



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

Estimación de la incertidumbre total en el
pretratamiento de muestras de interés ambiental
para la implementación de la calidad

Marcelo Tomás Pereyra

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2014

PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área III, Química Analítica, dependiente del Departamento de Química, durante el período comprendido entre 17 de mayo de 2011 y el 05 de diciembre de 2014, bajo la dirección de la Dra. Adriana G. Lista, Profesora Asociada de Química Analítica.

Esp. Lic. Marcelo T. Pereyra

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p>
<p>La presente tesis ha sido aprobada el / / , mereciendo la calificación de(.....)</p>	

A la memoria de mis adorados padres, Nora y Pedro

Muy especialmente agradezco:

A mi directora de tesis, Adriana, por su firme dedicación, su inmensa paciencia, sus valiosas contribuciones para el desarrollo de este trabajo de tesis y por su valiosa compañía en tantos de los innumerables ensayos que forman parte de este trabajo de tesis. También enormes gracias a Adriana porque generosamente me brinda siempre la posibilidad de compartir memorables vivencias con su adorada familia.

A la Dra. Beatriz Fernández Band, por haberme dado la oportunidad de compartir tantos años en la docencia y la investigación, y por guiarme, apoyarme e incentivar me permanentemente a perfeccionar mi formación en las disciplinas de Calidad y Metrología Química.

Agradezco también:

A los Doctores de la Universitat Rovira i Virgili, Ricard Boqué y Jordi Riu, por enseñarme a andar en mis primeros pasos del cálculo de incertidumbre, y más aún les agradezco por la calidez humana y la amistad que me dieron desde siempre.

Al Dr. F. Xavier Rius, director del Grupo de Quimiometría y Cualimetría de la Universitat Rovira i Virgili, porque me dio la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación durante mi estancia de trabajo en Tarragona, España.

Al Ing. Pedro Bodnariuk, por su fundamental gestión que logró concretar mi estancia de trabajo en la Generalitat de Catalunya y en la Universitat Rovira i Virgili. Y desde entonces por la amistad y por el apoyo humano y profesional que me brinda. Muchas gracias a Pedro por permitirme compartir su mesa familiar con Marta, Natalí y Nicolás.

Al Dr. Julio C. Podestá por su permanente preocupación y respaldo para mi superación profesional y docente.

Al Gobierno de la Municipalidad de Bahía Blanca y a la Generalitat de Catalunya, España, por la financiación de mi estancia de trabajo en Tarragona, donde inicié mis estudios de cálculos de incertidumbres.

A mis compañeros del Comité Técnico Ejecutivo de la Municipalidad de Bahía Blanca, Leandro Lucchi y María Victoria Vittone, por su colaboración en la ejecución de muchos ensayos realizados para el desarrollo del cuarto capítulo de este trabajo de tesis. Y además, por tantos años de amistad y apoyo continuo.

A los integrantes de los laboratorios: Química Marina del IADO (UNS/CONICET), Autoridad del Agua (Pcia. de Bs. As.), Solvay Indupa SAIC, LANAQUI (UNS/CONICET) y Controlab, por su inestimable colaboración para la ejecución de los ensayos realizados en el desarrollo del segundo capítulo de este trabajo de tesis.

A los profesores del Área de Química Analítica del Departamento de Química, María Susana R., Liliana, Adriana, María Eugenia, María Susana D., Marcelo F., Mariano y Claudia, por los ánimos y apoyo que me dieron y dan siempre.

A mis compañeros del Área de Química Analítica, quienes estuvieron siempre presentes para alentarme y acompañarme en los buenos momentos y en los no tan buenos también.

Muchas gracias a todos

RESUMEN

La mayoría de las decisiones de gestión ambiental surgen del análisis de la información obtenida de las medidas realizadas en controles de rutina, tanto internos como externos. La fiabilidad y la correcta interpretación de los resultados analíticos de estas mediciones requieren conocimientos acerca de su calidad, especialmente en lo que respecta a la incertidumbre de la medición. La evaluación de la incertidumbre de la medición para el análisis químico es un reto constante para el químico analítico, porque se requiere un conocimiento completo de todo el proceso de análisis. La norma ISO / IEC 17025 requiere para los laboratorios acreditados, que la incertidumbre de la medición asociada a un resultado debe estar disponible y se debe informar si puede afectar el cumplimiento de un límite máximo reglamentario.

Se considera que el enfoque más ventajoso para estimar la incertidumbre es el que emplea la información obtenida en la evaluación de la exactitud del método analítico empleado. En general, cuando no se dispone de referencias de alta jerarquía metrológica, se hace uso de materiales de referencia producidos en el laboratorio ("in house reference materials", IHRM), o de la información de los ejercicios de las pruebas de aptitud.

Este trabajo de tesis describe la evaluación de la incertidumbre de la medición en la determinación de algunos analitos de interés ambiental. Los estudios se realizan en los escenarios restringidos de ausencia de referencia de la más alta jerarquía metrológica, las muestras son de matrices complejas y los procesos analíticos que se utilizan poseen etapas de pretratamiento que afectan significativamente a la incertidumbre general de los resultados.

Los resultados obtenidos demuestran la importancia de la evaluación de la incertidumbre de las diferentes etapas de los procesos de medición, en la determinación de mercurio y PAHs en muestras ambientales:

Respecto del estudio del mercurio se destaca que:

- ✓ Los IHRMs son apropiados para ser usados como materiales de control de calidad en ensayos de aptitud.
- ✓ Las evaluaciones estadísticas realizadas demuestran que la incertidumbre expandida relativa es igual para las fuentes de variación tenidas en cuenta, es decir laboratorios e IHRMs. Esta información se debe tener en cuenta para tomar decisiones posteriores.

En cuanto al estudio de PAHs totales se menciona:

- ✓ Se utiliza la información de la precisión y el sesgo estimado en el procedimiento de evaluación de la exactitud usando el IHRM para calcular la incertidumbre de medición del proceso analítico.
- ✓ El IHRM desarrollado es muy útil para optimizar un nuevo método de extracción de PAHs, no estandarizado y para evaluar la exactitud de los resultados de los métodos extractivos.
- ✓ Las incertidumbres globales dependen fuertemente de la contribución asociada a la falta de homogeneidad de las muestras

En referencia a la determinación de PAHs mediante CG-MS se señala:

- ✓ Los materiales de prueba preparados son útiles para evaluar la veracidad y calcular la incertidumbre de dos métodos extractivos diferentes.
- ✓ La incertidumbre de ambos métodos disminuye al aumentar el número de análisis.
- ✓ El sesgo constante contribuye significativamente en el balance de incertidumbre para ambos métodos a bajos niveles de concentración.

ABSTRACT

Most environmental management decisions are the result of analysis of the information obtained from measurements made in both internal and external monitoring of the control routines. The reliability and the correct interpretation of the analytical results of such measurements require knowledge about their quality, especially with regard to measurement uncertainty. However, the assessment of measurement uncertainty for chemical analysis is a constant challenge for analytical chemist because a complete knowledge of the whole analytical process is required in order to produce valid information. It is a requirement for laboratories accredited under the ISO/IEC 17025 that the measurement uncertainty associated with a result should be available and reported if it may affect compliance with a maximum regulatory limit.

The approach for estimating uncertainty that uses information from accuracy assessment has the advantage to not require extra efforts for the analysts. Nevertheless, when references with the highest metrological hierarchy are not available, in house reference materials (IHRMs) and the proficiency test information are used to calculate the measurement uncertainty.

This thesis describes the assessment of measurement uncertainty for the determination of some analytes of environmental concern. The studies were performed in the restricted scenarios of absence of reference of the highest metrological hierarchy, complex matrix samples, and analytical processes with pretreatment steps that significantly affect the overall uncertainty of the results.

The obtained results show the importance of the evaluation of the uncertainty of the different step of the analytical process, in determinations, mercury and PAHs, in environmental samples.

Mercury:

- ✓ The IHRMs have suitable homogeneity and stability, and they can be used as quality control materials in proficiency test.

- ✓ The relative expanded uncertainty is similar for both source of variation: laboratories and IHRMs. This information should be taken into account in making subsequent decisions.

Total PAHS:

- ✓ The precision and estimated bias calculated in the accuracy evaluation using the IHRM were used to calculate the uncertainty of the analytical process measurement
- ✓ The developed IHRM is useful to optimize a new extraction method no standardized and to evaluate the accuracy the obtained results in both used extraction methods.
- ✓ The overall uncertainty is strongly dependent on the contribution of non-homogeneous samples.

Determination of PAHs by CG-MS:

- ✓ The test materials prepared in the laboratory are useful to evaluate trueness and to calculate the uncertainty of the two studied extraction methods.
- ✓ The uncertainty of both extractive methods decreases when the number of analysis grows.
- ✓ The constant bias has a significant contribution in the uncertainty budget for the two methods, at low concentration levels, closed to quantification limits

ÍNDICE

Notación	I
Símbolos	II
Capítulo I	
Introducción	1
<i>1.1 Incertidumbre</i>	2
1.1.1. El concepto de incertidumbre	2
1.1.2. Enfoque de la ISO	8
1.1.3. Enfoque de la EURACHEM	11
1.1.4. Enfoque del Analytical Methods Committee	13
1.1.5. Enfoque de la Nordtest	17
1.1.6 Enfoques basados en la utilización de la información obtenida en la validación del proceso de medición química	18
<i>1.2. Fuentes de incertidumbres, condiciones de medición y niveles</i>	21
<i>1.3. Evaluación de la incertidumbre de tipo A y tipo B</i>	25
<i>1.4. Significación de la estimación de la incertidumbre de medición</i>	27
<i>1.5. Significación de la incertidumbre de medición en análisis ambientales</i>	29
<i>1.6 Consideraciones relevantes</i>	31
Bibliografía	33
Capítulo II	
Cuantificación de la incertidumbre empleando la información obtenida en ensayos de aptitud. Caso estudiado: Determinación de mercurio en efluentes líquidos industriales con la participación de un número limitado de laboratorios.	39
1. Introducción	40
2. Parte experimental	43
2.1. Organización del Ensayo de Aptitud	43
2.2. Descripción y colección de los IHRMs	44
2.2.1. Muestra 1: (LL-IHRM)	45
2.2.2. Muestra 2: (HL-IHRM)	45
2.3. Preparación de los IHRMs	45
2.4. Evaluación de la homogeneidad de las muestras	46
2.5. Evaluación de la estabilidad de las muestras	47
2.6. Determinación de Hg total	48

2.7. <i>Tratamiento de datos</i>	48
2.7.1. Establecimiento del valor asignado de concentración para cada IHRM	49
2.7.2. Estimación de la incertidumbre de los IHRMs	49
2.7.3. Evaluación del desempeño de cada laboratorio individual	50
2.7.4. Evaluación de la compatibilidad metrológica de los resultados	51
2.7.5. Gráfico de Youden	51
2.7.6. Evaluación de la incertidumbre expandida para cada laboratorio individual	52
3. Resultados y discusiones	54
3.1. <i>Resultados individuales</i>	54
3.2. <i>Evaluación de los resultados obtenidos para cada IHRM</i>	55
3.2.1. Estudio de consistencia de los datos	55
3.2.2. Homogeneidad de varianzas y evaluación de puntos discrepantes	56
3.2.3. Valor asignado e incertidumbre asociada	57
3.2.4. Evaluación de la compatibilidad metrológica	58
3.3. <i>Estudio del desempeño de los laboratorios</i>	59
3.3.1. Comparación de los z-scores	59
3.3.2. Gráfico de Youden	59
3.3.3. Evaluación de la incertidumbre expandida para cada laboratorio individual	60
4. Conclusiones	63
Bibliografía	65

Capítulo III

Estimación de la incertidumbre de medición usando la información obtenida en la evaluación de la exactitud empleando un material de referencia preparado en el laboratorio (IHRM): Estudios de dos casos en la extracción de PAHs totales de barrores residuales industriales.	68
1. Introducción	69
2. Parte Experimental	72
2.1. <i>Reactivos y soluciones</i>	72
2.2. <i>Muestras</i>	72
2.3. <i>Producción del material de referencia, IHRM</i>	73

2.3.1. Procedimiento de preparación	73
2.3.2. Pruebas de aseguramiento de homogeneidad y estabilidad del IHRM	74
2.3.3. Cálculo del valor asignado y la incertidumbre asociada	75
2.4. <i>Evaluación de la aplicabilidad del IHRM</i>	77
2.4.1. Procedimientos de extracción	77
2.4.2. Optimización de la extracción asistida por ultrasonido aplicando diseño experimental	78
2.4.3. Determinación de PAHs totales por fluorescencia	80
2.5. <i>Validación y pruebas estadísticas</i>	81
3. Resultados y discusión	82
3.1 <i>Optimización del procedimiento UAME</i>	82
3.2 <i>Evaluación de la exactitud de los métodos de extracción utilizando el IHRM</i>	86
3.2.1. Comparación de la precisión	86
3.2.2. Comparación de la veracidad	87
3.3. <i>Estimación de la Incertidumbre</i>	89
3.3.1. Incertidumbre asociada al procedimiento analítico	89
3.3.2. Incertidumbre asociada a la evaluación de la veracidad	89
3.3.3. Incertidumbre asociada a otras fuentes	89
3.3.4. Cuantificación de la incertidumbre global	90
4. Conclusiones	94
Bibliografía	95

Capítulo IV

Evaluación de la incertidumbre para el análisis de PAHs en barros industriales mediante el uso de cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS). Dos casos de estudio utilizando extracción mediante Soxhlet y asistida por ultrasonido.

1. Introducción	100
2. Parte Experimental	103
2.1. <i>Reactivos y soluciones</i>	103
2.2. <i>Materiales y equipamiento</i>	104
2.3. <i>Procedimiento analítico</i>	104
2.3.1 Preparación de los estándares	104
2.3.2 Preparación de las muestras de prueba	104

2.3.3. Procedimientos de extracción	109
2.3.4. Condiciones experimentales para el análisis por GC-MS	110
3. Resultados y discusión	112
3.1. <i>Evaluación de la veracidad</i>	112
3.1.1. Evaluación de las recuperaciones	112
3.1.2. Evaluación del sesgo constante	116
3.2. <i>Incertidumbre de muestras futuras de rutina</i>	118
3.2.1. Incertidumbre de la recuperación	118
3.2.2. Incertidumbre del sesgo constante	118
3.2.3. Incertidumbre asociada a la precisión del método	119
3.2.4. Incertidumbre de la falta de homogeneidad	120
3.2.5. Cálculo de incertidumbre expandida	121
4. Conclusiones	128
Bibliografía	130
Capítulo V	
Conclusiones generales	132
Apéndice	136

NOTACIÓN

Acrónimos y abreviaturas

AMC	Analytical Methods Committee
ANOVA	Análisis de la Varianza
ANSI	American National Standards Institute
AOAC	Association of Official Analytical Chemists (EE.UU)
ASTM	American Society for Testing and Materials
CAEAL	Canadian Association for Environmental Analytical Laboratories
CCRD	Diseño experimental central compuesto rotatorio
CFR	Código Federal de Regulaciones de EE.UU.
CITAC	Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry
CRM/MRC	Certified Reference Material/Material de referencia certificado
CTE	Comité Técnico Ejecutivo de la Municipalidad de Bahía Blanca
EEA	European Environment Agency
EPA	Environmental Protection Agency (EE.UU)
EPTIS	International Proficiency Testing Information System
Eurolab	European Federation of National Associations of Measurements, Testing and Analytical Laboratories
GC/MS	Cromatografía gaseosa acoplada a detector selectivo de masas.
GLP	Good Laboratory Practices
GUM	Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement
HC	Hidrocarburos de petróleo
HPLC-UV	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada con detector ultravioleta-visible
IHRM	In-house reference material
ILAC	International Laboratory Accreditation Cooperation
ISO	International Organization for Standardization
MAD	Median absolute deviation
MAE	Microwave assisted extraction
MS	Mean squares
NIST	National Institute of Standards and Technology (EE.UU)
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration (EE.UU)
Nordtest	Joint Nordic Cooperation Body concerning conformity assessment
OAA	Organismo Argentino de Acreditación
OIML	Organisation Internationale de Métrologie Légale
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PAM	Preconditioned authentic material
PLE	Pressurised liquid extraction
POLE	Polioxietilen-10 lauril éter
POPs	Persistent Organic Pollutants
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
PT	Proficiency test
PTFE	1,1,2,2-Politetrafluoroetileno (Teflón®)
QA	Quality assurance
QC	Quality control
RSC	Royal Society of Chemistry (U.K.)
RSD	Relative standard deviation
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFE	Supercritical fluid extraction

SIM	Selective Ion Monitoring
SM	Standard Method
SOP	Standard operating procedure
SPME	Solid phase microextraction
SSZ	Square sum of z-scores
UAE	Ultrasonic Assisted Extraction
UAME	Ultrasonic Assisted Micellar Extraction
VIM	International Vocabulary of Metrology

Símbolos

α	Error de primera especie o de tipo I.
β	Error de segunda especie o de tipo II.
δ	Sesgo.
χ^2	Distribución de probabilidad de Pearson o "chi-cuadrado".
δ_{cte}	Sesgo constante, ídem δ_{ct}
ρ_p	Desviación estándar aceptable.
B_u	Empuje aerostático del aire durante una medición de peso.
F_{hom}	Factor de homogeneidad.
H_0	Hipótesis nula planteada en una prueba de hipótesis.
k	Factor de cobertura.
N_p	Número de laboratorios participantes en un PT.
R	Recuperación del método analítico.
s_I	Estimación de la desviación estándar intermedia del procedimiento analítico.
s_r	Estimación de la desviación estándar de la repetibilidad del procedimiento analítico.
s_R	Estimación de la desviación estándar de la reproducibilidad del procedimiento analítico.
s_{serie}	Estimación de la desviación estándar entre series del procedimiento analítico, ídem s_{run}
$t_{\alpha/2, \nu}$	Valor de la distribución t de Student de dos colas para un nivel de significancia α y ν grados de libertad.
u	Incertidumbre estándar.
U	Incertidumbre expandida.
u_a	Incertidumbre del valor asignado de concentración para un IHRM.
u_c	Incertidumbre combinada.
X_a	Valor asignado de concentración para un IHRM.
ν	Grados de libertad.
ν_{eff}	Grados de libertad efectivos.

Capítulo I

1. Introducción

En esta Tesis se presenta la evaluación de la incertidumbre asociada a los resultados obtenidos con métodos analíticos que se utilizan rutinariamente en la determinación de diferentes analitos de importancia ambiental.

Los analitos seleccionados como objetivo de estos estudios fueron el grupo de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs por su sigla en inglés) y el mercurio, ambos priorizados por los organismos nacionales e internacionales de protección ambiental debido al impacto que pueden originar en los cuerpos receptores naturales, los vertidos o efluentes que contienen cantidades variables de PAHs o de mercurio [1,2]. La evaluación de estos impactos ambientales y las acciones vinculadas a su control y/o remediación, requiere disponer de metodologías analíticas que produzcan resultados confiables para la identificación y cuantificación de estos contaminantes químicos en muestras ambientales. Al respecto, se han desarrollado y normalizado diferentes métodos para la determinación de estos analitos en distintas matrices de interés ambiental (aguas naturales y/o residuales, suelos, aire ambiente, emisiones gaseosas y residuos sólidos). Muchas de estas metodologías de análisis han sido adoptadas como métodos de referencia por los organismos oficiales de protección ambiental (EPA, EEA), sin embargo, no es frecuente disponer del grado de confiabilidad de los resultados obtenidos al aplicar dichos métodos.

De acuerdo a las recomendaciones de la Organización Internacional de Normalización (ISO), la confiabilidad de una medición puede expresarse en términos de la incertidumbre del resultado obtenido a partir de esa medición [3].

En particular, la evaluación de la incertidumbre de resultados de análisis ambientales representa un importante desafío para los químicos analíticos y ambientales porque dicha evaluación implica un minucioso y exhaustivo estudio de todo el proceso de medida químico, con el fin de producir información metrológicamente válida, que pueda ser empleada en la toma de decisiones para la protección de los recursos naturales o para la reducción de la contaminación ambiental. Al respecto, es reconocida la significativa contribución de la incertidumbre asociada a la etapa de toma de muestra, que afecta a la incertidumbre total de los resultados medidos [4-6].

A continuación, se incluyen algunas consideraciones generales relacionadas con el cálculo de la incertidumbre de resultados analíticos, con especial referencia a su importancia en relación con los análisis químicos ambientales.

1.1. Incertidumbre

1.1.1. El concepto de incertidumbre

“La Química Analítica es una **ciencia metrológica** que desarrolla, optimiza y aplica herramientas (materiales, metodológicas y estratégicas) de amplia naturaleza, que se concretan en procesos de medida encaminados a **obtener información** (bio)química de calidad, tanto parcial (presencia/concentración en muestra de especies-analitos (bio)químicos) como global sobre materias o sistemas de amplia naturaleza (química, bioquímica, biológica) en el espacio y en el tiempo para resolver problemas científicos, técnicos, económicos y sociales.” (Miguel Valcárcel Cases) [7].

La característica más relevante de esta definición es que la Química Analítica es una ciencia Metrológica y una ciencia de la Información. Esta definición necesariamente establece dos objetivos fundamentales asignados a la Química Analítica.

Por una parte, y como en toda ciencia metrológica, el principal objetivo de estudio son los sistemas de medida, e indirectamente tiene como objetivo que se cumpla con las metodologías necesarias para obtener información de calidad. Estos estudios de los sistemas de medida se llevan a cabo mediante el análisis de los resultados de mediciones y de la incertidumbre asociada a dichos resultados.

Por otra parte, y desde el punto de vista químico analítico, por tratarse la Química Analítica de una ciencia informativa, su objetivo también es la reducción de la incertidumbre acerca de la composición cualitativa, cuantitativa y estructural de la materia de interés.

