálculo de la incertidumbre se la realizó a partir de la teoría de propagación de errores según la ecuación 0.1:

$$\mu_c = \sqrt{(\mu_b^2 \times C_b^2) + (\mu_m^2 \times C_m^2) + \mu_{SRc}^2 + \mu_{deriva}^2 + \mu_{calibración}^2 + \mu_{estandar}^2}$$

Ecuación 0.1

Donde:

μ_b = Es la sumatoria de la Incertidumbre típica de: calibración, deriva, resolución, estándar, pipetas, balones y varianza.

C_b = Es el coeficiente de sensibilidad de la ordenada al origen

μ_m = Es la incertidumbre de la varianza para la pendiente

C_m = Es el coeficiente de sensibilidad de la pendiente

μ_{SRc}^2 = Incertidumbre de la varianza de las concentraciones

Cálculo del coeficiente de sensibilidad de la ordenada al origen C_b

Se calcula a partir de la derivación parcial de la ecuación de la adición al estándar que es la siguiente:

$$C_{muestra} = \frac{b_{ordenada\ al\ origen}}{m_{pendiente}} \quad \text{Ecuación 0.2}$$

$$C_b = \left[\frac{\partial c}{\partial b} \right]_m$$

$$C_b = \left[\frac{\partial}{\partial b} \left(\frac{b}{m} \right) \right]_m$$

$$C_b = \frac{1}{m} \left(\frac{\partial b}{\partial b} \right)_m$$

$$C_b = \frac{1}{m} \quad \text{Ecuación 0.3}$$

✓ **Cálculo del coeficiente de sensibilidad de la pendiente C_m**

$$\mu_b = \sqrt{\mu_{calibración}^2 + \mu_{resolución}^2 + \mu_{deriva}^2 + \mu_{St}^2 + \mu_{pipeta}^2 + \mu_{balones}^2 + \mu_{SRb}^2}$$

Ecuación 0.4

$$\mu_{\text{calibración}} = \frac{\delta_{\text{concentraciones día 1}}}{\sqrt{3}} \quad \text{Ecuación 0.5}$$

$$\mu_{\text{calibración}} = \frac{1.037}{\sqrt{3}} = 0.5987$$

$$\mu_{\text{resolución}} = \frac{\text{Resolución del equipo}}{\sqrt{3}} = \frac{0.3 \times 10^{-13}}{\sqrt{3}} \quad \text{Ecuación 0.6}$$

$$\mu_{\text{resolución}} = 1.73 \times 10^{-13}$$

$$\mu_{\text{deriva}} = \frac{\text{valor teórico} - \text{valor max. disperso}}{\sqrt{3}} \quad \text{Ecuación 0.7}$$

$$\mu_{\text{deriva}} = \frac{5 - 3.661}{\sqrt{3}} = 0.7730$$

La incertidumbre del estándar se calcula a partir de la ecuación 0.10.

$$\mu_{\text{estandar}} = \text{concentración de cada nivel}$$

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

c_1 = Concentración inicial del estándar

V_1 = Alícuota a tomar

c_2 = Concentración a cada nivel

V_2 = Aforo

$$c_2 = \frac{c_1 V_1}{V_2} \quad \text{Ecuación 0.8}$$

$$\mu_{St} = \mu_{c_2}$$

$$\mu_{c_2} = \sqrt{\mu_{c_1}^2 C_{c_1}^2 + \mu_{v_1}^2 C_{v_1}^2 + \mu_{v_2}^2 C_{v_2}^2}$$

Ecuación 0.9

μ_{c_1} = Incertidumbre típica de la concentración inicial (estándar)

C_{c_1} = Coeficiente de sensibilidad de la concentración inicial

μ_{v_1} = Incertidumbre típica de la alícuota a tomar (pipeta)

C_{v_1} = Coeficiente de sensibilidad de la alícuota a tomar

μ_{v2} = Incertidumbre típica del aforo (balón)