Por lo tanto, el concepto de la incertidumbre de medición (abreviadamente incertidumbre) participa simultáneamente en los objetivos básicos de las dos ciencias identificadoras de la Química Analítica (ciencia metrológica y ciencia de la información), y se refleja en el valor numérico que debiera acompañar a todo resultado de medición de un proceso de medida química, de acuerdo a la expresión general:

Resultado \pm Incertidumbre

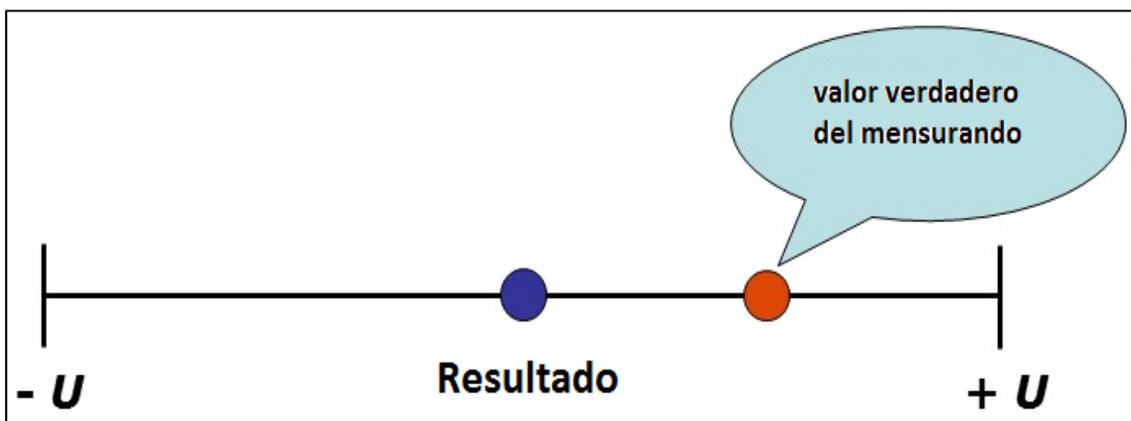


Figura 1: Representación gráfica de la incertidumbre de medición

Esta expresión resulta simple de presentar, tal como se muestra en la Figura 1, aunque, su interpretación requiere de un análisis más detallado:

El término indicado como *resultado*, es el resultado de la medición (por ejemplo: la concentración de una sustancia química), que debiera ser considerado como un buen estimador del valor verdadero de la concentración medida (mensurando). Este supuesto se asume porque, por una parte este resultado de la medición fue corregido teniendo en cuenta todos los errores debidos a efectos sistemáticos, y por otra parte porque además se debe interpretar el adjetivo “verdadero” en el sentido de que dicho valor cumple con la definición de mensurando.

La diferencia entre dicho resultado corregido y el valor verdadero es el denominado error de medición. Esta diferencia o “desviación” entre el resultado de la medición y el valor verdadero ocurre debido a la presencia de errores sistemáticos y de errores aleatorios [8]. La Figura 2 describe gráficamente las ideas planteadas.

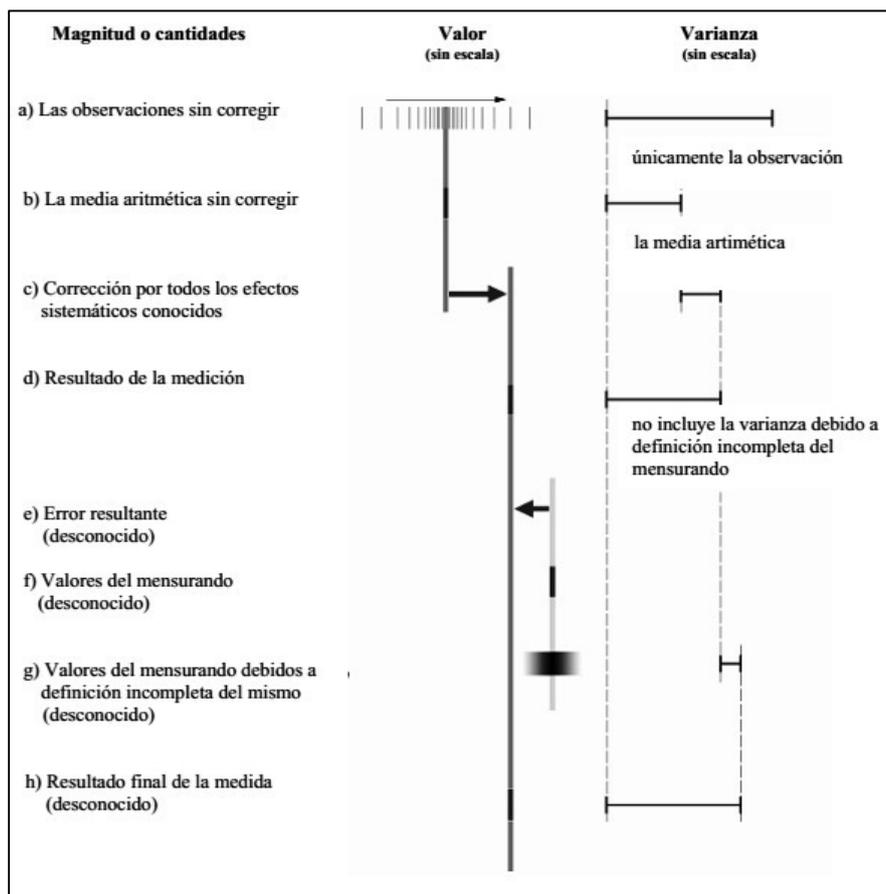


Figura 2. Ilustración gráfica de valores, errores e incertidumbre [3]

En la práctica metrológica, no es posible determinar exactamente la contribución de cada uno de esos errores y sólo se logra obtener una estimación de valores de las respectivas contribuciones. Sin embargo, se pueden calcular, evaluar y combinar las incertidumbres asociadas a ambos tipos de errores. Como resultado de esta combinación se obtiene la denominada incertidumbre combinada, que resulta ser un indicador cuantitativo del tamaño que puede adquirir el error de la medición [9].

El término indicado como *Incertidumbre*, es el que frecuentemente se denomina *incertidumbre expandida*, y se indica como U . Esta incertidumbre expandida se obtiene multiplicando la *incertidumbre típica* (o *estándar*) *combinada*, $u_c(y)$, asociada al resultado corregido, por un factor de cobertura, k ,

es decir: $U=k u_c(y)$. Este factor de cobertura, k , es un factor numérico que produce un intervalo de valores, en torno al resultado de medida (y), correspondiente a un nivel de confianza especificado.

De esta manera, queda definido el intervalo $(y - U)$ hasta $(y + U)$, dentro del cual queda comprendida una fracción importante de la distribución de valores que podría ser atribuida razonablemente al mensurando. Es decir, y de acuerdo a lo establecido por el Vocabulario Internacional de Metrología (VIM 3) [10], la incertidumbre de medición resulta formalmente definida como:

“parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando”

Cuando se puede atribuir una distribución normal (gaussiana) al mensurando y la incertidumbre asociada a la incertidumbre combinada típica, $u_c(y)$, tiene un elevado número de grados de libertad, suele aceptarse válido el uso del factor de cobertura $k = 2$. En este caso, la incertidumbre expandida asociada corresponde a una probabilidad de cobertura de, aproximadamente, un 95%. Sin embargo, en aquellos casos en los cuales el número de grados de libertad de $u_c(y)$ no sea elevado, es más correcto y recomendado por la ISO [11] utilizar el valor del estadístico t de Student, en lugar del valor de $k = 2$. El valor de t se selecciona de una distribución estadística de dos colas para el nivel de significación escogido y los grados de libertad efectivos, ν_{eff} , calculados con la aproximación de Welch-Satterhwaite [12,13]:

$$v_{\text{eff}} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}}$$

donde: v_i es el número de grados de libertad asociados a cada $u_i(y)$.

En otros casos, puede ocurrir que la distribución del mensurando se aleje de la normalidad (ej.: distribución triangular o arco-seno), y por lo tanto el valor del factor k será $\sqrt{3}$ y $\sqrt{2}$, respectivamente.

Respecto a la incertidumbre típica combinada, $u_c(y)$, el propio VIM 3 también establece su definición:

“incertidumbre típica del resultado de una medición, cuando el resultado se obtiene a partir de los valores de otras magnitudes, igual a la raíz cuadrada positiva de una suma de términos, siendo éstos las varianzas o covarianzas de esas otras magnitudes, ponderadas en función de la variación del resultado de medida con la variación de dichas magnitudes”

La determinación del valor de la incertidumbre típica combinada de los procesos de medición química no es una tarea fácil, debido al elevado número de fuentes de error presentes en dicho proceso, y debido a la dificultad de identificar y cuantificar todas las fuentes de incertidumbre presentes. Probablemente, estos hechos hayan dado lugar a que se desarrollen y propongan, desde hace más de una década, diversas formas de enfocar el procedimiento de estimación de la incertidumbre de procesos de medición química. Estos se basan en dos diferentes fuentes o niveles de información

analítica usada para estimar la incertidumbre: supralaboratorio (por ejemplo: ejercicios de interlaboratorios) o intralaboratorio (por ejemplo: estudios de validación analítica o modelado matemático de la incertidumbre, efectuados en el laboratorio) [14].

1.1.2. Enfoque de la ISO

En el año 1993, la ISO publicó la primera edición de la denominada “Guía para la Expresión de la Incertidumbre”, GUM: 1993 [15]. Esta primera edición fue reeditada en los años 1995 y 2008 con menores revisiones. Estos documentos fueron elaborados por un grupo de trabajo mixto, compuesto por expertos de las siguientes organizaciones-miembro del Comité Conjunto de Guías en Metrología (JCGM):

BIPM: Oficina Internacional de Pesas y Medidas (Bureau International des Poids et Mesures)

IEC: Comisión Electrotécnica Internacional

IFCC: Federación Internacional de Química Clínica

ISO: Organización Internacional de Normalización

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

IUPAP: Unión Internacional de Física Pura y Aplicada

OIML: Organización Internacional de Metrología Legal

ILAC: Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (desde el año 2005).

La versión vigente de la guía, GUM: 2008, es la que presenta la actual definición formal de la incertidumbre de una medición, que por otra parte es la definición de incertidumbre que fue adoptada oficialmente por el VIM, en su segunda edición del año 2008, posteriormente revisada en el año 2012.

El enfoque de la GUM está basado en la identificación y cuantificación de cada uno de los componentes de incertidumbre del proceso de medición, partiendo del modelado matemático de dicho proceso. Este modelo se especifica con la relación matemática entre las magnitudes (de entrada al modelo) involucradas en la medición y que son conocidas, y la magnitud de salida del modelo (mensurando). Después que se calculan todas las componentes de incertidumbre, éstas se deben combinar siguiendo la Ley de Propagación de la Incertidumbre, que simplemente implica la propagación de las incertidumbres asociadas a cada una de las componentes cuantificadas previamente. De esta manera, se obtiene la incertidumbre típica combinada, $u_c(y)$, y finalmente se calcula la incertidumbre expandida, U , multiplicando la $u_c(y)$, por el factor de cobertura k . La Figura 3 muestra esquemáticamente los pasos que se deben seguir para calcular la incertidumbre de acuerdo a la GUM.

Esta metodología de estimación de la incertidumbre suele denominarse “*bottom-up*”, debido a que divide al proceso de medición química en sus partes individuales fundamentales, realizando un análisis exhaustivo de los diferentes pasos del proceso analítico. Cada parte individual puede ser considerada como fuente de incertidumbre a la cual se le cuantifica su correspondiente componente, y luego se combinan para formar componentes mayores que finalmente conforman el sistema completo de cálculo.

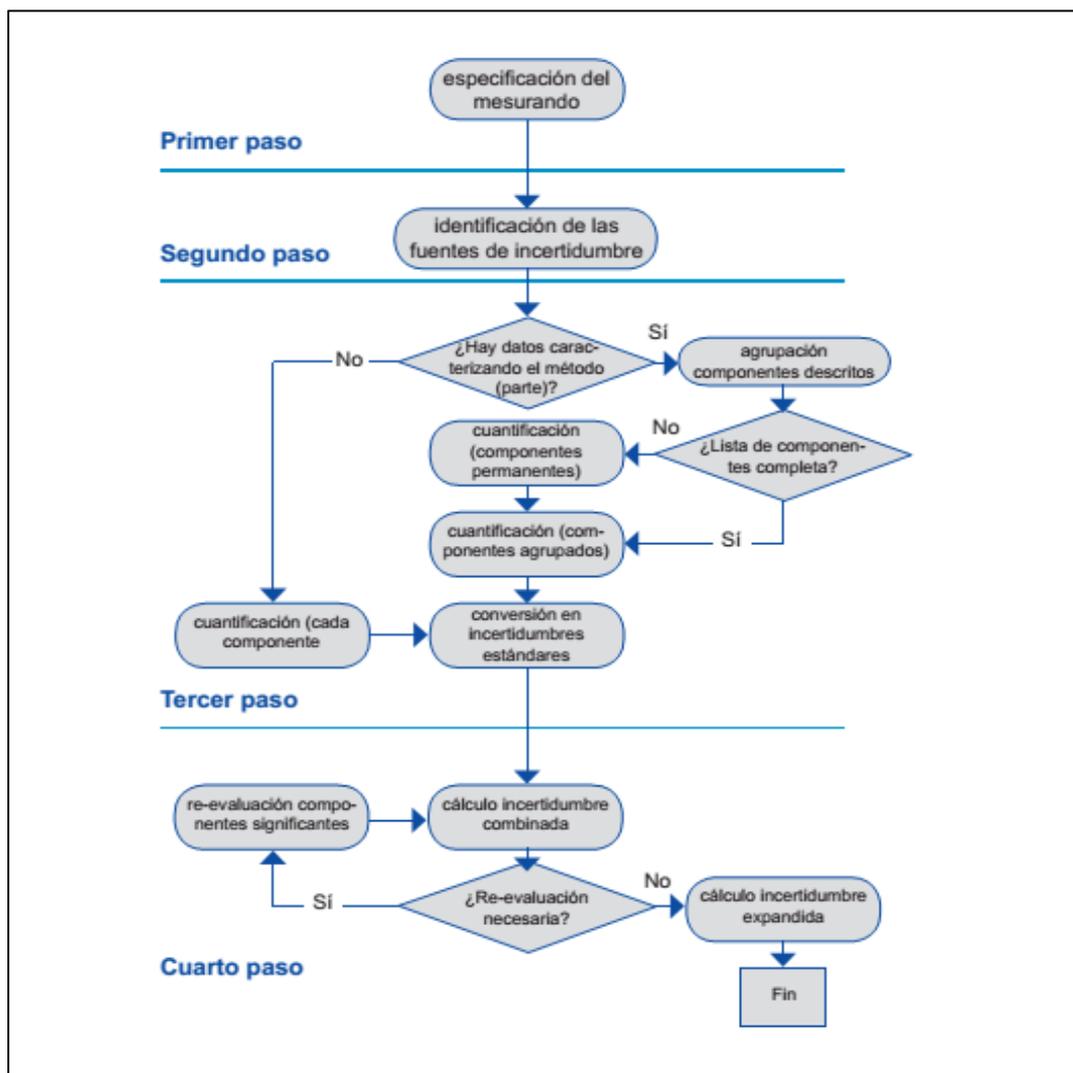


Figura 3: Secuencia de pasos seguidas por la GUM para calcular la incertidumbre.

Desde su primera edición, la GUM fue criticada y cuestionada por numerosos autores y organizaciones de la comunidad científica de la química analítica, respecto de su validez y aplicabilidad para el caso de procesos de medición química: Analytical Methods Committee [16], Maroto y col. [17], Hund y col. [18], y Horwitz [19]. En las diferentes publicaciones se presenta como principal argumento, que los procesos de medición química suelen ser complejos o muy complejos para ser representados adecuadamente por un modelo “a priori” como el propuesto por la GUM, más directamente aplicable a

medidas físicas.

1.1.3. Enfoque de la EURACHEM

En el año 1995, dos años después de la publicación de la primera edición de la GUM, la red de organizaciones europeas, EURACHEM, adaptó la metodología del enfoque GUM/ISO a procesos de medición química, y publicó su propia guía [20], aportando ejemplos de aplicación en química analítica. Sin embargo, esta adaptación también fue muy criticada y debatida porque la misma no consideró la diferencia entre procesos de medida físicos y aquellos de medida químicos [21].

Esa primera guía EURACHEM fue revisada en el año 2000 y posteriormente en el año 2012. En la segunda edición del año 2000 [22], EURACHEM propone utilizar la metodología propuesta por Barwick y col., basada en el uso de los diagramas causa-efecto [23] para la identificación estructurada de todas las fuentes de incertidumbre y en el análisis de reconciliación entre la información disponible y la información mínima requerida [24, 25]. La Figura 4 muestra el ejemplo de aplicación de los diagramas de causa-efecto para el cálculo de la incertidumbre de una valoración ácido-base.

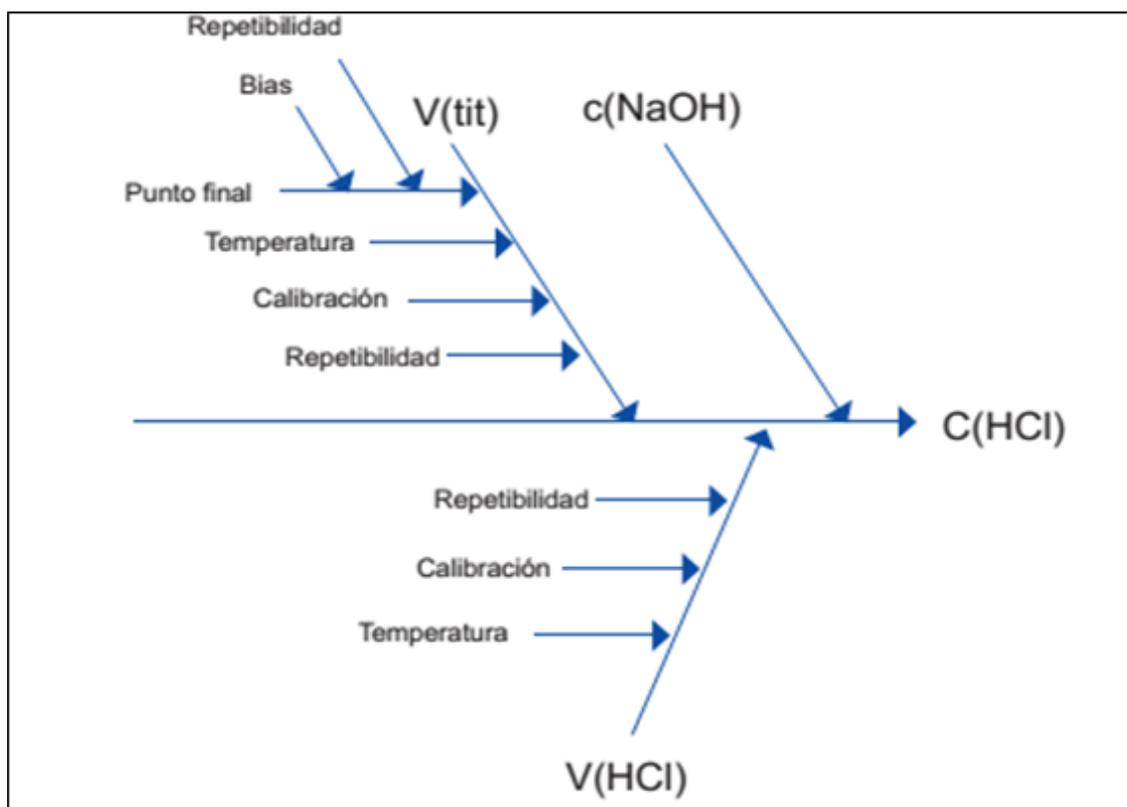


Figura 4: Diagrama de causa-efecto de una valoración ácido-base

Esta estrategia no pretende obtener un cálculo detallado de componentes sino una estimación global de la incertidumbre. El principal objetivo de esta metodología es asegurar, no sólo el análisis completo de las fuentes de incertidumbre, sino también que se evite la sobreestimación de la misma. En esta misma edición de la EURACHEM, también se recomienda enfáticamente a los laboratorios de ensayos químicos, la condición de que integren los procedimientos desarrollados para la estimación de la incertidumbre con sus propias acciones de garantía de calidad preexistentes, como por ejemplo estudios de validación del método analítico. La edición del año 2000, introduce también la aproximación global basada en calcular la incertidumbre utilizando la información obtenida en el proceso de validación de los métodos analíticos [26-28].

En la edición del año 2012, se incluyen: a) una guía mejorada para la estimación de la incertidumbre para niveles de concentración muy próximos al límite de detección del método analítico; b) una nueva guía para el uso de la metodología Monte Carlo aplicada a la evaluación de la incertidumbre; c) una guía mejorada para el uso de la información obtenida en los ensayos de aptitud de interlaboratorios; y d) una guía mejorada para la evaluación de la conformidad de resultados informados con su correspondiente incertidumbre, respecto de límites establecidos (por ejemplo: regulatorios) [29].

Además, EURACHEM ha contribuido con la publicación de una guía que incluye diversas metodologías para la estimación de la incertidumbre asociada a la etapa de toma de muestra [30], basada en la extensa bibliografía publicada por Ramsey y col. [31-33] y elaborada conjuntamente con otras organizaciones europeas de reconocida trayectoria en el estudio de la incertidumbre (RSC AMC, Nordtest, CITAC y Eurolab).

1.1.4. Enfoque del Analytical Methods Committee

En el año 1995, el Comité de Métodos Analíticos de la Real Sociedad de Química (Analytical Methods Committee de la Royal Society of Chemistry, AMC) publica un importante informe referido al uso de la incertidumbre en mediciones químico analíticas, y propone un enfoque diferente para el cálculo de la incertidumbre, basado en utilizar la información generada en los ejercicios interlaboratorios del tipo colaborativos [34]. Este enfoque, también conocido en la literatura como “*top-down*”, cuantifica las contribuciones de los laboratorios a las incertidumbres desde un nivel superior, considerando al laboratorio como un miembro más de un conjunto de laboratorios. La metodología consiste en

que, cada laboratorio participante analiza porciones idénticas de una muestra homogénea, siguiendo, tan fielmente como sea posible, el procedimiento analítico propuesto por el organismo coordinador del ejercicio colaborativo. Posteriormente, y a partir del conjunto de resultados reportados por los participantes, se estiman todas las fuentes globales de error, agrupadas en 4 términos: sesgo del método, sesgo del laboratorio, sesgo de la serie y el error aleatorio.

Explícitamente significa que, desde un nivel organizacional superior, los errores de cada laboratorio participante pueden ser considerados como errores aleatorios expresados en términos de desvíos típicos (estándar). La combinación de estos desvíos estándares (suma algebraica de las varianzas), permite obtener la contribución de incertidumbre de los errores de cada laboratorio, es decir:

$$u_{[lab+serie+rép]} = \sqrt{s_{[lab+serie]}^2 + s_{rép}^2}$$

En cambio, el sesgo del método es considerado como un error sistemático porque todos los laboratorios analizan la misma muestra homogénea con el mismo método analítico. Su contribución de incertidumbre sólo puede calcularse cuando se dispone del valor de referencia de la muestra analizada en el ejercicio.

Finalmente, la incertidumbre expandida se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$U = k \sqrt{u_{\delta[método]}^2 + u_{[lab+series+rép]}^2}; \text{ con } k = 2 \text{ (recomendado por el AMC)}$$

La Figura 5 muestra los diferentes tipos de errores asociados a un resultado, de acuerdo a la aproximación “*top-down*”.

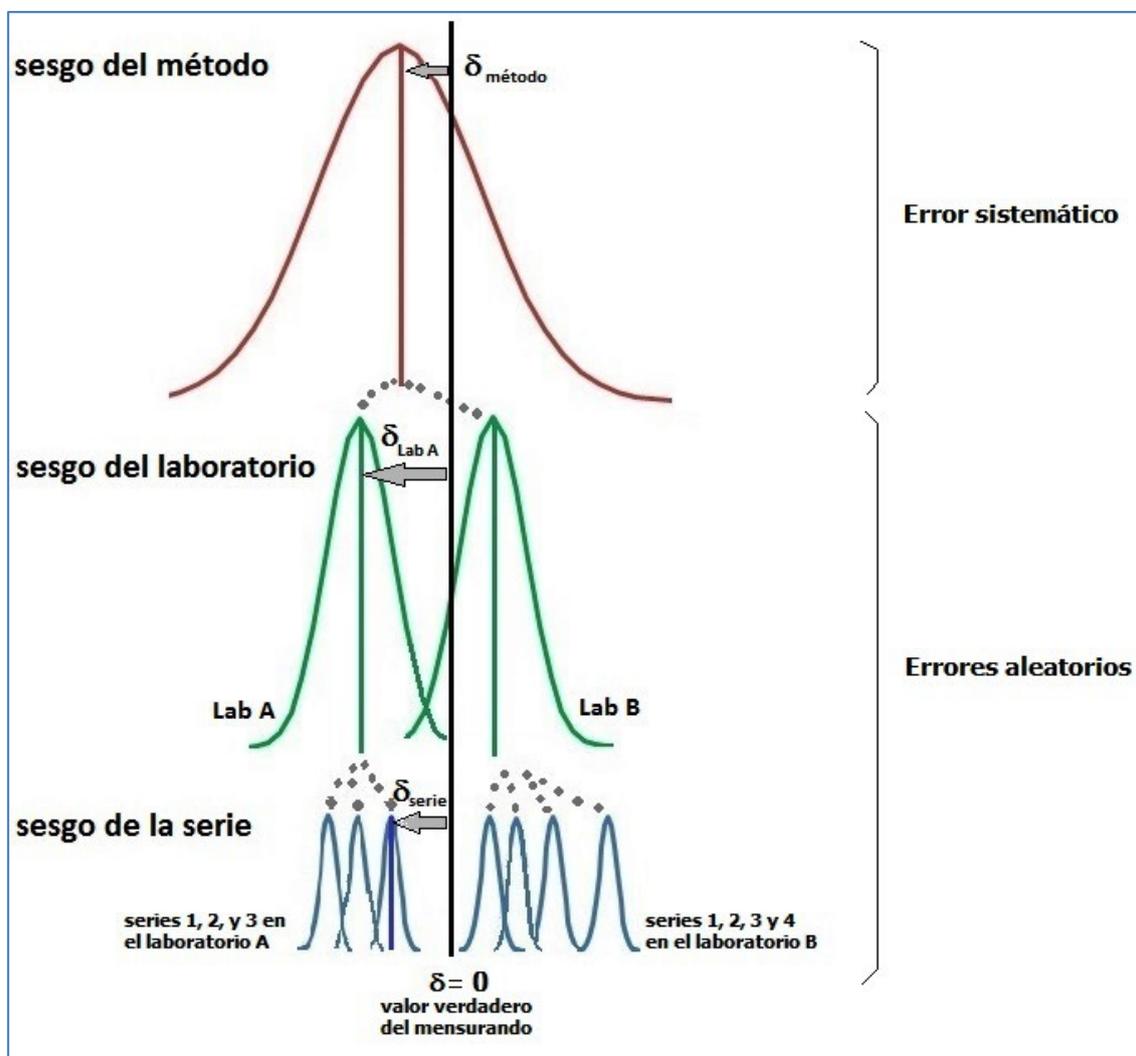


Figura 5: Errores asociados a un resultado según la aproximación “*top-down*”.

Es importante señalar que en este enfoque no se consideran las fuentes de incertidumbre asociadas a la heterogeneidad de la muestra, ni la asociada a la toma de muestra, como así tampoco variabilidades en la composición de la matriz (tipo de matriz y nivel de concentración de analito/s). La guía aclara que estas fuentes de incertidumbre deberían incluirse en el caso de que fuera necesario.

En este sentido, el enfoque resultaría más apropiado para el escenario en el cual es posible preparar, adecuadamente y con la suficiente exactitud, una muestra para analizar en el ejercicio colaborativo. Adecuadamente, respecto del aseguramiento de su homogeneidad y estabilidad, desde su transporte y aún en el período de análisis por parte de los participantes. En cuanto a la exactitud, ésta suele ser un requisito difícil de asegurar cuando no se dispone de métodos definitivos, es decir con la referencia de mayor jerarquía metrológica.

Otro aspecto importante para destacar de este enfoque es el requisito de disponer de un número no-limitado de laboratorios participantes que acrediten competencia técnica para la ejecución del ensayo químico establecido en la organización del ejercicio colaborativo.

Estas desventajas indican una dificultosa y costosa aplicabilidad de la aproximación propuesta por el AMC, aspecto relevante que ha sido enfatizado en la bibliografía internacional [25, 35-37]. Sin embargo, ciertas organizaciones importantes (ref: National Measurements Institutes, European Proficiency Testing Information System) afrontaron el esfuerzo económico y de logística para implementar ejercicios colaborativos aplicados a ensayos químicos de rutina: EPTIS 2005 [38], CAEAL 2004 [39].

Por otra parte, y también con el objetivo de solucionar la dificultad de sistematizar un ejercicio colaborativo en el marco del enfoque de la AMC, la ISO publicó, en el año 2003 (revisada en los años 2004 y 2012), su denominada “Especificación Técnica ISO/TS 21748”, en la cual propone la vinculación de datos de validación obtenidos en cada laboratorio con la información disponible de estudios interlaboratorios [40]. El documento

establece requisitos de garantía de calidad para los laboratorios, pero presenta la ventaja de ser más fácilmente aplicable que el enfoque AMC. Además, esta propuesta resulta útil para estimar la incertidumbre a diferentes niveles de concentración, cuando el laboratorio no puede participar en un ejercicio de interlaboratorios.

1.1.5. Enfoque de la NORDTEST

La organización de los países nórdicos europeos (Finlandia, Noruega, Suecia y Dinamarca) Nordtest, publicó en el año 2003 su primera edición del “Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories” [41], posteriormente editado en el año 2004 y en el año 2012. Este enfoque propone incorporar los resultados previos que el laboratorio reportó en su participación en ejercicios colaborativos (no menos de 6 ejercicios), para calcular la contribución del sesgo del laboratorio e incorporar esta contribución al cálculo de la incertidumbre expandida. El modelo de cálculo de la incertidumbre del enfoque Nordtest responde al esquema de la Figura 6.

La aproximación Nordtest resulta de aplicabilidad restringida, porque se requiere disponer de suficiente información de ejercicios colaborativos, obtenida en lapsos de tiempos razonables (no especificados exactamente por el documento), respecto del ensayo químico y también del analito determinado.

Por otra parte, el documento tampoco justifica las razones por las cuales se establece el requisito de participación en no menos de 6 ejercicios colaborativos.

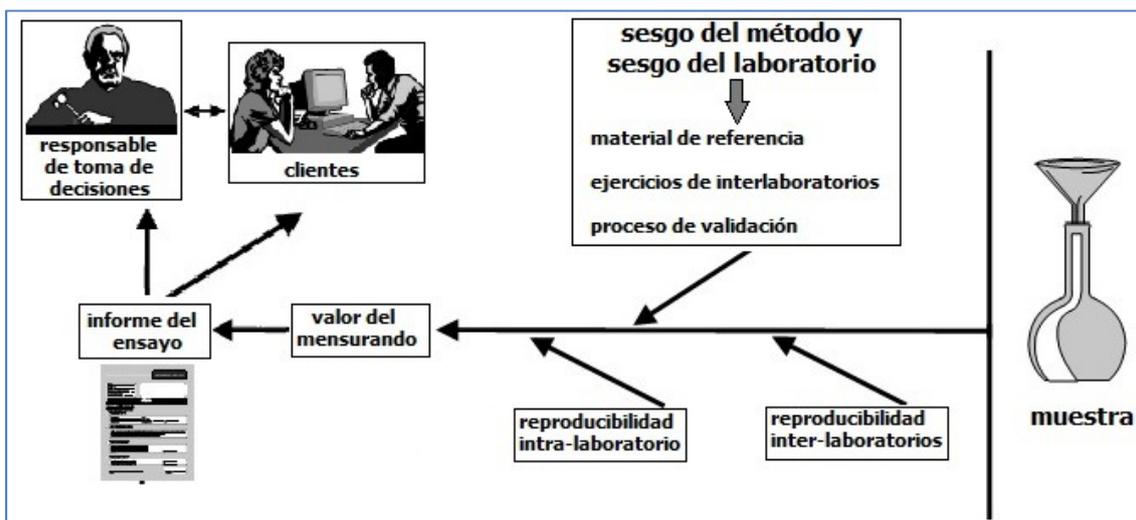


Figura 6: Modelo para la estimación de la incertidumbre según la aproximación Nordtest.

Además del citado manual, la Nordtest contribuyó con el desarrollo y publicación de otro manual que propone las mismas metodologías de cálculo para estimar la contribución de incertidumbre asociada a la etapa de toma de muestra de un proceso de medición química [42].

1.1.6. Enfoques basados en la utilización de la información obtenida en la validación del proceso de medición química

En el año 1998, Ellison y col. publican una estrategia para evaluar la incertidumbre a partir de la información generada en los estudios de validación de un método analítico [43]. El enfoque propuesto por estos autores, reconcilia los requisitos formales para la estimación de la incertidumbre (por ej: ISO, EURACHEM) con los resultados de incertidumbre obtenidos a partir de los resultados de los estudios de veracidad, precisión y robustez, incluidos en el proceso de validación del método.

Esta aproximación también fue estudiada en profundidad por Maroto y col. [16,20,25,44]. La metodología propone calcular la incertidumbre globalmente aprovechando, sobre todo, la información generada durante la verificación de la veracidad y también la obtenida durante otras etapas de la validación del método. De esta manera, se propone complementar o a veces reemplazar consistentemente las metodologías matemáticas detalladas de la GUM, con un proceso más general de análisis y cálculo del tipo causa-efecto para la estimación de la incertidumbre.

La incertidumbre combinada calculada de acuerdo a esta propuesta, está dada por la expresión general:

$$u_c = \sqrt{u_{\text{precisión}}^2 + u_{\text{veracidad}}^2 + u_{\text{pretratamientos}}^2 + u_{\text{otros}}^2}$$

donde:

- El término correspondiente a la contribución asociada a la incertidumbre del procedimiento, $u_{\text{precisión}}$, puede obtenerse a partir de diferentes fuentes de información, tales como, el análisis de varianza (ANOVA) aplicado a los resultados surgidos de diseños experimentales empleados en estudios de precisión o veracidad del método, o de la información de gráficos de control.
- La contribución asociada a la incertidumbre de la evaluación de la veracidad, $u_{\text{veracidad}}$, corresponde a la incertidumbre del sesgo calculado en dicha evaluación. Su valor dependerá de la referencia que se utilice en los análisis practicados para esta verificación (por ej: materiales de referencia, valor de consenso de un ejercicio interlaboratorio, cantidad de analito adicionada).

- La incertidumbre asociada a submuestreo y pretratamientos, $u_{pretratamientos}$, incluye las contribuciones correspondientes a la falta de homogeneidad de la muestra (heterogeneidad) y a los pretratamientos que no se hayan realizado al analizar la muestra utilizada para la evaluación de la veracidad. Para calcular estas contribuciones se utilizan los valores de las varianzas de los resultados obtenidos en los análisis practicados sobre sub-muestras o muestras pretratadas, trabajando en condiciones de repetibilidad. Este término no incluye la contribución de la etapa de toma de muestra.
- El cuarto término, u_{otros} , considera la incertidumbre de otros términos asociados, por ejemplo a variabilidades entre la muestra analizada para la evaluación de la veracidad y las muestras de rutina, o a otros factores de variabilidad que no se hayan tenido en cuenta en los cálculos de precisión. El cálculo de este término generalmente no es directo, y suele requerir de una evaluación experta del analista, del uso de información bibliográfica o de otras fuentes confiables de información.

La incertidumbre expandida, U , se obtiene de la misma manera que se explicó previamente, es decir utilizando un factor de cobertura, $k=2$, o bien utilizando el valor del estadístico t , tabulado para dos colas, con el nivel de significación seleccionado y con los grados de libertad efectivos calculados con la expresión de Welch-Satterthwaite. Este último cálculo se recomienda cuando los distintos términos de la incertidumbre combinada tienen bajo número de grados de libertad (especialmente el término correspondiente a la mayor contribución). La Figura 7 muestra el esquema para calcular la incertidumbre utilizando la información obtenida en la evaluación de la veracidad.

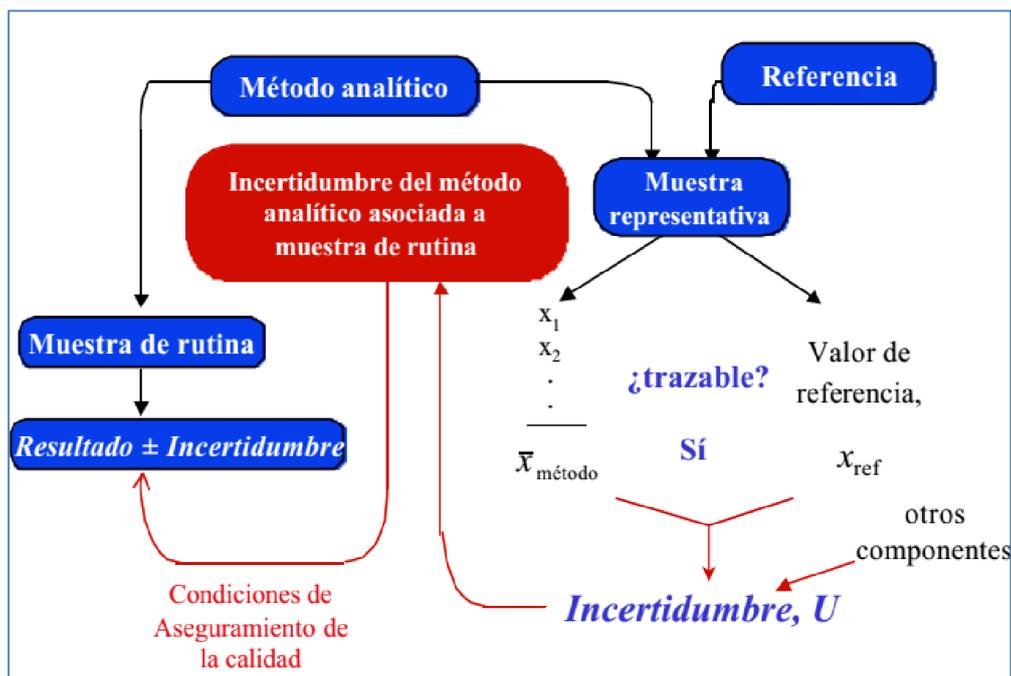


Figura 7: Cálculo de la incertidumbre utilizando la información obtenida al verificar la veracidad de los resultados. [45].

Esta metodología presenta la gran ventaja de requerir poco trabajo adicional al trabajo necesario para cumplir con el proceso de validación del método. Representa una importante simplicidad práctica y conceptual, y además es de aplicación universal para laboratorios de ensayos químicos de rutina.

1.2. Fuentes de incertidumbres, condiciones de medición y niveles

Los numerosos estudios publicados en la bibliografía demuestran que, dependiendo del analito estudiado, las principales fuentes de incertidumbre de un resultado son las de la etapa de toma de muestra y/o el proceso de medida químico. Dentro del proceso de medida químico, se pueden distinguir las etapas de: operaciones previas, medición y transducción de la señal analítica y

la adquisición y tratamiento de los datos, esquemáticamente expresado en la Figura 8:

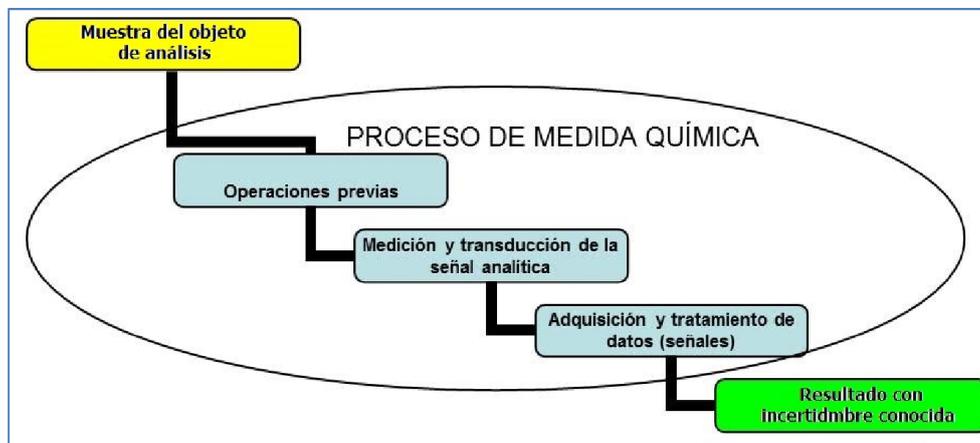


Figura 8: Esquema que representa el proceso de medición química (PMQ) [7].

La componente de la incertidumbre asociada a la etapa de toma de muestra del objeto de análisis, sólo correspondería ser estimada por el laboratorio de ensayos cuando éste sea responsable de dicha toma de muestras. En este caso, se dispone de numerosos estudios científicos publicados por Ramsey [46-50], como así también de la guía internacional producida conjuntamente por los siguientes organismos europeos de metrología química: EUROLAB, Nordtest y el Comité de Métodos Analíticos de la Royal Society of Chemistry de Gran Bretaña.

En cambio, respecto a la estimación de la incertidumbre del proceso de medida química, la norma ISO 17025:2005 [51], aún desde su primera edición del año 1999, establece como requisito general que todo laboratorio de ensayos debe tener y debe aplicar un procedimiento para estimar la incertidumbre de sus mediciones. Adicionalmente, en la República Argentina, el Organismo Argentino de Acreditación (OAA), miembro de la Organización para

la Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC), publicó una guía donde se establecen los principios y requisitos para la expresión de la incertidumbre [52], y establece además, en el marco de la acreditación bajo la norma ISO 17025:2005, los criterios específicos para evaluar la incertidumbre en los procesos de medida química [53].

La aplicación de estos documentos metodológicos del OAA implica, que una vez que se determinaron el mensurando, el principio, el método y el procedimiento de medición, se deben identificar las posibles fuentes de incertidumbre. El mensurando está definido de acuerdo al VIM 3 como “la magnitud sujeta a medida”. Un mensurando en el análisis químico, se refiere al analito o a la propiedad que estamos midiendo, y “sólo una adecuada interpretación del término “mensurando” permitirá tener en consideración todas las fuentes de incertidumbre”.

En la práctica, suele recomendarse que se consideren las siguientes posibles fuentes de incertidumbre:

- a. Definición incompleta del mensurando;
- b. Realización imperfecta de la definición del mensurando;
- c. Muestreo no representativo - la muestra medida no representa el mensurando definido-;
- d. Efectos no conocidos adecuadamente de las condiciones ambientales o mediciones imperfectas de las mismas;
- e. Desviaciones personales en la lectura de instrumentos analógicos;
- f. Límites en la discriminación o resolución del instrumento;

- g. Valores inexactos de los patrones y materiales de referencia utilizados en la medición;
- h. Valores inexactos de constantes y otros parámetros obtenidos de fuentes externas y utilizados en el algoritmo para la obtención de datos;
- i. Aproximaciones e hipótesis incorporadas en el método y el procedimiento de medición;
- j. Variaciones en observaciones repetidas del mensurando realizadas en condiciones aparentemente idénticas.

El OAA, en forma aclaratoria, indica que estas fuentes no son necesariamente independientes. Algunas de las fuentes (a) - (i) pueden contribuir a la fuente (j).

En particular, para ensayos químicos e independientemente del enfoque/metodología usada para estimar la incertidumbre, las principales fuentes de incertidumbre pueden ser adjudicadas a las siguientes causas, entre otras de las indicadas por el OAA:

- a. Muestreo y / o sub –muestreo. (cuando corresponda).
- b. Condiciones de almacenamiento.
- c. Efectos atribuibles a los instrumentos de medición, incluyendo función de calibrado, número de cifras significativas, redondeo de cifras relevantes.
- d. Pureza de los reactivos.
- e. Estequiometría asumida.
- f. Condiciones de medición.
- g. Efectos de la muestra (matriz).

- h. Corrección por blanco.
- i. Efectos atribuibles al operador.

Independientemente de la contribución relativa de cada fuente, cada una de las etapas del proceso de medida químico contribuirá a la incertidumbre final. Este hecho puede adquirir mayor relevancia cuando se pretende optimizar la precisión del método analítico, haciendo hincapié en aquellas etapas que más incidencia poseen en la incertidumbre del resultado final.

1.3. Evaluación de la incertidumbre de tipo A y tipo B

Aún cuando se adopten las metodologías de cálculo de incertidumbre globales del nivel supra o intralaboratorio, y más aún cuando se adopte el enfoque de la GUM, la evaluación completa de la incertidumbre de medición, comúnmente denominado balance de incertidumbres (*uncertainty budget*), incluye componentes que están asociadas a los errores aleatorios, otras componentes que surgen de la evaluación de los errores sistemáticos y otras asociadas a factores de corrección de los errores sistemáticos (algunas veces no se corrigen los errores sistemáticos y en su lugar se tratan como componentes de incertidumbre).

El cálculo de estas componentes puede efectuarse mediante una evaluación tipo A de la incertidumbre y/o mediante una evaluación tipo B de la incertidumbre [54].