C_{v2} = Coeficiente de sensibilidad del aforo

Los coeficientes de sensibilidad se los obtiene por cálculo de diferenciales parciales

$$C_{c1} = \frac{v_1}{v_2} \quad \text{Ecuación 0.10}$$

$$C_{v1} = \frac{c_1}{v_2} \quad \text{Ecuación 0.11}$$

$$C_{v2} = -\frac{c_1 v_1}{v_2^2} \quad \text{Ecuación 0.12}$$

✓ Se realizó dos diluciones

Primera dilución			Segunda dilución		
Solución a preparar de $c_2 = 1 \text{ ppm}$			Solución a preparar de $c_2 = 0.005 \text{ ppm}$		
$v_1(\text{ml})$	$v_2(\text{ml})$	$c_1(\text{ppm})$	$v_1(\text{ml})$	$v_2(\text{ml})$	$c_1(\text{ppm})$
0.5	500	1000	0.5	100	1

Cálculo de coeficientes de sensibilidad para la primera dilución

$$C_{c1} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{0.5 \text{ ml}}{500 \text{ ml}} = 0.001$$

$$C_{v1} = \frac{c_1}{v_2} = \frac{1 \times 10^6 \text{ ppb}}{500 \text{ ml}} = 2000 \text{ ppb/ml}$$

$$C_{v2} = -\frac{c_1 v_1}{v_2^2} = \frac{1 \times 10^6 \text{ ppb} \times 0.5 \text{ ml}}{500^2 \text{ ml}} = 2 \text{ ppb/ml}$$

✓ Cálculo de incertidumbre de la primera dilución

Se realiza a partir de la ecuación 0.10, para la incertidumbre del balón a partir de la ecuación 0.14 y 0.15.

$$\mu_{v2} = \sqrt{\mu_{cert.calibración}^2 + \mu_{temperatura}^2} \quad \text{Ecuación 0.13}$$

$$\mu_{temperatura} = \frac{\alpha V \Delta T}{\sqrt{3}} \quad \text{Ecuación 0.14}$$

Donde:

$$\alpha = \text{coeficiente de dilatación cúbica del vidrio} = 0.000025 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$$

$$\mu_{temperatura} = \frac{0.000025 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1} \times 500 \text{ ml} \times 2 \text{ } ^\circ\text{C}}{\sqrt{3}} = 0.01443 \text{ ml}$$

$$\mu_{v2} = \sqrt{(0.0035 \text{ ml})^2 + (0.01443 \text{ ml})^2}$$

$$\mu_{v2} = 0.014$$

$$\mu_{c2} = \sqrt{[(1 \text{ ppb})^2 \times (0.001)^2] + [(1 \times 10^{-6} \text{ ml})^2 \times (2000 \text{ ppb/ml})^2] + [(0.014 \text{ ml})^2 \times (2 \text{ ppb/ml})^2]}$$

$$\mu_{c2} = 0.02968 \text{ ppb}$$

Cálculo de coeficientes de sensibilidad para la segunda dilución

$$C_{c1} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{0.5 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0.005$$

$$C_{v1} = \frac{c_1}{v_2} = \frac{1000 \text{ ppb}}{100 \text{ ml}} = 10 \text{ ppb/ml}$$

$$C_{v2} = -\frac{c_1 v_1}{v_2} = \frac{1000 \text{ ppb} \times 0.5 \text{ ml}}{100^2 \text{ ml}} = 0.05 \text{ ppb/ml}$$

✓ Cálculo de incertidumbre de la segunda dilución

Se realiza a partir de la ecuación 0.10, para la incertidumbre del balón a partir de la ecuación 0.14 y 0.15.

$$\mu_{v2} = \sqrt{\mu_{cert.calibración}^2 + \mu_{temperatura}^2}$$

$$\mu_{temperatura}^2 = \frac{\alpha V \Delta T}{\sqrt{3}}$$

$$\alpha = \text{coeficiente de dilatación cúbica del vidrio} = 0.000025 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$$

$$\mu_{temperatura} = \frac{0.000025 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1} \times 100 \text{ ml} \times 2 \text{ } ^\circ\text{C}}{\sqrt{3}} = 0.002886 \text{ ml}$$

$$\mu_{v2} = \sqrt{(0.001 \text{ ml})^2 + (0.002886 \text{ ml})^2}$$

$$\mu_{v2} = 0.00305$$

$$\mu_{c2} = \sqrt{[(0.02968 \text{ ppb})^2 \times (0.005)^2] + [(1 \times 10^{-6} \text{ ml})^2 \times (10 \text{ ppb/ml})^2] + [(0.00305 \text{ ml})^2 \times (0.05 \text{ ppb/ml})^2]}$$

$$\mu_{c2} = 0.00021 \text{ ppb}$$

- ✓ Incertidumbre de las dos diluciones:

A partir de la ecuación 0.16 se calcula la incertidumbre por dilución, pipetas y balones incluidos.

$$\mu_{st} = \sqrt{\mu_{1ra dilución}^2 + \mu_{2da dilución}^2} \quad \text{Ecuación 0.15}$$

$$\mu_{st} = \sqrt{0.02968^2 + 0.00021^2}$$

$$\mu_{st} = 0.029$$

- ✓ Incertidumbre de varianza de la ordenada al origen:

Nivel ($\mu\text{g/L}$)	INTERSECCIÓN CON EL EJE (b)					Media de media
	D1	D2	D3	D4	D5	
5 ppb	2.7617E-07	2.6045E-07	2.0604E-07	1.6813E-07	1.4257E-07	2.1067E-07

Nivel	DIFERENCIAS CUADRÁTICAS ENTRE TRATAMIENTOS DCB = $(\mu_j - \mu)^2$		

	D1	D2	D3	D4	D5	SDCB = njΣ(μj-μ)2	DCMB = SDCB / a-1
5 ppb	4.2904E-15	2.4782E-15	2.1451E-17	1.8101E-15	4.63835E-15	3.97156E-14	9.9289E-15

✓ Incertidumbre de la varianza de la pendiente:

Nivel (μg/L)	PENDIENTES (m)					Media de media
	D1	D2	D3	D4	D5	
5 ppb	1.6470E-07	1.3912E-07	1.1222E-07	9.6218E-08	8.6496E-08	1.1975E-07

Nivel	DIFERENCIAS CUADRÁTICAS ENTRE TRATAMIENTOS DCB = (μj-μ)²					SDCB = njΣ (μj-μ)2	DCMB = SDCB / a-1
	D1	D2	D3	D4	D5		
5 ppb	2.0205E-15	3.7507E-16	5.6702E-17	5.5377E-16	1.1058E-15	1.2336E-14	3.0839E-15

✓ **Cálculo de la incertidumbre para la primera determinación de 5 ppb de cadmio**

$$\mu_c = \sqrt{\mu_b^2 C_b^2 + \mu_m^2 C_m^2}$$

$$\mu_b = \sqrt{\mu_{resolución}^2 + \mu_{SRb}^2}$$

$$\mu_m = \sqrt{\mu_{SRm}^2}$$

μ_{SRb} = Incertidumbre de la varianza en la ordenada al origen

μ_{SRm} = Incertidumbre de la varianza en la pendiente

$$\mu_b = \sqrt{(1.73 \times 10^{-13})^2 + (9.9289 \times 10^{-15})^2}$$

$$\mu_b = 1.7328 \times 10^{-13}$$

$$\mu_c = \sqrt{(\mu_b^2 \times C_b^2) + (\mu_m^2 \times C_m^2) + SRc^2 + \mu_{deriva}^2 + \mu_{calibración}^2 + \mu_{estandar}^2}$$

$$\mu_c = \sqrt{(1.7328 \times 10^{-13^2} \times 5.543 \times 10^{6^2}) + (3.083 \times 10^{-15^2} \times 7.624 \times 10^{6^2}) + 0.384^4 + 0.7730^2 + 0.5987^2 + 0.029^2}$$

$$\mu_c = 1.05084 \text{ ppb}$$

$$U_{\text{expandida}} = k \times 1.05084 \text{ ppb}$$

$$k = 2$$

$$U_{\text{expandida}} = 2.01 \text{ ppb} \sim 40\%$$

$$\text{Concentración de Cadmio} = 4.4213 \pm 40\%$$