La evaluación de incertidumbre tipo A se efectúa a partir de una distribución estadística de los valores que proceden de la series de mediciones obtenidas bajo condiciones de medida definidos y que pueden caracterizarse

por desviaciones típicas (desvíos estándares). Las condiciones definidas de medición pueden corresponder a: condición de repetibilidad, condición de precisión intermedia o condición de reproducibilidad, es decir:

- Condición de repetibilidad: Condición de medición que incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación, y el mismo lugar, así como mediciones repetidas de un mismo objeto o de un objeto similar en un corto período de tiempo.
- Condición de precisión intermedia: Es aquella que incluye el mismo procedimiento de medición, el mismo lugar y mediciones repetidas de un mismo objeto o de objetos similares durante un período amplio de tiempo, pero que puede incluir otras condiciones que involucren variaciones (variabilidad de patrones, de calibraciones, de operadores, de sistemas de medida).
- Condición de reproducibilidad: Condición que incluye diferentes lugares, operadores, sistema de medición, así como mediciones repetidas de los mismos objetos o de objetos similares.

La otra metodología de evaluación es la del tipo B, mediante la cual se obtienen incertidumbres (tipo B) que también pueden caracterizarse por desviaciones típicas, pero evaluadas a partir de funciones de densidad de probabilidad basadas en la experiencia u otras fuentes de información. Tal es el caso de evaluaciones basadas en informaciones asociadas a: valores publicados y reconocidos; valores de un material de referencia certificado; certificados de calibración; valores de deriva de un instrumento; a partir de valores límites conocidos por la experiencia personal del analista, etc.

La Figura 9 muestra los dos tipos de evaluación de la incertidumbre descriptas.

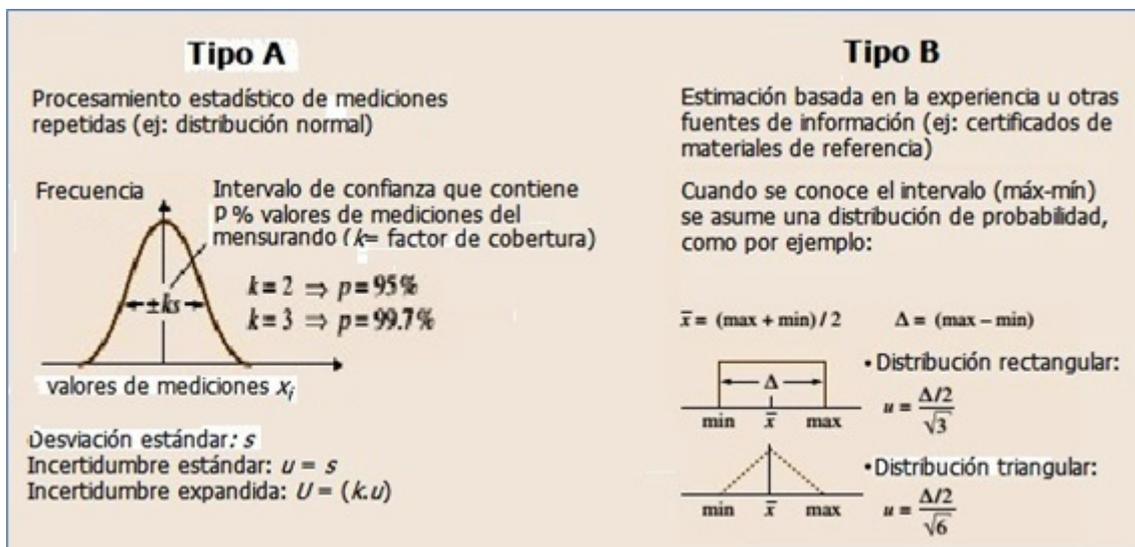


Figura 9: Evaluación tipo A y tipo B de la incertidumbre de mediciones.

1.4. Significación de la estimación de la incertidumbre de medición

Hace más de una década que el uso de la incertidumbre de medición ha tomado significativa importancia como elemento esencial en todos los aspectos de la metrología científica, industrial, y aún de la metrología legal, porque es un indicador clave de la calidad de todo resultado experimental que requiera ser evaluado respecto de la creciente demanda de cumplimiento de límites regulatorios y/o de mercado [55-58]. Así, cuando el valor de la magnitud medida, en una determinada muestra sujeta a investigación/control, resulta ser tan cercano a su valor límite, su incertidumbre estimada podría afectar la toma de decisiones para diversas acciones de aceptación o rechazo de productos, remediación o no de un recurso natural o la prescripción médica de un tratamiento de salud.

La Figura 10 muestra los comentarios mencionados.

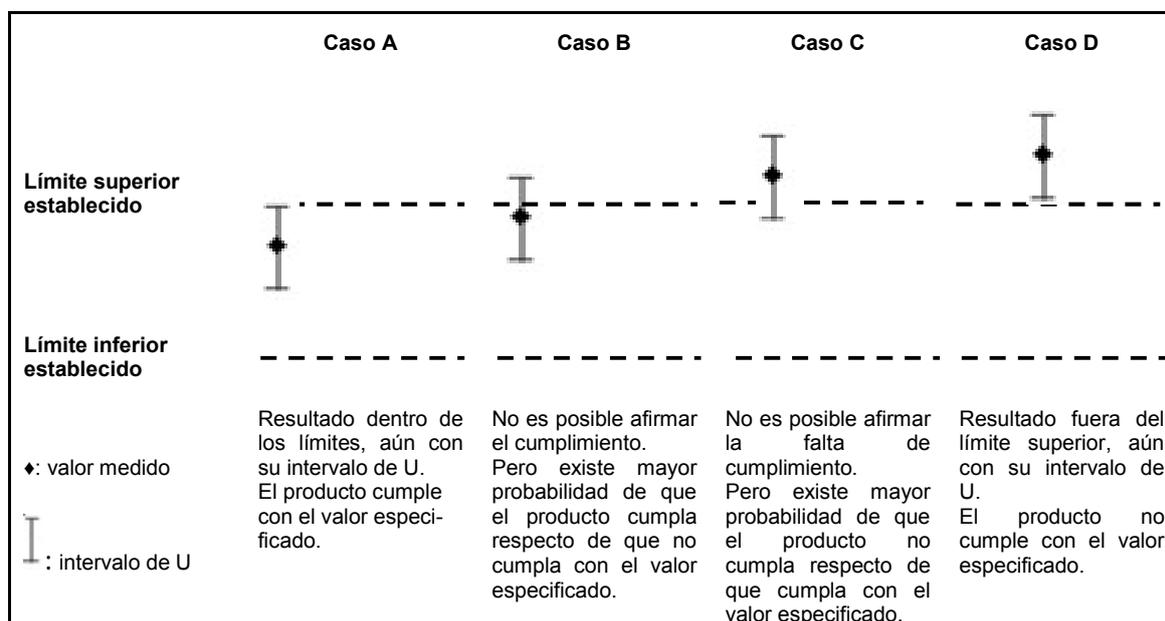


Figura 10: Diferentes casos de la significación de la incertidumbre

Por lo tanto, la incertidumbre de los resultados de un proceso de medida química es un dato importante para todo usuario final de dichos resultados porque permite evaluar la confiabilidad de los mismos. Esto significa que los laboratorios de análisis químicos debieran tener como meta y política la producción de resultados técnicamente confiables, acorde con las exigencias internacionales actuales. De esta manera serán reconocidos, asegurando la calidad del servicio que brindan. En este marco, la estimación de la incertidumbre de medición forma parte sustancial tanto del aseguramiento de calidad como de la demostración de aptitud de los laboratorios de ensayos y calibraciones, y al mismo tiempo es parte integral de la acreditación de los mismos [59].

Otra razón que destaca la importancia de la estimación de la incertidumbre de medición es la necesidad de conocer y comprender los principios y mecanismos involucrados en el propio proceso de medida estudiado/evaluado. Una falta de conocimiento profundo del proceso de medición implica, en sí mismo, un desconocimiento de fuentes de incertidumbre que no fueron identificadas y por ende su contribución no fue cuantificada para su inclusión en el balance de incertidumbres [60].

1.5. Significación de la incertidumbre de medición en análisis ambientales

Respecto de su particular importancia en los análisis químicos ambientales, la incertidumbre de medición es un componente de información relevante para la interpretación de los resultados de monitoreos de parámetros ambientales (físicos y/o químicos) [41, 61-64].

La adecuada estimación de la incertidumbre podría reducir el riesgo de alcanzar interpretaciones erróneas de datos ambientales y consecuentemente reducir el riesgo de estimar erróneamente peligros para a la salud o los recursos naturales

También ha sido demostrada la utilidad del concepto de incertidumbre de medición en la estimación de costos de remediación de sitios contaminados y en la evaluación de la calidad de tecnologías de remediación de suelos contaminados [65-67]. En los años recientes, destacadas Autoridades de Protección Ambiental de la Unión Europea y de USA, han reconocido la importancia de estimar la incertidumbre de las mediciones de parámetros de interés ambiental, y como resultado de este reconocimiento comenzaron a

promulgarse regulaciones que establecen el requisito de estimar la incertidumbre de mediciones dentro de los objetivos de calidad de los monitoreos ambientales [68,69]. Complementariamente y como herramienta de gestión para el cumplimiento de estas regulaciones, comenzaron a publicarse guías y manuales para la estimación de la incertidumbre de mediciones ambientales [70-71].

1.6. Consideraciones relevantes

En las últimas décadas se ha producido un profuso desarrollo de metodologías analíticas como respuesta a la creciente demanda de importantes ámbitos de la sociedad: mercado económico, protección ambiental, prevención y protección de la salud, y sanidad alimentaria. Esta variabilidad de ámbitos, implica una amplia variabilidad de matrices en las que un analito puede estar sujeto a ensayos químicos. A su vez, esta diversidad de matrices químicas requerirá de diferentes procedimientos de preparación de muestras previa a la medición instrumental [72]. Debido a que esta etapa de preparación suele ser inevitable, su incertidumbre asociada debiera ser una contribución incluida en la estimación de la incertidumbre del resultado del ensayo. La omisión de este componente de incertidumbre no debería ser una operación automática si no se cuantifica y evalúa rigurosamente respecto de las demás componentes que integran el balance de incertidumbres.

Existen numerosos enfoques, metodologías y fuentes de información para estimar la incertidumbre, algunas con notables diferencias entre sí, razón por la cual se podría dificultar la orientación del analista químico.

Independientemente de estas potenciales dificultades, y de la metodología que se adopte para su estimación, la determinación y control de la incertidumbre de medición de los resultados de todo ensayo químico, debiera considerarse siempre como uno de los objetivos de todo programa de aseguramiento y control de la calidad de todo laboratorio analítico que pretenda demostrar la confiabilidad de los resultados que emite.

Por otra parte, la mejora en la confiabilidad de los resultados analíticos ha demostrado tener impactos positivos en el control y recuperación de recursos naturales. Para alcanzar este objetivo de mejora es necesario que el laboratorio que practica análisis ambientales, identifique, cuantifique y minimice las principales fuentes de incertidumbre de sus resultados analíticos.

En el marco de la problemática descrita, se definió el objetivo general de este trabajo de tesis, que consistió en el estudio y evaluación de la significación de la incertidumbre de las diferentes etapas de los procesos de medición de mercurio y PAHs en muestras ambientales.

Bibliografía

- [1] U. S. Code of Federal Regulations, **Title 40, Part 423, Appendix A**, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 2013.
- [2] European Commission, DG Environment, **Regulatory Report, Part 2, Office for Official Publications of the European Communities**, Luxembourg, 2001.
- [3] International Organization for Standardization (1993). **Guide to the expression of uncertainty in measurement. ISO**, Genève.
- [4] M.H. Ramsey, Ellison (Eds), Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC **Guide: Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches. Eurachem**. 2007.
- [5] K.A. Boon, P.D. Taylor, M.H. Ramsey, **Geostandards and Geoanalytical Research**, 31:(2007), 237–249.
- [6] C. Grøn, J.B. Hansen, B. Magnusson, A.Nordbotten, M. Krysell, K.J. Andersen, U. Lund. **A Nordtest Handbook for Sampling Planners on Sampling Quality Assurance and Uncertainty Estimation**. Nordic Innovation Centre. Norway. 2007.
- [7] M. Valcárcel. **“Principios de Química Analítica”**. Springer-Verlag Ibérica. 1999.
- [8] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. de Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A**, Elsevier, Amsterdam, NL, 1997, pp. 452-454.

- [9] B. Magnusson, T. Näykki, H. Hovind, M. Krysell. **Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories**, Edition 3, Nordic Innovation, Oslo. 2012.
- [10] BIPM, IEC, IFCC, ILAC, IUPAC, ISO, OIML (2012). **The international vocabulary of metrology-basic and general concepts and associated terms (VIM)**, Edition 3, JCGM 200:2012.
- [11] BIPM, IEC, IFCC, ILAC, IUPAC, ISO, OIML (2008). **Evaluation of measurement data. Guide to the expression of uncertainty in measurement**, JCGM 100:2008.
- [12] F.E. Satterthwaite, **Psychometrika** 6 (1941) 309–316.
- [13] B.L. Welch, **Biometrika** 2 (1937) 110-114.
- [14] R.J.N.B. da Silva, J.R. Santos, M.F.G.F.C. Camoes, **Acredit Qual Assur** 10 (2006) 664-671
- [15] BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML. **Guide to the expression of uncertainty in measurement. International Organization for Standardization**, Genève. 1993.
- [16] Analytical Methods Committee **Analyst** 120 (1995) 2303–2308.
- [17] A. Maroto, R. Boqué, J. Riu, X. Ruis, **Trend Anal Chem** 18(1999) 577–584.
- [18] E. Hund, D.L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, **Trends Anal Chem** 20 (2001) 394–406.
- [19] W. Horwitz, R. Albert, **Analyst** 122(1997) 615–617.
- [20] EURACHEM. **Quantifying uncertainty in analytical measurement. EURACHEM**, Secretariat. Teddington, Crown (Ed.) UK. 1995.
- [21] A.Maroto, R. Boqué, J. Riu, X. Rius, **Anal Chim Acta** 440 (2001) 171-184.

- [22] EURACHEM. **Quantifying uncertainty in analytical measurement. EURACHEM/CITAC Guide**, Edition 2, 2000.
- [23] K. Ishikawa, J.H. Loftus, **Introduction to quality control. Vol. 98**. London: Chapman & Hall, 1990.
- [24] V.J. Barwick, S.L.R. Ellison, **Anal. Commun.** 35 (1998) 377-383
- [25] S.L.R. Ellison, V.J. Barwick, **Analyst** 123(1998) 1387-1392.
- [26] A Maroto, R Boqué, J Riu, X. Rius, **Anal Chim Acta** 391 (1999) 173-185.
- [27] V.J. Barwick, S.L.R. Ellison, **Accred Qual Assur** 5(2000)47-53.
- [28] EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics**. Edition 1. Laboratory of the Government Chemist, Teddington, UK. 1998.
- [29] S.L.R. Ellison, A. Williams (Eds). **Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, Edition 3, (2012).
- [30] M.H.Ramsey, S.L.R.Ellison (eds.) Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC **Guide:Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches Eurachem**, Edition 1. (2007)
- [31] M.H. Ramsey, A. Argyraki, **Sci. Total Environ.** 198 (1997)243-257.
- [32] J.A. Lyn, M.H. Ramsey, R.J. Fussell, R. Wood, **Analyst** 128 (2003)1391-1398.
- [33] M.H. Ramsey, **Quality Assurance & Quality Control of Environmental Field Sampling**, Unitec House, 2 Albert Place, London N3 1QB, UK (Future Science Ltd) 2014 Pages 26-45.
- [34] Analytical Methods Committee, **Analyst** 120 (1995) 2303-2308.
- [35] S.L.R. Ellison, W. Wegscheider, A. Williams, **Anal. Chem.** 69 (1997) 607A-613A.

- [36] S.L.R. Ellison, ***Metrologia*** 51(2014) S199-S205.
- [37] E. Hund, D.L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, ***Anal. Chim. Acta*** 480 (2003) 39-52.
- [38] EPTIS: <http://www.eptis.bam.de>
- [39] CALA: <http://www.cala.ca>
- [40] International Organization for Standardization (2003). ISO/TC 21748. ***Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation***. ISO, Genève.
- [41] B Magnusson, T Näykki, H Hovind, M Krysell, ***Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories***, NT TECHN REPORT +537, NORDTEST, Espoo, Finland, 2003.
- [42] C. Grøn, J.B. Hansen, B. Magnusson, A. Nordbotten, M. Krysell, K.J. Andersen, U. Lund, . ***A Nordtest Handbook for Sampling Planners on Sampling Quality Assurance and Uncertainty Estimation***, NT TECHN REPORT 604, Nordtest Innovation Center, Oslo, Norway, 2007.
- [43] S.L.R. Ellison, V.J Barwick, ***Accred. Qual. Assur*** 3 (1998) 101-105.
- [44] A. Maroto, R. Boqué, J. Riu, X. Rius, ***Química Analítica*** 19 (2000). 85-94.
- [45] A. Maroto Sánchez (2002). ***Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. Tesis Doctor en Química***, Universidad Rovira i Virgili. Tarragona. España.
- [46] M. H. Ramsey, ***J. Anal. Atom. Spect.*** 13 (1998) 97-104.
- [47] M. H. Ramsey, A. Argyraki, ***Sci. Total Environ.*** 198 (1997) 243-257.
- [48] M. H. Ramsey, ***Accred. Qual. Assur.*** 7 (2002) 274-280.
- [49] M. H. Ramsey, M. Thomson, ***Accred. Qual. Assur.*** 12 (2007) 503-513.

- [50] J.A. Lyn, M.H. Ramsey, A.P. Damant, R. Wood ***Analyst*** 132 (2007) 1231-1237.
- [51] International Organization for Standardization (2005). ISO/IEC 17025:2005. ***General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories***. ISO, Genève.
- [52] Organismo Argentino de Acreditación (2013). ***Guía GUI-LE-01: Expresión de la Incertidumbre de Medida en las Calibraciones/Ensayos***. OAA, Buenos Aires.
- [53] Organismo Argentino de Acreditación (2012). ***Documento Técnico CE-LE-05: Criterios Específicos para Evaluar la Incertidumbre en Procesos de Medición en Laboratorios Químicos***. OAA, Buenos aires.
- [54] V.J. Barwick, (2011). ***Eurachem Guide: Terminology in Analytical Measurement-Introduction to VIM 3***. E. Prichard (Eds.)
- [55] B. King, Fresenius ***J Anal. Chem.*** 370 (2001)679–689.
- [56] E. Desimoni, B. Brunetti, ***Accredit. Qual. Assur.*** 11(2006) 363-366.
- [57] W. Hinrichs, ***Accredit. Qua.l Assur.*** 15 (2010) 289-296.
- [58] E. Desimoni, B. Brunetti, ***Anal. Bioanal. Chem.*** 400 (2011)129-1741.
- [59] W. Bremser (2006) ***Materiales de Referencia y Comparaciones Interlaboratorios***. MA Leiva-Guzmán (Edit.) Fundación Centro Nacional del Medio Ambiente-CENMA. Universidad de Chile. Santiago. ISBN: 956-310-435-8.
- [60] I. Taverniers, E. Van Bockstaele, M. De Loose, ***Trends Anal. Chem.*** 23 (2004) 490-500.
- [61] J. Moser, W. Wegscheider, C. Sperka-Gottlieb, ***Fresenius J Anal. Chem.*** 370 (2001) 679-689.

- [62] M. Buzoianu (2003) **Measurement Uncertainty in Chemical Analysis**, (P De Bievre, H Gunzler edit.) Springer Science & Business Media, ISBN 3540439900, 283 pág.
- [63] Ph. Quevauviller, **Trends Anal. Chem.** 23 (2004) 171–177.
- [64] T. Näykki, B. Magnusson, I. Helm, L. Jalukse, T. Väisänen, I. Leito, **J. Chem. Metrol.** 8 (2014) 1-12.
- [65] M. Ramsey, A. Argyraki, S. Squire (1998). **Conference Proceedings of Contaminated Soil'98, Volume 1**, Thomas Telford Publishing Ltd, ISBN 0-7277-2675-7. London. Pag 221-230.
- [66] E. Saari, P. Peramaki, J. Jalonen, **Chemomet. Intell. Lab. Syst.** 92 (2008) 3-12.
- [67] P.D. Taylor, M.H. Ramsey, P.J. Potts, **Environm. Sci. Technol.** 38 (2004) 6824-6831.
- [68] U. S. Code of Federal Regulations, **Title 40, Part 58, Subpart G, Appendix A**, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 2014.
- [69] European Commission, **Directive 2008/50/EEC of 21 May 2008**, Off. J. European Communities L152 (2008) 1-44.
- [70] Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial del Gobierno de Colombia. **Protocolo para el Monitoreo y Seguimiento de la Calidad del Aire**. Bogotá. (2008) 287 páginas.
- [71] U.S. Environmental Protection Agency. **Quality Assurance Handbook for Air Pollution Measurement Systems Volume II. EPA-454/B-08-003**. RTP, NC 27711. (2008) 309 páginas.
- [72] P. De Bievre, **Chem. Internat.** 34 (2012) 26-27.

Capítulo II

Cuantificación de la incertidumbre empleando la información obtenida en ensayos de aptitud. Caso estudiado: Determinación de mercurio en efluentes líquidos con la participación de un número limitado de laboratorios

1. Introducción

Muchas de las decisiones tomadas en la gestión ambiental derivan del análisis de la información obtenida a partir de monitoreos rutinarios de control, tanto externos como internos. La interpretación correcta de los resultados analíticos requiere conocimientos acerca de la calidad de los mismos, especialmente con respecto a la incertidumbre de la medición [1]. Por lo tanto, con el fin de lograr la calidad requerida en estos resultados, es necesario aplicar los principios del aseguramiento de la calidad (QA) y el control de calidad (QC) [2,3].

Estos sistemas de control de calidad deberían incluir, entre otros requerimientos, la verificación de la trazabilidad o al menos una evaluación cuantitativa sostenida del sesgo, con el fin de garantizar la comparabilidad de los resultados a lo largo del tiempo. En la práctica, es difícil demostrar la trazabilidad de medidas ambientales en matrices complejas como suelos, sedimentos, aguas o barros residuales. Una práctica común en los laboratorios analíticos es usar materiales de referencia certificados (MRC), sustancias puras o estándares documentados para verificar la trazabilidad o al menos la evaluación de la veracidad [4]. Sin embargo, cuando no se dispone de MRC y el uso de patrones puros de calibración no es apropiado porque la matriz de la muestra es muy compleja, es posible evaluar el desempeño de los laboratorios analíticos y calcular las incertidumbres de medición usando la información obtenida mediante ejercicios interlaboratorios [5].

Si se considera el caso particular de determinación de mercurio en matrices tales como efluente de aguas residuales en el proceso de producción

de cloro-álcali, no es posible obtener en el mercado MRC. Es importante mencionar que el mercurio es uno de los metales pesados que se encuentra regulado en la legislación ambiental internacional, nacional y regional. [6-8]. Es uno de los contaminantes descargados en el estuario de Bahía Blanca que está más sometido a controles oficiales. Por esta razón, es necesario poder demostrar la calidad de los resultados obtenidos en la determinación de este analito en muestras como la mencionada anteriormente. Además, es muy importante conocer el valor de la incertidumbre de la medición de esos resultados, para mejorar las bases científicas de la gestión de decisiones.

En este estudio, se desarrolla un ensayo de aptitud interlaboratorios (“proficiency test”, PT) para investigar la competencia técnica de los laboratorios participantes en un ejercicio colaborativo y la comparación metrológica de los resultados obtenidos. Para llevar a cabo este ensayo, se preparan en el laboratorio dos materiales de referencia “(in house reference materials”, IHRMs) de aguas residuales industriales conteniendo mercurio. Estos IHRMs son realizados por el Laboratorio Acreditado del Comité Técnico Ejecutivo (CTE), que es la oficina gubernamental dedicada a la protección ambiental en el área del Complejo Petroquímico de Bahía Blanca [9]. Se verifica la homogeneidad de este material de referencia, de acuerdo al procedimiento descrito por Fearn and Thompson [10] y el International Harmonized Protocol [11]. La estabilidad de este material también es comprobada, teniendo en cuenta que los análisis comienzan inmediatamente después de la preparación de la muestra. El pequeño número de participantes en este ejercicio interlaboratorio es otro factor limitante [12,13]. En la región de Bahía Blanca hay sólo seis laboratorios en condiciones de llevar a cabo esta

determinación de mercurio como tarea de rutina. En la literatura no se han encontrado estudios realizados en el escenario restringido de trabajo presentado, es decir un número limitado de laboratorios participantes evaluando más de un nivel de concentración del analito en las muestras.

De acuerdo a lo mencionado, se propone realizar un estudio que incluye:

- Evaluación de la comparación metrológica de los resultados.
- Evaluación individual y global del desempeño de los laboratorios participantes.
- Determinación de la incertidumbre de medición usando la información obtenida de aplicar el sistema PT diseñado, es decir
 - a) Sin contar con un MRC
 - b) Número limitado de participantes
 - c) Determinación analítica compleja.
 - d) Materiales con diferentes niveles de concentración ("split-level").

2. Parte experimental

2.1. Organización del PT

El ejercicio es organizado por el CTE del Municipio de Bahía Blanca, en conjunto con laboratorios privados, laboratorios de investigación e investigadores de la UNS. El coordinador del PT es responsable de: diseñar el sistema, muestrear el material para preparar los IHRMs, preparar y validar los IHRMs, desarrollar y distribuir simultáneamente las instrucciones y los IHRMs entre los laboratorios participantes, recolectar los datos obtenidos y realizar el análisis estadístico correspondiente.

Cabe aclarar que los IHRMs deben ser materiales idénticos, en cuanto a la composición de la matriz y la concentración de analito, a aquellos que se analizan rutinariamente en los laboratorios propios y de terceros.

El esquema PT se realiza combinando los criterios y directrices de la Guía de IUPAC/CITAC [6], de la ISO 5725 [14], de la Guía de la AOAC [15] y de la Norma ASTM E619 [16]. El mismo se prepara teniendo en cuenta la no disponibilidad de MRC (ni estándares primarios, ni secundarios), el número limitado de participantes y los diferentes niveles de concentración de Hg. Además, los laboratorios participantes deben emplear el método analítico oficial consistente con sus prácticas de rutina normales y deben acreditar resultados satisfactorios en ensayos de aptitud para la determinación de mercurio en aguas naturales.

2.2. Descripción y colección de los IHRMs

Todos los laboratorios participantes en el PT deben analizar cada uno de los IHRMs. Estos son preparados a partir del material muestreado directamente de dos efluentes diferentes del proceso de cloro-álcali que contienen residuos de mercurio en baja y alta concentración, es decir, se dispondrá de dos grupos de IHRMs: el de baja concentración de Hg y el de alta concentración de Hg.

El procedimiento para el muestreo y envasado de cada material se realiza de acuerdo a los estándares internacionales [17]. El coordinador del PT establece que todos los análisis se deben realizar dentro de las 24 horas porque la estabilidad de este tipo de muestras es muy importante. Las características fisicoquímicas de este complejo material se muestran en el Tabla 1.

Tabla 1: Características fisicoquímicas de aguas de desechos

Parámetro	Unidades	Intervalo	Número de análisis
pH		6-12	162
Conductividad	$\mu\text{S cm}^{-1}$	5000-60000	139
Turbidez	NTU	13-500	109
Temperatura	$^{\circ}\text{C}$	20-43	137
Sólidos totales	mg L^{-1}	1600-30000	109
Sólidos sedimentables (10 min)	mL L^{-1}	0,1-200	157
Sólidos sedimentables (2 h)	mL L^{-1}	0,1-100	153
Demanda química de oxígeno	mg L^{-1}	20-900	115
Hidrocarburos totales	mg L^{-1}	0,1-30	36
Cloruro	mg L^{-1}	1300	53
Plomo total	mg L^{-1}	0,003-0,007	45
Cadmio total	mg L^{-1}	0,0006-0,007	47
Mercurio total	mg L^{-1}	0,0001-0,0374	118

2.2.1. Muestra 1: (LL-IHRM)

Esta muestra proviene de la descarga del efluente industrial en el estuario de Bahía Blanca. Este efluente es monitoreado continuamente y auditado para verificar que el contenido de Hg total esté por debajo del máximo permitido ($0,0050 \text{ mg L}^{-1}$). El valor típico obtenido es aproximadamente $0,0015 \text{ mg L}^{-1}$.

Se colectan alrededor de 10 L de este material en envases de polietileno acondicionados adecuadamente e inmediatamente se transportan al laboratorio. El paso de acondicionamiento incluye un lavado con una solución de ácido nítrico al 2% v/v y subsecuentes lavados con la muestra.

2.2.2. Muestra 2: (HL-IHRM)

Este material corresponde a un efluente intermedio del mismo proceso industrial mencionado en el ítem anterior, con concentraciones de Hg total de $0,0050 \text{ mg L}^{-1}$. El coordinador del PT colecta nuevamente 10 L de esta muestra aplicando el mismo protocolo que para la muestra 1.

2.3. Preparación de los IHRMs

La preparación de las muestras es un paso fundamental y crítico en el PT [18]. La homogenización y el sub-muestreo de las Muestras 1 y 2 se realizan estrictamente de manera tal de asegurar que todos los laboratorios participantes analizarán idénticas sub-muestras.

Cinco porciones de 200 mL de la Muestra 1, mezcladas vigorosamente, son secuencialmente transferidas a botellas de 1 L, acondicionadas

previamente e inmediatamente selladas. Así, se obtiene cada sub-muestra final. De la misma forma se procede con la Muestra 2. Por último, estas botellas son etiquetadas y distribuidas entre los laboratorios participantes, poniendo énfasis en la importancia de una completa homogenización de cada IHRM, previa a la ejecución de la determinación de Hg total.

2.4. Evaluación de la homogeneidad de las muestras

Para comprobar la homogeneidad de los IHRMs respecto del contenido de Hg total, es necesario que el método utilizado posea una alta precisión analítica: $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ para la Muestra 1, de menor nivel de concentración, y $0,0002 \text{ mg L}^{-1}$ para la Muestra 2. Este estudio se lleva a cabo enviando tres sub-muestras de cada IHRM, tomadas al azar, a un laboratorio externo. Los análisis se realizan siguiendo la aproximación propuesta por Fearn y Thompson [10], por triplicado en lugar de por duplicado, aplicando el método SM 3112B [17]. Posteriormente, se aplican tres test rápidos para calcular los parámetros estadísticos de homogeneidad, que se comparan con los correspondientes valores críticos. Los test son: a) Criterio de Cochran, para comprobar homocedasticidad y detectar puntos discrepantes (“outliers”); b) Cálculo de la desviación estándar analítica y c) Test de homogeneidad, calculando la desviación estándar entre muestras. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2 y como en todos los casos los valores críticos son mayores que los valores calculados, se concluye que ambos IHRMs son suficientemente homogéneos.

Tabla 2: Comparación de resultados obtenidos para la comprobación de homogeneidad

IHRM	Test	Valores calculados	Valores críticos
Muestra 1 (LL)	Criterio de Cochran	0,176	0,871
	Desviación estándar analítica	0,137	0,167
	Homogeneidad	0,018	0,110
Muestra 2 (HL)	Criterio de Cochran	0,382	0,871
	Desviación estándar analítica	0,199	0,221
	Homogeneidad	0,041	0,223

2.5. Evaluación de la estabilidad de las muestras

Para determinar si las Muestras 1 y 2 son adecuadas como materiales de referencia, es necesario verificar la estabilidad del contenido de Hg total en ambas. Para ello, como las muestras se almacenan durante 72 h a $6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, se procede a determinar Hg total en cuatro períodos diferentes de almacenamiento: antes de ser guardadas, luego de 24 h y 48 h de almacenadas y a las 72 h de guardadas. Las muestras son analizadas por duplicado usando el mismo procedimiento que se lleva cabo para el estudio de homogeneidad. Se utiliza un test t, con un nivel de confianza del 95%, para analizar los resultados [19]. Mediante el análisis de los valores obtenidos para ambos IHRMs, se puede afirmar que no hay efectos estadísticamente significativos cuando el periodo de almacenaje de las muestras es de 24 y 48 h. Sin embargo, los resultados obtenidos luego de las 72 h de almacenamiento demuestran falta de estabilidad de las muestras. Por lo tanto, y de acuerdo a estos resultados, se concluye que no se puede demostrar falta de estabilidad del material estudiado dentro de las 48 h de almacenamiento y la contribución

de incertidumbre debida a la posible inestabilidad de las muestras durante este período del PT se considera despreciable.

2.6. Determinación de Hg total

Todos los laboratorios participantes analizan las muestras por triplicado, usando el método de referencia SM 3112B [17], que es el establecido en regulaciones ambientales internacionales y regionales [6,8].

2.7. Tratamiento de los datos

En una primera instancia se realiza una serie de pruebas estadísticas para evaluar puntos discrepantes entre los resultados que se analizan, dentro de cada laboratorio y entre laboratorios. Para esto, se usa la metodología recomendada internacionalmente: a) Metodología ISO 5725-5 para evaluar consistencia entre laboratorios y dentro del mismo laboratorio y para establecer el valor asignado para cada IHRM (la mejor estimación del valor verdadero del mesurando en el PT planteado) con sus correspondientes incertidumbres [20,21], b) Criterio de Cochran para verificar la homogeneidad de las varianzas, c) Tests de Grubb's (simple y doble) para investigar los puntos discrepantes en los promedios de los resultados de cada laboratorio.

Luego, debido al limitado número de laboratorios participantes, se aplica estadística más robusta para contrastar los resultados obtenidos a partir de la estadística paramétrica (z-scores modificado, test de Huber modificado y test de MAD) [22]. Por último, la evaluación de competencia se realiza utilizando los

z-scores y la metodología de los gráficos de Youden generalizados, diseñados para dos niveles no uniformes [23,24].

2.7.1. Establecimiento del valor asignado (X_a) para los IHRMs

Existen varias posibilidades para seleccionar el valor asignado X_a . Debido a la ausencia o falta de material de referencia y de ensayos acreditados y a la alta complejidad de la matriz, que imposibilita la formulación de la calidad del material de referencia, la trazabilidad de la determinación de Hg total en aguas residuales no es fácil de verificar. El coordinador del PT debe decidir cuál es la manera más adecuada para resolver este problema. Generalmente, se toma como valor asignado, al valor consensuado de los informados por los laboratorios participantes [25]. Por lo tanto, el valor asignado X_a para ambos IHRMs se establece evaluando los resultados de los laboratorios participantes usando el algoritmo descrito en la ISO 5725-5 y la media aritmética.

2.7.2. Estimación de la incertidumbre de los IHRMs

La incertidumbre estándar de cada IHRM se calcula como la desviación estándar de cada valor asignado, teniendo en cuenta el efecto del limitado número de participantes del PT ($N_p=6$).

$$\mu_a = S_a \left[\sqrt{\frac{N_p - n}{nN_p}} \right] \quad (1)$$

donde, S_a es la desviación estándar del valor asignado X_a y n es el número de laboratorios participantes.

2.7.3. Evaluación del desempeño de cada laboratorio individual

Para este propósito, se calculan los z-scores para cada IHRM, de acuerdo a la siguiente ecuación, después de verificar $\mu_a^2 < 0,1\rho_p^2$;

$$z = \frac{(x_i - X_a)}{\rho_p} \quad (2)$$

donde, x_i es el valor generado por el laboratorio, X_a es el valor asignado por el coordinador del PT y ρ_p es el valor aceptable de la desviación estándar del valor asignado [25]. Los límites aceptados para los z-scores son:

z-score = 0, resultado perfecto

z-score $\leq \pm 2$, resultado aceptable o satisfactorio, no se requiere acción alguna.

$\pm 2 < z\text{-score} \leq \pm 3$, resultado dudoso o cuestionable, es requerida una acción preventiva.

z-score $> \pm 3$, resultado no aceptable o insatisfactorio, es necesario una acción correctiva.

Por otro lado, para seleccionar ρ_p el coordinador del PT hace uso de tres fuentes de información reconocidas de la precisión interlaboratorio para esta determinación analítica específica (Tabla 3). Como se puede apreciar en la Tabla 3, la ecuación de Horwitz da valores similares a los obtenidos cuando se usa el método EPA, por lo que para la Muestra 1-IHRM (LL; $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$) se selecciona un valor de RSD de 0,45 ($\rho_{LL} = 0,7 \mu\text{g L}^{-1}$) y para la Muestra 2-IHRM (HL; $5,5 \mu\text{g L}^{-1}$) se selecciona un RSD = 0,44 ($\rho_{HL} = 1,5 \mu\text{g L}^{-1}$), para los posteriores cálculos de los z-score.

Tabla 3: Datos y fuentes consultadas para seleccionar valores de ρ_p

Fuente	Nivel de concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Desviación estándar relativa (%)	Referencias
Método estándar 3112B	0,34	22,6	[17]
	4,2	13,3	
Método EPA 245.1	0,60	55	[26]
	3.4	44	
Horwitz SD	0,60	49	[27,28]
	1,5	45	
	3,5	38	

2.7.4. Evaluación de la compatibilidad metrológica de los resultados

La compatibilidad metrológica se considera satisfactoria si el sesgo (“bias”) excede al valor de μ_a sólo en un valor que es insignificante, comparado con los errores aleatorios del interlaboratorio, es decir que la hipótesis nula que se establece es:

$$H_0 = |x_i - X_a| \leq \left[\mu_a^2 + (0,3\rho_p)^2 \right]^{0,5} = \text{bias crítico} \quad (3)$$

Todos los resultados individuales x_i son contrastados con el valor crítico del “bias”, calculado de acuerdo a la Guía IUPAC/CITAC [6].

2.7.5. Gráfico de Youden

En el presente PT, los IHRMs no son iguales en cuanto a la concentración total de Hg, por lo que los supuestos fundamentales del trabajo original de Youden [29] no se cumplen. En estos casos, es más apropiado emplear el procedimiento propuesto por Mandel y Lashof [23]. La elipse de

confianza ($\alpha=0,05$) para el gráfico para dos muestras se expresa en términos de la distribución T^2 de Hotelling [24]:

$$\begin{aligned} & [x_1 - X_{a(Muestra\ 1-LL)}]^2 - 2r_s[x_1 - X_{a(Muestra\ 1-LL)}][x_2 - X_{a(Muestra\ 2-HL)}] + \\ & [x_2 - X_{a(Muestra\ 2-HL)}]^2 = (1 - r_s^2)T^2 \end{aligned} \quad (4)$$

donde r_s es el coeficiente de correlación de Spearman, que es seleccionado porque es menos sensible a la falta de normalidad de los datos y T^2 tiene la siguiente distribución:

$$\frac{2(n-1)}{(n-2)} F_{(0,05;2,n-2)} = 25,47 \quad (5)$$

2.7.6. Evaluación de la incertidumbre expandida para cada laboratorio individual

La incertidumbre expandida U_i para cada laboratorio participante se calcula con un factor de cobertura $k = 2$, aplicando la metodología recomendada y propuesta por el Nordest Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories [30]. Estas estimaciones se realizan utilizando la información de repetitividad presentada por cada laboratorio en términos de incertidumbres estándares (μ_i), las contribuciones al “bias” y las incertidumbres estándares correspondientes a cada IHRM (μ_a), esto es:

$$U_i = k * \sqrt{\mu_i^2 + \mu_{bias}^2} = 2 * \sqrt{\mu_i^2 + bias_i^2 + \mu_a^2} \quad (6)$$

siendo $bias_i = (x_i - X_a)$.

La incertidumbre expandida relativa, U_i/x_i , también es calculada para estudiar la variabilidad entre materiales.

3. Resultados y discusiones

3.1. Resultados individuales

Los valores experimentales informados por todos los laboratorios participantes (83% de la población) se muestran en la Figura 1, expresados como $x_i \pm s_i$ ($\mu\text{g Hg L}^{-1}$). La variabilidad dentro de cada laboratorio, expresada en términos de desviación estándar relativa en cuanto a la repetitividad (RSD_r) es aceptable, sólo un laboratorio informó un valor con RSD_r mayor al 10% para la Muestra 1 (LL)-IHRM.

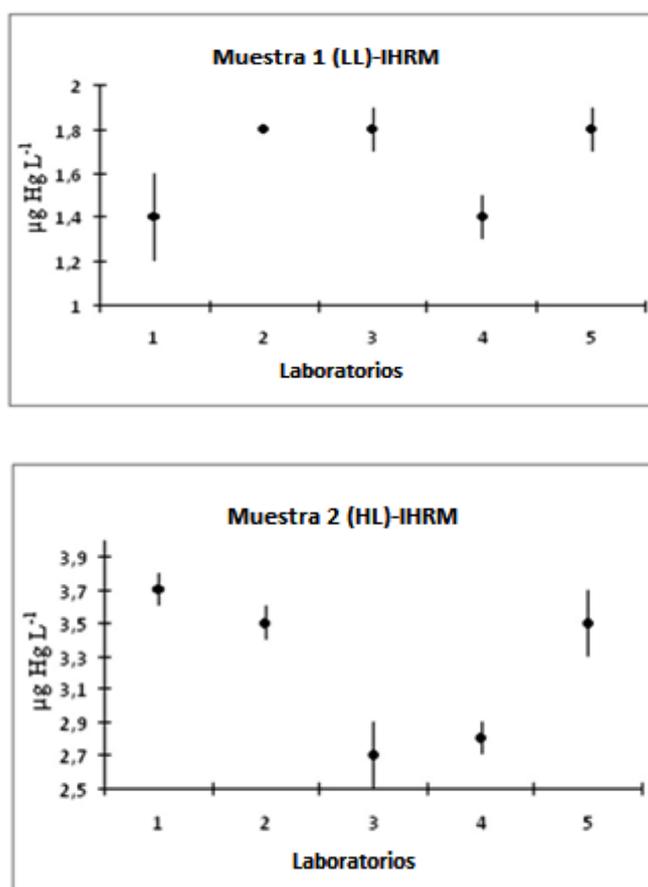


Figura 1: Resultados de los distintos participantes para las Muestras 1 y 2.

3.2. Evaluación de los resultados obtenidos para cada IHRM

3.2.1. Estudio de consistencia de los datos

La Norma ISO 5725-2 y la ASTM E 691 describen técnicas gráficas útiles para evaluar visualmente la consistencia de los resultados y ambas organizaciones recomiendan usar los estadísticos k y h de Mandel. Estos estadísticos también se pueden emplear para evaluar la calidad del desempeño de los laboratorios en estudios interlaboratorios [21]. Los estadísticos k y h de Mandel indican la consistencia dentro y entre laboratorios, respectivamente, y se calculan usando las siguientes ecuaciones:

$$k_i = \frac{s_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n s_i^2/n}} \quad \text{y} \quad h_i = \frac{x_i - \bar{x}}{(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2)^{1/2} \sqrt{1/(n-1)}} \quad (7)$$

donde \bar{X} es la media aritmética global de los promedios de los laboratorios individuales, x_i .

La Figura 2 muestra los resultados de k y h con sus correspondientes valores críticos, a dos niveles de significación, 1% y 5%. Estos valores críticos se determinan de acuerdo a las Normas ISO y ASTM mencionadas anteriormente.

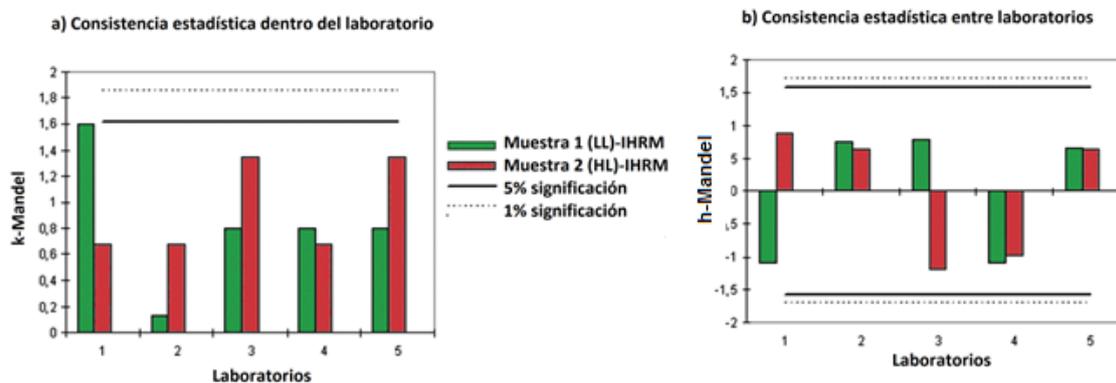


Figura 2: Valores de los estadísticos k (a) y h (b) para cada participante y cada IHRM

Se observa que todos los datos son consistentes. En la Figura 2 a) se ve que el Laboratorio 1 posee un gran valor de k , pero sólo para la Muestra 1(LL)-IHRM. Esto indica una potencial falta de precisión dentro del Laboratorio 1 a esos bajos niveles de concentración de Hg. Además, el Laboratorio 2 presenta los valores de k más bajos para ambos niveles de concentración de Hg, indicando la mejor precisión dentro del Laboratorio. Por otro lado, en los gráficos h se observa un patrón general que indica que la mayoría de los laboratorios (80%) tiende a informar resultados mayores, sin embargo, la variabilidad entre laboratorios es más consistente que la que hay dentro de los laboratorios ($\alpha = 0,20$ contra $\alpha = 0,05$).

3.2.2. Homogeneidad de varianzas y evaluación de puntos discrepantes (“outliers”).

Los resultados de los tests paramétricos y la estadística robusta aplicados para estos cálculos, se muestran en la Tabla 4.

En este contexto, los puntos discrepantes deberían ser eliminados a un nivel del 1%, a menos que haya una razón de peso para mantenerlo en el estudio [14, 20]. Los valores críticos son calculados a un nivel de significación del 1% y no se rechaza ningún valor, como se puede observar en la Tabla 4.

Tabla 4: Resultados obtenidos aplicando estadística paramétrica y robusta

IHRM	Lab. (<i>i</i> =)	Estadística paramétrica			Estadística robusta		
		<i>Grubbs simple</i>	<i>Grubbs doble</i>	<i>Cochran</i>	<i>z-score modific.</i>	<i>Test de Huber modific.</i>	<i>Test MAD modific.</i>
Muestra 1 (LL)	1	1,09	0,0022	0,57	0,69	1,03	1,20
	2	0,75	-	0,03	0,54	0,80	0,90
	3	0,79	-	0,14	0,57	0,84	1,00
	4	1,09	0,0022	0,14	0,69	1,03	1,20
	5	0,66	-	0,14	0,48	0,71	0,80
	Valor crítico	1,76	0,0018	0,79	3,50	1,50	5,00
	V. rechazados	0	0	0	0	0	0
Muestra 2 (HL)	1	0,88	-	0,09	0,63	0,94	1,10
	2	0,65	-	0,09	0,48	0,71	0,80
	3	1,20	0,0089	0,36	0,78	1,15	1,30
	4	0,97	0,0089	0,09	0,62	0,92	1,10
	5	0,65	-	0,09	0,48	0,71	0,80
	Valor crítico	1,76	0,0018	0,79	3,50	1,50	5,00
	V. rechazados	0	0	0	0	0	0

3.2.3 Valor asignado e incertidumbre asociada

La hipótesis nula del test de Shapiro-Wilk [31] no se rechaza, por lo tanto se asume que los datos poseen distribución normal. Se verifica también la homogeneidad de varianzas. Así, el valor asignado X_a y el respectivo valor de varianza S_a^2 para los IHRMs, pueden ser calculados como los promedios de los resultados de la Muestra 1 (LL) y la Muestra 2 (HL) y la varianza bajo condiciones de reproducibilidad. También se calculan la media y la desviación

estándar a partir de los algoritmos robustos A y S incluidos en la ISO 5725-5, para corroborar los obtenidos anteriormente. Las incertidumbres estándares se calculan de acuerdo a la Ec. 1, empleando la desviación estándar y la desviación estándar robusta. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Resultados de los estimadores paramétricos y robustos e intervalos de confianza para cada muestra ($\mu\text{g Hg L}^{-1}$)

IHRM	Promedio	Media robusta	DS*	DS* robusta	μ	μ robusta	$X_a \pm U_a$
Muestra 1 (LL)	1,6	1,8	0,3	0,2	0,04	0,04	$1,6 \pm 0,1$
Muestra 2 (HL)	3,2	3,4	0,4	0,3	0,08	0,08	$3,2 \pm 0,2$

* Desviación estándar

Analizando los datos de la Tabla 5, los valores de las incertidumbres estándares calculados a partir de ambas desviaciones estándares son idénticos. Por otra parte, las medias y las desviaciones estándares son muy similares para ambas metodologías. Por estas razones, se selecciona el valor promedio como valor asignado X_a para cada IHRM y sus incertidumbres expandidas U_a ($k=2$) son $0,1$ y $0,2 \mu\text{g Hg L}^{-1}$ para la Muestra 1 (LL) y la Muestra 2 (HL), respectivamente.

3.2.4. Evaluación de la compatibilidad metrológica

De acuerdo a la Ec. 3, los valores críticos de “bias” son: $0,21 \mu\text{g Hg L}^{-1}$ y $0,47 \mu\text{g Hg L}^{-1}$ para el bajo y alto nivel de concentración de los IHRMs, respectivamente. Como se observa en la Figura 1, ninguno de los valores de x_i excede el valor máximo permitido de “bias” y por lo tanto no se rechaza H_o ($\alpha =$

0,05). Así se demuestra la compatibilidad metrológica para cada IHRM.

3.3. Estudios del desempeño de los laboratorios

3.3.1. Comparación de los z-scores

Los z- scores son calculados usando la Ec. 2 y se muestran en la Figura 3. Como se puede observar, todos los valores informados por los laboratorios participantes son satisfactorios ($z < \pm 0,5$) y la performance es similar para cada IHRM. También se observa que, aparentemente el 60% de los participantes tiende a sobrestimar los resultados. Además, la suma de cuadrados de los scores (SSZ) [24] para cada laboratorio es menor que el valor crítico ($\chi^2 = 0$). Esto indica que el desempeño global de los laboratorios es muy bueno.

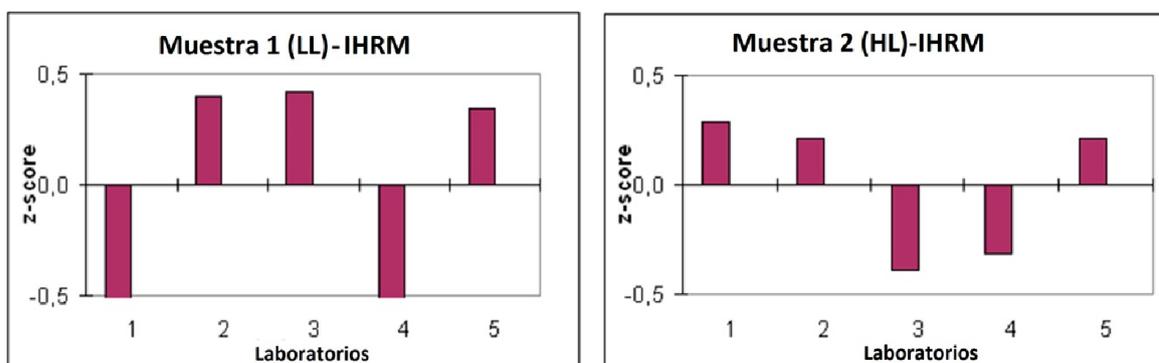


Figura 3: z-scores de cada participante para cada IHRM

3.3.2. Gráfico de Youden

La elipse de confianza (Figura 4) calculada con la Ec. 4 muestra que los resultados de los cinco laboratorios participantes están incluidos en la elipse. Por lo tanto, como todos los laboratorios aplican el mismo método, no existen diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) entre laboratorios.

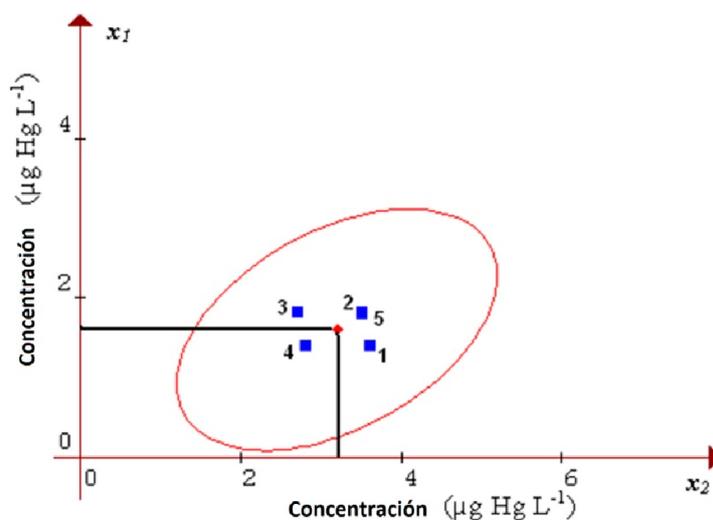


Figura 4: Elipse de confianza (95%). X_1 y X_2 son las concentraciones de las Muestras 1 (LL)-IHRM y 2 (HL)-IHRM respectivamente.

3.3.3. Evaluación de la incertidumbre expandida para cada laboratorio individual

De acuerdo a la Ec. 6, la incertidumbre expandida y la incertidumbre expandida relativa se calculan para cada laboratorio participante. En la Tabla 6 se muestran los resultados y los intervalos de confianza (95%) para cada laboratorio y cada IHRM ($x_i \pm U_i$). Además, no hay evidencias de que existan diferencias estadísticamente significativas entre todos los valores de U_i/x_i cuando se aplica un test de ANOVA de dos factores; el H_0 (laboratorios) y el H_0 (IHRMs) no se rechazan ($\alpha = 0,05$). Esto es un significativo hallazgo, ya que todos los laboratorios aplicaron el mismo método analítico y las incertidumbres expandidas relativas se uniformaron independientemente de los niveles de concentración de los IHRMs.

Tabla 6: Incertidumbres expandidas para cada laboratorio

IHRM	("Bias") ² (µgL ⁻¹) ²	μ _a ² (µgL ⁻¹) ²	μ _i ² (µgL ⁻¹) ²	U _i (µgL ⁻¹)	x _i ± U _i (µgL ⁻¹)	U _i /x _i
Muestra 1 (LL)	0,040	0,002	0,040	0,6	1,4±0,6	0,4
	0,048	0,002	0,000	0,4	1,8±0,4	0,2
	0,053	0,002	0,010	0,5	1,8±0,5	0,3
	0,040	0,002	0,010	0,5	1,4±0,5	0,3
	0,040	0,002	0,010	0,5	1,8±0,5	0,3
Muestra 2 (HL)	0,160	0,006	0,010	0,8	3,6±0,8	0,2
	0,090	0,006	0,010	0,7	3,5±0,7	0,2
	0,250	0,006	0,040	1,1	2,7±1,1	0,4
	0,160	0,006	0,010	0,8	2,8±0,8	0,3
	0,090	0,006	0,040	0,7	3,5±0,7	0,2

Así, la incertidumbre expandida relativa se puede considerar como:

$$\frac{\bar{U}(x)}{x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{10} \left(\frac{U_i}{x_i} \right)^2}{10}} = 0,3 \quad (8)$$

Este valor es igual al obtenido usando la información de la desviación estándar, bajo condiciones de reproducibilidad, calculada para cada IHRM. A partir de los datos de la Tabla 5, la raíz cuadrada de los cuadrados medios de la desviación estándar relativa se calcula:

$$\frac{\bar{U}(x)}{x} = \sqrt{\frac{\left(\frac{S_{R(LL)}}{x_{(LL)}} \right)^2 + \left(\frac{S_{R(HL)}}{x_{(HL)}} \right)^2}{2}} = 0,3 \quad (9)$$

Estas dos aproximaciones arrojan valores idénticos de incertidumbre expandida relativa ($\alpha = 0,05$). Por todas estas afirmaciones, se puede pensar que la distribución para $U(x)/x$ versus x es rectangular.

4. Conclusiones

- Se desarrolla, organiza y conduce un PT para matrices complejas de rutina, como aguas residuales, para un número limitado de participantes, aplicando un método analítico no tan simple. El interés en este PT es muy alto, debido a la no disponibilidad de materiales de referencias certificados (estándares de medida primarios o secundarios) y el muy bajo número de laboratorios analíticos con posibilidades de participar en este PT.
- Se preparan en el laboratorio dos materiales de referencia a partir de muestras reales de aguas residuales (IHRMs), con dos niveles diferentes de concentración, que son estudiados como potenciales materiales de referencia certificados. Se demuestra que los dos materiales preparados poseen adecuada homogeneidad, estabilidad y además son apropiados para ser usados como materiales de control de calidad en ensayos de aptitud.
- Los laboratorios participantes del estudio informaron los resultados analíticos del contenido de mercurio total en cada muestra de prueba, utilizando todos el método oficial internacional, SM 3112B. La evaluación de competencia individual es satisfactoria para todos los laboratorios y se alcanza una exitosa relación de consistencia (100%).
- Las evaluaciones estadísticas realizadas sobre el PT aplicado proporcionan información útil para el cálculo de la incertidumbre asociada de los valores asignados para cada IHRM y, la incertidumbre asociada para los resultados analíticos individuales de los participantes. La incertidumbre expandida relativa es estadísticamente igual para ambas fuentes de variación:

laboratorios e IHRMs, esto es una muy buena información para tomar decisiones. Trabajando con otros niveles de concentración debería realizarse un estudio similar.

- La cuantificación de la incertidumbre expandida para cualquier nivel de concentración, dentro del ámbito estudiado, es muy simple, considerando una distribución rectangular para $U(x)/x$. Sólo es necesario multiplicar el valor de concentración obtenida por el valor de la incertidumbre expandida relativa calculada.

Bibliografía

- [1] P. Dehouck, Y. Vander Heyden, J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart, J. Crommen, Ph. Hubert, R.D. Marini, O.S.N.M. Smeets, G. Decristoforo, W. Van de Wauw, J. De Beer, M.G. Quaglia, C. Stella, J.-L. Veuthey, O. Estevenon, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *Anal. Chim. Acta* 481 (2003) 261–272.
- [2] Ph. Quevauviller, *Quality Assurance in Environmental Monitoring: Sampling and Sample Pretreatment*, John Wiley & Sons Inc., Weinheim, Germany, 2008, pp.1–24.
- [3] Ph. Quevauviller, O.F.X. Donard, *Trends Anal. Chem* 20 (2001) 600–613.
- [4] Ph. Quevauviller, *Trends Anal. Chem* 23 (2004) 171–177.
- [5] R. Companyo ´, R. Rubio, A. Sahuquillo, R. Boque ´, A. Maroto, J. Riu, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 1497–1505.
- [6] *U. S. Code of Federal Regulations*, Title 40, Part 415, Subpart F, Section 415.66, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 2012.
- [7] European Commission, Directive 84/156/EEC of 8 March 1984, Off. *J. European Communities* L74 (1984), 49–54.
- [8] *Resolución No 336/03 de la Autoridad del Agua, Boletín Oficial de la Provincia de Buenos Aires No 24835*, La Plata, Argentina, 2003.
- [9] *Ley No 12530, Programa Especial para la Preservación y Optimización de la Calidad Ambiental*, Congreso de la Provincia de Buenos Aires, Boletín Oficial de la Provincia de Buenos Aires No 24176 del 16 de noviembre de 2000, La Plata, Argentina, 2000.
- [10] T. Fearn, M. Thompson, *Analyst* 126 (2001) 1414–1417.

- [11] M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, ***Pure Appl. Chem.*** 78 (2006) 145–196.
- [12] I. Kuselman, A. Fajgelj, ***Pure Appl. Chem.*** 82 (2010) 1099–1135.
- [13] I. Pankratov, S. Elhanany, S. Henig, S. Zaritsky, I. Ostapenko, I. Kuselman, ***Accredit. Qual. Assur.*** 15 (2010) 459–466.
- [14] ISO, accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 5: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method. ***ISO 5725-5:1998 (E)***, *International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1998, pp. 1–56.*
- [15] Association of official analytical chemist (AOAC), (1995), ***J. AOAC Int.*** 78 143A–160A.
- [16] ASTM, Standard Practice for Conducting an Interlaboratory Study to Determine the Precision of a Test Method. E691-99, ***Annual Book of ASTM Standards***, vol. 14.02. American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA, USA 2004, pp. 1–22.
- [17] APHA-AWWA-WPCF, Standard Methods for the Examination of Wwater and Wastewater, 20th ed., ***American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Pollution Control Federation (WPCF)*** Washington, DC, 1999.
- [18] F. Raposo, M.A. de la Rubia, R. Borja, M. Alaiz, J. Beltrán, C. Cavinato, M. Clincksporr, G. Demirer, E. Diamadopoulos, B. Helmreich, P. Jenicek, N. Artí, R. Mendéz, J. Noguerol, F. Pereira, S. Picard, M. Torrijos, ***Talanta*** 80 (2009) 329–337.

- [19] B. Brookman, R. Walker, **Guidelines for the In-House Production of Reference Materials, Version 2, LGC VAM1998040**, LGC Publisher, Middlesex, UK, 1998 pp. 22–25.
- [20] E. Hund, D.L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, **Anal. Chim. Acta** 423 (2000) 145–165.
- [21] Y. Vander Heyden, J. Smeyers-Verbeke, **J. Chromatogr. A** 1158 (2007) 158–167.
- [22] J.N. Miller, J.C. Miller, **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**, 6th ed., Pearson Education Ltd, Gosport, UK, 2010, pp. 175-179.
- [23] J. Mandel, T.W. Lashof, **J. Qual. Technol.** 6 (1974) 22–36.
- [24] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A**, Elsevier, Amsterdam, NL, 1997, pp. 452–454.
- [25] M. Thompson, Ph.J. Lowthian, **Notes on Statistics and Data Quality for Analytical Chemists**, Imperial College Press, London, UK, 2011, pp.215–218.
- [26] USEPA, Determination of Mercury in Water by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry, **EPA Method 245.1, 3rd rev.**, United States Environmental Protection Agency, Ohio, PA 45268, 1997.
- [27] K.W. Boyer, W. Horwitz, R. Albert, **Anal. Chem.** 57 (1985) 454–459.
- [28] R. Albert, W. Horwitz, **Anal. Chem.** 79 (1997) 789–790.
- [29] W.J. Youden, **Int. Qual. Control** 15 (1959) 24–28.
- [30] B. Magnusson, T. N^o aykki, H. Hovind, M. Krysell, **Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories**, second ed., Nordtest Technical Report 537, Espoo, Finland, 2004.
- [31] S.S. Shapiro, M.B. Wilk, **Biometrika** 52 (1965) 591–611.

Capítulo III

Estimación de la incertidumbre de medición usando la información obtenida en la evaluación de la exactitud cuando se emplea un material de referencia preparado en el laboratorio (IHRM): Estudio de dos casos en la extracción de PAHs totales de barros residuales industriales.

1. Introducción

En el ámbito de la investigación y política ambiental, la gestión de residuos peligrosos es un tema predominante. Las propiedades fisicoquímicas de los barros residuales industriales deben ser investigadas en origen, antes de su disposición segura, con el fin de determinar la concordancia con regulaciones internacionales, nacionales y regionales [1-3]. Actualmente, estas regulaciones requieren estrictos controles analíticos y seguimiento periódico para algunos contaminantes peligrosos. Los hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAHs) son, además de los bifenilos policlorados y clorobencenos, una clase bien conocida de contaminantes orgánicos peligrosos prioritarios [4-5]. En este sentido, en muchos Estados miembros de la Comunidad Europea se limitó recientemente la concentración total de PAHs en barros residuales [6]. Por lo tanto, el cumplimiento de estas normas requiere la disponibilidad de datos confiables para la toma de decisiones, que implica que en los laboratorios de ensayo se apliquen métodos analíticos adecuados, con estimaciones de la incertidumbre bien establecidas.

La evaluación de la incertidumbre asociada con el proceso global de medición, debe ser estimada e informada con el fin de verificar si el método analítico es apto para dicho propósito y demostrar la calidad de sus resultados. Esto no sólo respalda la fiabilidad de los resultados analíticos de los laboratorios, sino que también evita que los usuarios finales de los datos extraigan conclusiones erróneas acerca del riesgo ambiental y la posible necesidad de remediación o eliminación de residuos.

Varios métodos espectroscópicos y no espectroscópicos se han desarrollado y estandarizado para el análisis de PAHs totales en suelo, sedimentos y materiales de desecho. La mayoría de éstos necesitan un paso de pretratamiento de muestra previo a la determinación analítica que incluye el sub-muestreo y la división de la muestra, para obtener la muestra de laboratorio, seguido de una etapa de procesamiento. El sub-muestreo está asociado con la homogenización y la división de la muestra para obtener la porción analítica para el laboratorio y el procesamiento de muestra involucra técnicas de extracción seguidas de un procedimiento de limpieza (“clean up”) de la misma. Estos pasos tienen asociados una incertidumbre que contribuye a la incertidumbre total de la medida del proceso analítico.

La literatura describe diferentes enfoques para llevar a cabo la evaluación de la incertidumbre de medición [7-10]. El propuesto por Maroto et al. [10] emplea la información generada en la evaluación de la exactitud de un determinado procedimiento analítico.

Una práctica común en los laboratorios analíticos es el uso de Materiales de Referencia Certificados (MRC), sustancias puras, o el empleo de normas estándares para evaluar la exactitud de sus resultados. Sin embargo, cuando no hay disponibilidad de MRC y el uso de sustancias puras de calibración no es apropiado debido a la complejidad de la matriz de la muestra, para evaluar la exactitud e incertidumbre de la medición es posible usar un material de referencia producido en el laboratorio (“in house reference materials: IHRMs”). Hay muy pocos trabajos científicos en la bibliografía relacionados con la producción de IHRMs. La Oficina Nacional de Medición del Gobierno del Reino Unido publicó un documento oficial que proporciona una guía para preparar

IHRMs, aunque el autor señala que este documento no contiene un conjunto completo de instrucciones [11].

Los objetivos de este trabajo incluyen:

- a) El desarrollo de un IHRM para el análisis total de PAHs en residuos sólidos, usando la matriz auténtica de las muestras de rutina.
- b) La evaluación del valor asignado y su incertidumbre asociada teniendo en cuenta el procedimiento de preparación y las contribuciones a la incertidumbre del IHRM, tanto de la homogeneidad como de la estabilidad del material.
- c) La evaluación de la aplicabilidad del IHRM para evaluar la exactitud y la incertidumbre de medición de los resultados obtenidos, utilizando un método de extracción de referencia y uno nuevo desarrollado en el laboratorio.
- d) La evaluación del balance de incertidumbre estimada del análisis de PAHs totales en muestras de residuos sólidos, teniendo en cuenta el procedimiento analítico, la componente de sesgo y las etapas de pretratamiento.
- e) La comparación de la incertidumbre estimada para los dos métodos de extracción utilizados.

2. Parte Experimental

2.1. Reactivos y soluciones

- ✓ Todos los reactivos químicos utilizados son de grado analítico y las soluciones se preparan con agua ultrapura Milli-Q.
- ✓ Solución estándar de criseno ($192,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ en cloruro de metileno).
- ✓ Polioxietilen-10 lauril éter (POLE, con pureza $\geq 99\%$), Triton® X-100 (pureza $\geq 99\%$) y dodecyl sulfato de sodio (SDS, pureza $\geq 95\%$).
- ✓ Criseno (pureza $> 95\%$).
- ✓ Solventes de grado espectrométrico: hexano, acetona y metanol.

2.2. Muestras

Para garantizar la representatividad de la matriz de las muestras de rutina, se colecta el barro residual auténtico del canal del efluente del Complejo Petroquímico de Bahía Blanca, Argentina, con un muestreador de acero inoxidable acondicionado. La muestra se tamiza para eliminar cuerpos extraños. Luego se coloca en un contenedor opaco de polipropileno previamente lavado con metanol. Inmediatamente se transfiere al laboratorio para tamizarla y mezclarla para lograr una homogeneización preliminar, y luego se deja sedimentar para eliminar la mayoría del agua ocluida [12]. Esta muestra húmeda se conserva a 4°C , en la oscuridad.

2.3. Producción del material de referencia, IHRM

2.3.1. Procedimiento de preparación

La muestra auténtica de barros se seca a temperatura ambiente durante 2 h, se homogeniza nuevamente y luego se seca durante 12 h a 80 °C [13-14]. Este material auténtico preacondicionado, en adelante PAM, es finalmente homogenizado a temperatura ambiente y conservado en la oscuridad a humedad constante.

Algunas sub-muestras de este PAM se usan para:

- a) Cuatro sub-muestras de PAM son analizadas según el método normalizado ASTM D3976-01 para determinar su contenido de humedad [12].
- b) Dos sub-muestras de PAM son analizadas en un laboratorio acreditado según la Norma ISO 17025, para determinar la concentración de PAHs, aplicando el Método 3541 recomendado por EPA (Extracción con Soxhlet) [15] y el Método 8310 (HPLC-UV), también recomendado por EPA [16]. Los certificados de cada análisis indicaron que ninguno de los 16 PAHs considerados prioritarios por EPA se detectó en las dos sub-muestras de PAM.
- c) Otra sub-muestra ($m_{PAM} = 121,0011$ g; base seca) se fortifica con criseno de grado analítico y se mantiene en reposo por un mes para permitir que el analito interaccione con la matriz de la muestra [17]. Se selecciona el criseno como analito de prueba porque se conocen muy bien sus propiedades ambientales y analíticas y porque es el analito que se utiliza para la calibración en los métodos de referencia y en varios trabajos de investigación publicados [13, 18-21]. El procedimiento de fortificación se lleva a cabo de acuerdo a lo descrito por Llompart *et al* [22]. Se prepara una suspensión (en adelante “slurry”) con la

sub-muestra de PAM y 200 mL de una solución de criseno ($0,96 \times 10^{-4}$ M) utilizando como solvente una mezcla de hexano-acetona (1:1). Se deja secar al aire, con ocasionales agitaciones a temperatura ambiente, durante 5 días. Luego se embotella y se almacena en lugar oscuro y seco a 4 °C. Tanto la masa de criseno ($m_{\text{criseno}} = 0,0044$ g, base seca) como la masa de la sub-muestra de PAM son medidas con una balanza analítica calibrada con dos pesas patrón: una de 0,002 g de valor nominal (Class E2-OIML) y otra de 100 g de valor nominal (Class 1-ANSI/ASTM E617).

2.3.2. Pruebas de aseguramiento de homogeneidad y estabilidad del IHRM

La homogeneidad del IHRM, con respecto al contenido total de PAHs, es calculada empleando el enfoque propuesto por Fearn and Thompson [23]. Los análisis del IHRM se hacen en 3 series de dos réplicas, aplicando el método oficial de referencia [13]. Siguiendo lo propuesto por estos autores, tres test de rápida resolución se aplican para calcular los parámetros experimentales estadísticos que se comparan con los correspondientes valores críticos y que se describieron en el capítulo anterior, en la Sección 2.4.

Los resultados obtenidos en este análisis se muestran en la Tabla 1. Se observa que los valores críticos son mayores que los experimentales, por lo tanto se considera que el IHRM es suficientemente homogéneo. Por otro lado, se puede decir también que el material de referencia es estable, pues los resultados del ensayo no muestran efectos significativos ($p > 0,11$) durante los 30 días de almacenaje del material de referencia.

Tabla 1: Resultados estadísticos para comprobar la homogeneidad del IHRM

Test	Valor experimental	Valor crítico
Criterio de Cochran	0,382	0,967
Desviación estándar analítica	1,1	1,2
Varianza de homogeneidad	2,92	7,72

2.3.3. Cálculo del valor asignado y la incertidumbre asociada

Asumiendo que no hay pérdida de criseno durante la agitación y el almacenamiento del IHRM, el valor asignado de la concentración de PAHs totales en el mismo se evalúa de acuerdo con el procedimiento de preparación y teniendo en cuenta la pureza del criseno (p_c), la masa medida (base seca) del criseno ($m_{criseno}$), la masa medida (base seca) de la sub-muestra de PAM (m_{PAM}), el factor de corrección del empuje para $m_{criseno}$ ($Bu_{criseno} = 1,0008$) y el factor de corrección del empuje para m_{PAM} ($Bu_{PAM} = 1,0006$).

El valor asignado de la concentración de PAHs totales en el IHRM, c_{IHRM} , se calcula con la siguiente fórmula:

$$c_{IHRM} = \left[\frac{m_{criseno} \cdot p_c \cdot Bu_{criseno}}{m_{PAM} \cdot Bu_{PAM}} \right] \cdot 10^6 = 34,6 \text{ mg kg}^{-1} \text{ (base seca)} \quad (1)$$

La Ec. 1 permite también el cálculo de la incertidumbre estándar del valor asignado, aplicando la ley de propagación de incertidumbre a dicha fórmula:

$$\frac{u_{C_{IHRM}}}{C_{IHRM}} = \sqrt{\left(\frac{u_{m_{criseno}}^2}{m_{criseno}^2}\right) + \left(\frac{u_{m_{PAM}}^2}{m_{PAM}^2}\right) + \left(\frac{u_{p_c}^2}{p_c^2}\right) + \left(\frac{u_{Bu_{criseno}}^2}{Bu_{criseno}^2}\right) + \left(\frac{u_{Bu_{PAM}}^2}{Bu_{PAM}^2}\right)} \quad (2)$$

Las incertidumbres estándares de las masas, $u_{m_{criseno}} = 0,0002$ g y $u_{m_{PAM}} = 0,0004$ g provienen de: (i) la precisión de los experimentos, (ii) los procesos de calibración de la balanza con los valores nominales 0,002 g y 100 g, (iii) la deriva de la balanza debido a los cambios de temperatura y a las distintas calibraciones, y (iv) el contenido de humedad. Ambas incertidumbres, $u_{m_{criseno}}$ y $u_{m_{PAM}}$, incluyen las contribuciones respectivas de la tara y la propia pesada. La incertidumbre estándar de la pureza $u_{p_c} = 1\%$ proviene de la información del fabricante. Las incertidumbres de los factores de corrección del empuje son despreciables porque las incertidumbres de la densidad del aire, del criseno, del PAM y del peso de los estándares de referencia son despreciables. Teniendo en cuenta estos supuestos y las incertidumbres estándares $u_{m_{criseno}}$, $u_{m_{PAM}}$ y u_{p_c} , es posible calcular la incertidumbre estándar $u_{C_{IHRM}}$ aplicando la Ec. 2.

El resultado obtenido de la incertidumbre estándar del valor asignado trabajando de esta manera es $u_{C_{IHRM}} = 2,03$ mg kg⁻¹ (base seca).

La incertidumbre estándar de la homogeneidad del IHRM, $u_{hom} = 1,71$ mg kg⁻¹, es la raíz cuadrada de la varianza de la homogeneidad presentada en la Tabla 1.

La incertidumbre estándar de la homogeneidad y la del valor asignado se combinan calculando la raíz cuadrada de la suma de sus cuadrados y se agrega una componente adicional igual a la incertidumbre de homogeneidad de manera de incluir la posible inestabilidad del IHRM [39]. Por lo tanto, la incertidumbre combinada se calcula con la siguiente fórmula:

$$u_{IHRM_{[combinada]}} = \sqrt{u_{IHRM}^2 + 2u_{hom}^2} \quad (3)$$

El valor obtenido resulta $u_{IHRM_{[combinada]}} = 3,2 \text{ mg kg}^{-1}$, con $\nu_{IHRM} = 25$ grados de libertad, estimado de acuerdo a lo propuesto por Welch-Satterthwaite [24]. Finalmente, el valor asignado al contenido de PAHs en el IHRM y su incertidumbre expandida resulta: $(c_{IHRM} \pm U_{IHRM}) = (c_{IHRM} \pm t_{(25, \frac{\alpha}{2})} \cdot u_{IHRM_{[combinada]}}) = (34,6 \pm 6,6) \text{ mg kg}^{-1}$, en base seca y trabajando a un nivel de confianza de 0,95. Este nivel de concentración es útil para evaluar el nivel internacional regulado de $40,00 \text{ mg kg}^{-1}$ para PAHs totales [25].

2.4. Evaluación de la aplicabilidad del IHRM

2.4.1. Procedimientos de extracción

Se aplicaron dos procedimientos de extracción para estudiar la aplicabilidad del IHRM:

a) El procedimiento estándar (Extracción por Soxhlet) que se lleva a cabo siguiendo el Método 3540C de EPA [15]. En este caso, las muestras de IHRM son pesadas en dedales de extracción Whatman grado 603 y los mismos se colocan en el extractor Soxhlet con 150 mL de una solución de *n*-hexano-acetona (1:1, v/v). El procedimiento extractivo se lleva a cabo durante 24 h, lo que implica más de 100 ciclos de extracción. Finalmente, el extracto crudo es transferido a un matraz aforado previamente calibrado de acuerdo a la metodología descrita por Rius et al. [26].

Luego se procede a realizar la limpieza (“clean up”) de una alícuota de 10 mL de cada uno de los extractos, de acuerdo a lo indicado en el Método 3650 B de EPA [27], para eliminar las posibles interferencias de la muestra. Por último, de acuerdo al método oficial internacional para determinar la concentración total de PAHs [13], se procede a la lectura de la señal de fluorescencia de los extractos obtenidos.

b) Un procedimiento no estandarizado empleando un baño ultrasónico (UAME). Aquí, se utiliza un baño ultrasónico rectangular abierto (Cole Parmer®) que opera con una potencia de 300 W y una frecuencia de 40 Khz. Porciones de 0,2g del IHRM son exactamente pesados, se agregan 10 mL de POLE 0,050M y se procede a la sonicación durante 25 min. Luego, los extractos se centrifugan a 2.500 rpm durante 3 min y se filtran. Estos extractos micelares se transfieren cuantitativamente a un material volumétrico adecuado, se le agregan 0,5 mL de HNO₃ 1,5 M, de acuerdo a lo recomendado por Valcárcel et al. [17]. Finalmente, se procede a las lecturas de las señales de fluorescencia, empleando el método oficial, pero habiendo modificado los parámetros instrumentales necesarios. En la sección correspondiente (Sección 2.4.3) se describe la optimización de este procedimiento.

2.4.2. Optimización de la extracción asistida por ultrasonido aplicando diseño experimental

Es necesario optimizar este procedimiento, pues el mismo no está estandarizado. Este método de extracción micelar se basa en uno descrito anteriormente para la extracción de ciertos PAHs seleccionados en muestras de sedimentos [28].

Para este trabajo, se probaron tres tipos distintos de surfactantes para llevar a cabo la extracción: Pole, Triton X-100 y SDS. Es necesario optimizar las condiciones para cada medio y poder seleccionar el surfactante que conduce a los mejores resultados. Para este propósito, la señal analítica que se utiliza es el área total del espectro de fluorescencia obtenido. Así, se plantea inicialmente un diseño factorial completo con dos niveles, 2^3 , para cada surfactante, para detectar las variables con mayor influencia sobre la respuesta experimental. Tanto las variables estudiadas como sus niveles se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Diseño factorial (2^3) para seleccionar variables

Variable	Nivel mínimo	Nivel máximo
Tiempo (min)	5	30
Concentración de surfactante ($\times 10^{-3}$ M)	0,1	100
Volumen de surfactante:cantidad de IHRM (mL:g)	6,25	18,75

Los niveles máximos y mínimos se eligen en función de experiencias previas en las cuales se ha aplicado ultrasonido para la extracción de PAHs. La concentración micelar crítica de cada surfactante se selecciona como nivel mínimo para la variable concentración de surfactante [29].

Posteriormente, para optimizar el procedimiento de extracción para cada sistema micelar, se desarrolla un diseño central compuesto rotatorio (CCRD), con $\alpha = 1,682$ y tres puntos centrales. La Tabla 3 muestra los valores dados para cada variable.

Todos los tratamientos experimentales se llevan a cabo al azar y se utiliza el software Unscrambler 9.7.

Después de este proceso de optimización, se realizan cinco extracciones adicionales bajo condiciones de repetitividad. El análisis estadístico permite la evaluación de los valores medios de las respuestas globales para cada extracción.

Tabla 3: CCRDs para cada Sistema micelar

Variable		Nivel mínimo	Nivel máximo	Centros	Axial (- α)	Axial (+ α)
A	(min)	8,0	30,0	19,0	0,5	37,5
B	(10^{-3} M)	33	100	66,5	10,2	122,8
C	(ml/g)	13,0	50,0	31,5	0,4	62,6

2.4.3. Determinación de PAHs totales por fluorescencia

El contenido de PAHs totales en los extractos de IHRM se determina fluorimétricamente usando un espectrofotómetro de luminiscencia SLM Aminco Bowman Series 2, equipado con una lámpara de descarga de Xenón (1.500 W). La exactitud de longitudes de onda es $\pm 0,5$ nm. Los anchos de las ventanas del instrumento se ajustan a 8 nm para la excitación y 4 nm para la emisión y la ganancia del PMT se establece en 600 V. Las medidas de fluorescencia se llevan a cabo usando una cubeta de cuarzo de 1x1 cm. Las curvas de calibrado para cada sistema micelar y para el método oficial se realizan a 8 niveles de concentración en el intervalo comprendido entre 0,60 – 9,00 mg L⁻¹ de PAHs totales en términos de unidades equivalentes de criseno. Todas las soluciones utilizadas se preparan con una solución estándar de criseno y se analizan cinco veces bajo condiciones de precisión intermedia.

Las medidas de fluorescencia de los extractos obtenidos empleando el método oficial Soxhlet se realizan a $\lambda_{\text{ex}} = 310 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$. Para medir la fluorescencia de los extractos micelares es necesario optimizar los parámetros instrumentales con respecto a los del método oficial, teniendo en cuenta el medio de extracción. Ésto involucra verificar las longitudes de onda de excitación y emisión de acuerdo al surfactante empleado en cada UAME. Para este propósito, se prepara un set de soluciones micelares de criseno con concentraciones de surfactante al nivel de las concentraciones micelares críticas de cada uno. Luego, se aplica Cuadrados Medios Ordinarios para calcular las curvas de calibración y siempre se obtienen relaciones lineales con $r > 0,99$, validados mediante ANOVA a un nivel de confianza del 95%. Los límites de detección obtenidos a partir de cada curva de calibrado están entre $1,24 \text{ mg L}^{-1}$ y $2,48 \text{ mg L}^{-1}$ de PAHs totales usando el método oficial y los distintos medios micelares para la extracción.

2.5. Validación y pruebas estadísticas

Todos los parámetros de las curvas de calibrado se calculan empleando el software ULC 2.0 (Univariate Linear Calibration) [30]. La validación de los datos de recuperación se realiza siguiendo los criterios de aceptación establecidos por EPA [31]. Para chequear puntos discrepantes y normalidad de datos se utilizan test estadísticos no paramétricos [32-34]. Los cálculos estadísticos de ANOVA y los gráficos de Pareto se calculan usando Microsoft Office Excel. Los datos de los diseños experimentales son analizados empleando el software Unscrambler 9.7.

3. Resultados y discusiones

3.1. Optimización del procedimiento UAME

Para evaluar la significación de los efectos principales de las variables de extracción y sus interacciones, en cada medio micelar, se realiza un análisis de varianza (ANOVA) al 95% de confianza, luego de haber aplicado el diseño experimental correspondiente. Los resultados se muestran en la Figura 1. En estos gráficos se presentan los efectos normalizados en orden de significación.

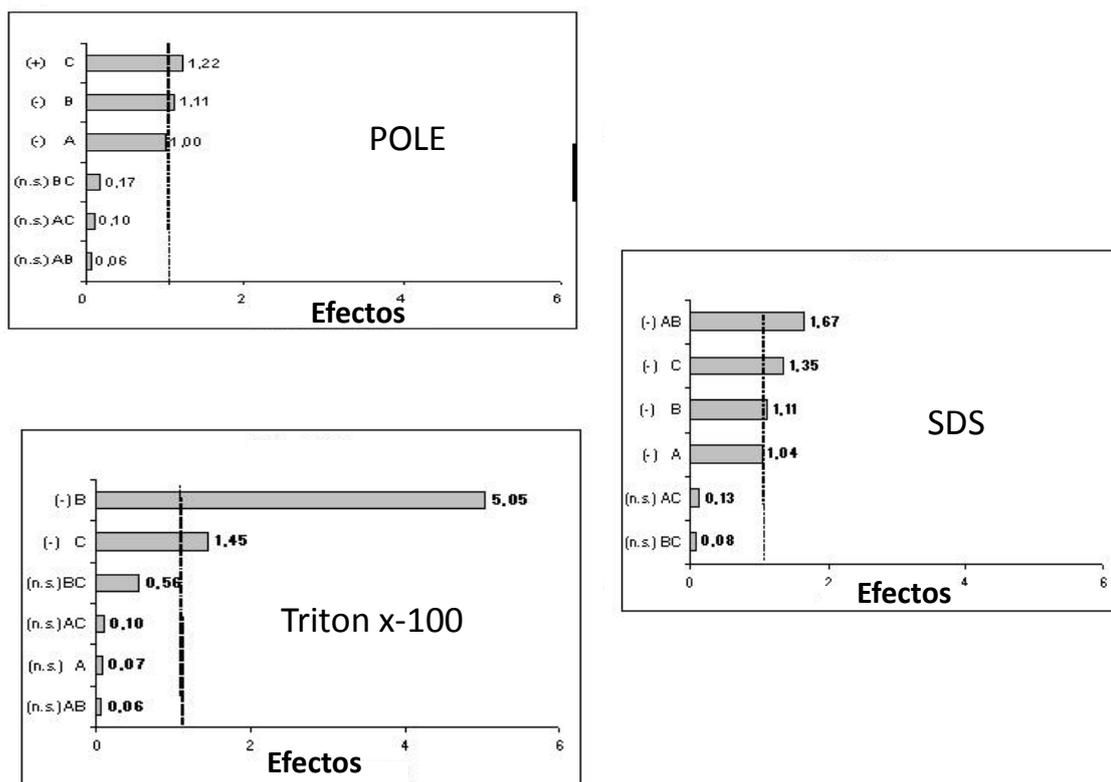


Figura 1: Gráfico de Pareto de los efectos principales

El gráfico de Pareto muestra que la concentración de surfactante y la relación entre volumen de surfactante:cantidad de muestra son variables estadísticamente significativas ($p < 0,05$) y presentan la mayor influencia en la respuesta experimental (área total de los espectros de fluorescencia). En tanto, el tiempo de extracción es apenas significativo y, obviamente tiene un efecto moderado sobre la respuesta experimental. En la Figura 1 también se observa que la eficiencia del procedimiento UAME está afectada por la interrelación de variables sólo para el sistema micelar con SDS. La interacción entre las variables tiempo de extracción y concentración de surfactante (SDS) tiene efecto estadísticamente significativo, con signo negativo, sobre la respuesta experimental.

La región en la cual se llevaron a cabo estos experimentos no incluye el valor óptimo. Por lo tanto, para planificar la optimización, se establecen los CCRDs desplazados en la dirección de la pendiente máxima. Luego de los CCRDs, la concentración de surfactante y la relación volumen de surfactante:cantidad de muestra presentan efectos estadísticamente significativos ($p < 0,01$). La falta de ajuste para los modelos obtenidos para cada surfactante no es significativa ($p < 0,05$) y esto demuestra que la ecuación de regresión explica correctamente la variabilidad de los datos experimentales. El valor óptimo para la extracción es similar para los tres sistemas, con distintos surfactantes. Estos resultados, en tiempo de extracción, están dentro del intervalo de los presentados en trabajos previos para extracciones de PAHs en suelos y sedimentos marinos [28, 35-36]. La Figura 2 muestra las superficies de respuesta cuando el tiempo de extracción se fija en 22 min.

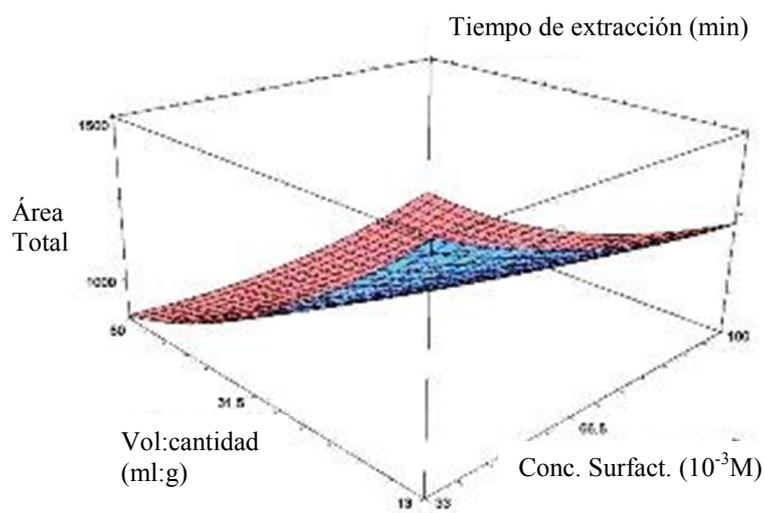
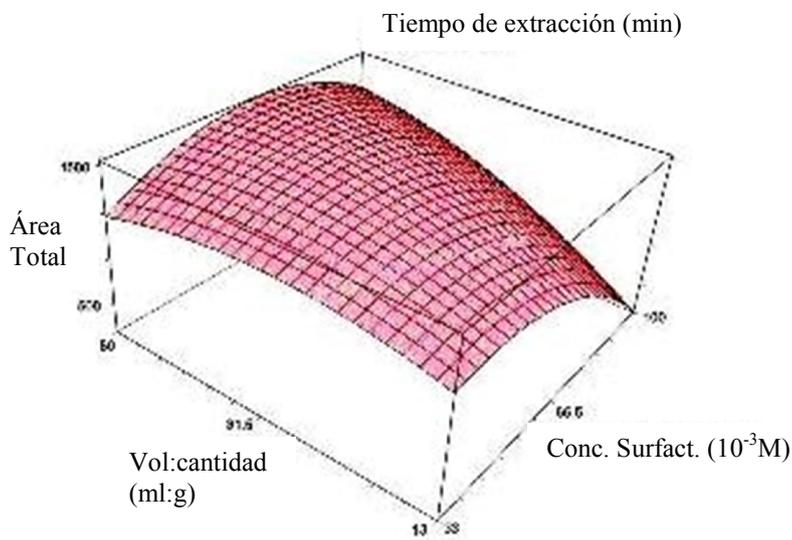
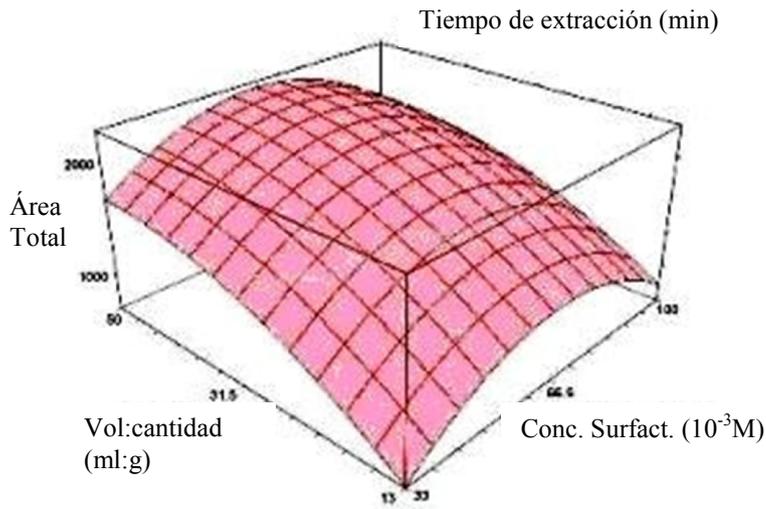


Figura 2: Superficies de respuestas estimadas para el área total de fluorescencia graficando concentración de surfactante vs. relación volumen de surfactante:cantidad de muestra.

Luego de la evaluación de estos gráficos de superficie de respuesta ajustados, los valores seleccionados para obtener las mejores respuestas experimentales para la extracción de PAHs en el IHRM están listados en la Tabla 4.

Tabla 4: Valores óptimos para los distintos medios extractivos por UAME

Factor	Sistema Micelar		
	POLE	SDS	Tritón X-100
Tiempo (min)	21	22	21
Concentración de surfactante (10^{-3} M)	65	44	30
Vol. de surfactante:cantidad de IHRM (mL:g)	47	40	13

Por último, se selecciona el medio micelar óptimo teniendo en cuenta los resultados de experimentos adicionales, realizados con cada surfactante y fijando las variables experimentales en sus valores óptimos, trabajando bajo condiciones de repetitividad. Los resultados para cada procedimiento UAME y sus correspondientes valores se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Valores predichos y experimentales de respuesta bajo condiciones óptimas

Valores óptimos	Area total		
	POLE	SDS	Triton X-100
Actual (promedio, n=5)	1972	1469	1479
Predichos	2081	1497	1507

El ANOVA de estos resultados indica que el POLE es el surfactante que presenta las mayores respuestas instrumentales ($p < 0,01$). El SDS y el Triton X-100 brindan valores de respuestas similares ($p > 0,5$). De acuerdo a esto, se

selecciona el POLE como surfactante para llevar a cabo la extracción de PAHs en muestras de barro aplicando UAME.

3.2. Evaluación de la exactitud de los métodos de extracción utilizando el IHRM

La evaluación de la exactitud del método Soxhlet tradicional y el método UAME se realiza con el IHRM desarrollado. Para esto, se definen originalmente dos diseños de experimento anidados balanceados de dos factores. Los factores estudiados en cada diseño son la repetitividad de las medidas obtenidas y las series de réplicas usadas para obtener las medidas [37].

3.2.1. Comparación de la precisión

De acuerdo a los requerimientos indicados previamente, se realizan dos medidas ($n_s=2$ réplicas) en condiciones de repetitividad sobre siete series diferentes ($p_s=7$ series). Luego, se aplican distintos tests estadísticos (Test de Grubbs, simple y doble y Test de Shapiro-Wilk) para investigar la presencia de datos discrepantes y la normalidad de los datos, respectivamente. Además, se aplica el criterio de aceptación de EPA para comprobar las recuperaciones en cada análisis [31]. Después de verificar estas condiciones, el diseño anidado balanceado original se convirtió en un diseño desbalanceado. Los diferentes términos de varianza: la varianza de la repetitividad, s_r^2 , la varianza de la precisión intermedia, s_{series}^2 , y la varianza de las medias, $s_{\bar{X}}^2$, se calculan a través del ANOVA correspondiente y se comparan todas las varianzas para ambos métodos mediante el Test de Fisher.

Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas entre las varianzas $s_{\bar{X}}^2$ y s_{series}^2 para un nivel de significación del 95%, aunque la varianza de la repetitividad del método UAME es significativamente menor que la del método Soxhlet evaluada con el mismo nivel de significación. Las recuperaciones medias de PAHs totales son del 79% (RSD= 6%) y 73% (RSD= 9%) para los métodos de extracción por UAME y Soxhlet, respectivamente.

3.2.2. Comparación de la veracidad

Si las futuras muestras de rutina a analizar poseen un nivel de concentración similar al del IHRM (nivel de referencia regulado $40,0 \text{ mg kg}^{-1}$, base seca), la veracidad del método de extracción puede ser evaluada verificando si la diferencia entre la media general de cada método, y el valor asignado del IHRM, es decir el sesgo experimental (“bias”), no es estadísticamente significativa:

$$bias = |\bar{X} - C_{IHRM}| < t_{eff, \alpha/2} \cdot \sqrt{\left[\frac{s_I^2}{p_{eff}} \right] + u_{IHRM}^2} \quad (4)$$

donde: $s_I^2 = s_r^2 + s_{series}^2$ es la variancia de precisión intermedia; $p_{eff} = 12$ es el número efectivo de resultados después de que el diseño anidado original se convirtió en un diseño desbalanceado y t es el valor tabulado, a dos colas, para $\alpha=0,05$ y el número efectivo de grados de libertad asociado, v_{eff} , es estimado con la aproximación Welch-Satterthwaite:

$$v_{eff} = \frac{\left[u_{IHRM}^2 + \left(\frac{s_I^2}{v_{SI}} \right) \right]^2}{\frac{u_{IHRM}^4}{v_{IHRM}} + \frac{s_I^4}{v_{SI}}} \quad (5)$$

Los resultados de estas comparaciones se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Resultados obtenidos en la evaluación de la exactitud

Método	Test	Valores experimentales	Valores críticos	Resultados
Soxhlet	Shapiro Wilk	0,877	0,859	NS
	Levene	5,00	5,52	NS
	Veracidad $\bar{X}=25,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ($\alpha=0,05$; $v=19$)	2,778	2,093	S <i>bias</i> = 9,3 mg kg ⁻¹
UAME	Shapiro Wilk	0,899	0,859	NS
	Levene	0,84	5,52	NS
	Veracidad $\bar{X}=27,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ($\alpha=0,05$; $v=23$)	2,298	2,069	S <i>bias</i> = 7,4 mg kg ⁻¹
Comparación de la precisión	F _(repeatability)	1,40	5,05	NS
	F _(series)	3,20	6,39	NS
	F _(intermediate precision)	2,45	2,82	NS

NS: no significativo, S: significativo

De acuerdo a los resultados, el “bias” es estadísticamente significativo para ambos métodos. Esto implica que los resultados obtenidos a partir del análisis de las muestras de rutina deben ser corregidos por el sesgo experimental en el nivel de concentración estudiado.

3.3. Estimación de la Incertidumbre

3.3.1. Incertidumbre asociada al procedimiento analítico

La incertidumbre estándar asociada a la variación experimental de las mediciones futuras se calcula con la siguiente ecuación:

$$\mu_{proc} = \sqrt{\frac{S_{series}^2}{p_s \cdot n_s} + \frac{S_r^2}{n_s}} \quad (6)$$

donde: p_s es el número de series de réplicas y n_s es el número de réplicas de cada serie. En este estudio, se asume el caso más desfavorable y las incertidumbres estándares son calculadas cuando las muestras de rutina se analizan una única vez, es decir para $n_s=1$ y $p_s=1$.

3.3.2. Incertidumbre asociada a la evaluación de la veracidad

Este término corresponde a la incertidumbre del sesgo (“bias”)

experimental, $u(bias) = \sqrt{\left[\frac{S_I^2}{p_{eff}}\right] + u_{IHRM}^2}$

3.3.3. Incertidumbre asociada a otras fuentes

Este término incluye la contribución de fuentes de incertidumbre que surgen de la heterogeneidad del material (sub-muestreo) y del paso de pretratamiento aplicado a futuras muestras de trabajo. En este estudio, la homogeneidad del IHRM se prueba de acuerdo a lo indicado en la Sección 2.3.2. Sin embargo, se espera que las muestras futuras de trabajo no sean homogéneas y la contribución de la incertidumbre surgida de la heterogeneidad

debe ser incluida. Por otro lado, la incertidumbre del paso de pretratamiento de muestras (pesada, secado, UAME, centrifugación, filtración, acidificación, etc.) no se incluye en éste término porque el mismo se lleva a cabo con el IHRM usado en la evaluación de la exactitud. La incertidumbre derivada de la heterogeneidad es estimada con la desviación estándar de la etapa de sub-muestreo, $s_{\text{sub-m}}$. Para esto, diez porciones diferentes de la muestra auténtica, $n_{\text{ps}} = 10$, preservadas como se describe en la Sección 2.2, son analizadas bajo condiciones de repetitividad. Luego de verificar la normalidad de los datos y rechazar dos puntos discrepantes, la $s_{\text{sub-m}}$ de estos resultados es $6,0 \text{ mg kg}^{-1}$ con 7 grados de libertad.

3.3.4. Cuantificación de la incertidumbre global

La incertidumbre global es estimada combinando las incertidumbres asociadas al procedimiento analítico, a la evaluación de la exactitud y a la etapa de sub-muestreo, aplicando la siguiente ecuación:

$$U = t_{\text{eff}, \alpha/2} \sqrt{(\mu_{\text{proc}}^2 + \mu_{\text{bias}}^2 + \mu_{\text{sub-m}}^2)} \quad (7)$$

donde: $t_{\text{eff}, \alpha/2}$ es el valor del estadístico t a dos colas y para $\alpha=0,05$ y sus grados de libertad efectivos se estiman usando la aproximación de Welch-Satterthwaite.

La Tabla 7 muestra los resultados de los valores de incertidumbre calculados para ambos métodos de extracción.

Tabla 7: Valores de Incertidumbre estimados para los métodos de extracción UAME y Soxhlet (mg kg^{-1})

Método	Muestra/ Homogeneidad	μ_{bias}	μ_{proc}	$\mu_{\text{sub-m}}$	$t_{\text{eff}, \alpha/2}$	U	U/\bar{X} (%)
Soxhlet	Rutina/ (-)	3,4	2,2	6,0	2,045	14,8	43%
	IHRM/(+)			1,7	1,960	7,9	25%
UAME	Rutina/ (-)	3,3	1,6	6,0	2,042	14,3	41%
	IHRM/(+)			1,7	1,960	7,2	23%

(-) No homogénea, (+) Homogénea

La Tabla 7 también muestra que los valores de incertidumbre expandida son mucho mayores para las muestras de rutina (41% y 42 % para el método UAME y el método Soxhlet, respectivamente) y disminuye considerablemente cuando la muestra analizada es el IHRM. Como se puede apreciar en la Figura 2, esta disminución se debe a la diferente contribución de la etapa de sub-muestreo, es decir a la falta de homogeneidad de las muestras analizadas. Esto pone de manifiesto la importancia del tratamiento de la homogenización de las muestras de laboratorio, previo a las etapas de sub-muestreo / división de las muestras. Los métodos estándares regulatorios para el análisis de matrices medioambientales complejas no suelen usar el requerimiento de control de calidad del sub-muestreo en términos de homogeneidad. Por otra parte, la contribución de la incertidumbre asociada a la falta de homogeneidad rara vez se evalúa para cuantificar su efecto sobre la incertidumbre global de los resultados finales o en la toma de decisiones a partir de los resultados analíticos. Aquí, se demuestra con datos relevantes, que la preparación de las sub-muestras (especialmente de matrices complejas) a partir de las muestras que llegan al laboratorio, debe ser validada con el fin de garantizar la suficiente

homogeneidad, por ejemplo muestras de suelos [38], de residuos o de aguas residuales.

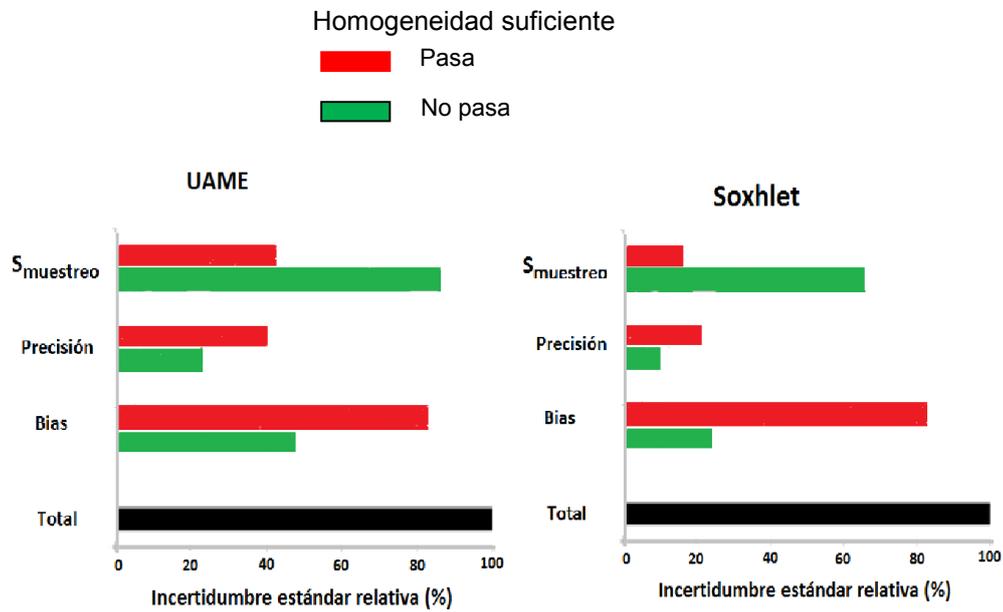


Figura 2: Contribución del procedimiento analítico, de la evaluación de la exactitud y del sub-muestreo a la incertidumbre de la medición para los dos métodos de extracción estudiados.

4. Conclusiones

Se ha aplicado una metodología completa y práctica para evaluar la exactitud y calcular la incertidumbre de medición de un proceso analítico. Ésta se basa en la información de la precisión y el sesgo estimado, calculados en el procedimiento de evaluación de la exactitud utilizando un IHRM preparado para este propósito.

La metodología aplicada puede ser muy valiosa en ausencia de materiales de referencia con alta jerarquía metrológica (MRC primarios, métodos primarios).

El material de referencia obtenido en el laboratorio, IHRM, se desarrolla para poder realizar el control de calidad de la determinación total de PAHs en las muestras de residuos en niveles de concentración regulados internacionalmente.

El IHRM demuestra ser muy adecuado para optimizar un método de extracción no estandarizado y también es satisfactorio para evaluar la exactitud de los resultados cuando se aplican dos métodos de extracción distintos.

Las incertidumbres globales obtenidas son fuertemente dependientes de la contribución asociada a la falta de homogeneidad de las muestras antes de la etapa de sub-muestreo del proceso analítico. Esta observación es particularmente relevante cuando se requiere el análisis de pequeñas cantidades de muestra.

Los balances de incertidumbre obtenidos muestran el papel esencial de la incertidumbre en los controles analíticos de calidad y evaluaciones de toma de decisiones.

Bibliografía

- [1] European Community, Commission **Directive 99/31/EC of 26 April 1999**, Off. J. European Communities *L182 (1999) 14-16*.
- [2] Ley No 24051 y Anexos, Residuos Peligrosos, Congreso de la Nación Argentina, **Boletín Oficial de la Nación Argentina No 27307 del 17 de enero de 1992**, Buenos Aires, Argentina. 1992.
- [3] Ley No 11720, Generación, Manipulación, Almacenamiento, Transporte, Tratamiento y Disposición Final de Residuos Especiales, Congreso de la Provincia de Buenos Aires, **Boletín Oficial de la Provincia de Buenos Aires No 23030 del 13 de diciembre de 1995**, La Plata, Argentina. 1995.
- [4] S. O. Baek, R. A. Field, M. E. Goldstone, P. W. Kirk, J. N. Lester, R. Perry, **Water Air Soil Pollut.** 60 (1991) 279-300.
- [5] U. S. Code of Federal Regulations, **Title 40, Part 423, Appendix A**, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 2013.
- [6] European Community, European Commission, DG Environment, **Regulatory Report, Part 2, Disposal and recycling routes for sewage sludge**, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 2001.
- [7] BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAP, OIML, ILAC. **Guide to the expression of uncertainty in measurement. ISO**, Geneva, 2008.
- [8] S.L.Ellison, A. Williams (Eds). **Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, Edition 3, 2012.

- [9] B. Magnusson, T. Näykki, H. Hovind, M. Krysell. **Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories**, NT Tech Report 537, Edition 3.1 Nordtest, Oslo, 2012.
- [10] A. Maroto, J. Riu, R. Boqué, F. X. Rius, **Anal. Chim. Acta** 391 (1999) 173-185.
- [11] B. Brian. **Guidelines for the in-house production of reference material**. LGC/VAM/1998/090, Teddington, Middlesex, TW11 0LY, UK, 1998.
- [12] ASTM, Standard Practice for Preparation of Sediment Samples for Chemical Analysis. D 3976-01, **Annual Book of ASTM Standards**, vol. 11.01. American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA, USA 2004, pp. 1–3.
- [13] UNESCO, Intergovernmental Oceanic Commission (IOC), The determination of petroleum hydrocarbons in sediments, **Manuals and Guides No 11**, Paris, 1982.
- [14] C. Miège, J. Dugay, M. C. Hennion, **J. Chromatogr. A** 823 (1998) 219-230.
- [15] **US EPA Method 3540**, Soxhlet extraction, Revision 3, US Government Printing Office, Washington, DC, USA, 1996.
- [16] **US EPA Method 8310**, Polynuclear aromatic hydrocarbons, US Government Printing Office, Washington, DC, USA, 1986.
- [17] A. Criado, S. Cárdena, M. Gallego, M. Valcárcel, **J. Chromatogr. A** 1050 (2004) 111-118.
- [18] ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), **Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons**, US Public Health Service, Atlanta, Georgia, USA, 1995.

- [19] H. A. Al Darwish, E. A. Abd El-Gawad, F. H. Mohammed, M. M. Loffy, ***Environ. Geol.*** **48** (2005) 531–542.
- [20] R. Venkatachalapathy, S. Veerasingam, T. Ramkumar, ***Environ. Contam. Toxicol.*** **85** (2010) 397-401.
- [21] R. Venkatachalapathy, S. Veerasingam, P. Raja, S. Sudhakar, V. Rajeswari, R. Mohamed Asanulla, R. Mohan, P. Sutharsan, ***Env. Sc. Poll Res.*** **18** (2011) 687-693.
- [22] M. P. Llompart, R.A. Lorenzo, R. Cela, K. Li, J. M. R. Bélanger, J. R. Jocelyn Pare, ***J. Chromatogr. A*** **774** (1997) 243-251.
- [23] T. Fearn, M. Thompson, ***Analyst*** **126** (2001) 1414-1417.
- [24] K. A. Brownlee. ***Statistical Theory and Methodology in Science and Engineering***, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1960, p. 236.
- [25] E.M.J. Verbruggen, R. Posthumus, A.P. van Wezel, ***RIVM report 711701 020***. National Institute of Public Health and the Environment, 3720 BA Bilthoven, Netherlands, 2001.
- [26] J. Riu, R. Boque, A. Maroto, X. Rius, ***Técnicas de Laboratorio*** **269** (2002) 112-114.
- [27] ***US EPA Method 3650B***, Acid-base partition clean up, Revision 2, US Government Printing Office, Washington, DC, USA, 1996.
- [28] V. Pino, J. H. Ayala, A. M. Afonso, V. González, ***Talanta*** **54** (2001) 15-23.
- [29] I. T. Yeom, M. M. Ghosh, C. D. Cox, K. G. Robinson, ***Environ. Sci. Technol.*** **29** (1995) 3015-3021.
- [30] R. Boque, F.X. Rius, D.L. Massart, ***J. Chem., Educ.*** **71** (1994) 230–232.

- [31] Region 1 EPA-NE, **Data Validation Functional Guidelines for Evaluating Environmental Analyses, Part II, Section VOA/SV-IX**; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Science and Technology: Washington, DC, 1996.
- [32] Association of Official Analytical Chemist (AOAC), **J. AOAC Int.** 78 (1995) 143A-160A.
- [33] D. L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. de Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A**, Elsevier, Amsterdam, NL, 1997, pp. 452-454.
- [34] S. S. Shapiro, M. B. Wilk, **Biometrika** 52 (1965) 591-611.
- [35] E. Aamot, J. Kraine, E. Steinnes, **Fresenius J. Anal. Chem.** 328 (1987) 569-571.
- [36] F. Sun, D. Littlejohn, M. D. Gibson, **Anal. Chim. Acta** 364 (1998) 1-11.
- [37] ISO, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. **ISO 5725-3:1998 (E)**, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 1998, 1-56.
- [38] F. Risso, R. Narizzano, M. Ottonelli, A. Magherini, M. Giampieria, E. Carlinia, **Analytical Methods** 4 (2012) 570-574.
- [39] M. Pettengell. **Production and characterisation of a clay loam soil reference material containing PAHs, metals and selected inorganics.** LGC/VAM/2007/036, Teddington, Middlesex, TW11 0LY, UK, 2008.

Capítulo IV

**Evaluación de la incertidumbre para el análisis de PAHs en
barros industriales mediante el uso de cromatografía gaseosa-
espectrometría de masa (GC-MS). Dos casos de estudio
utilizando extracción mediante Soxhlet y asistida por
ultrasonido**

1. Introducción

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son un grupo de compuestos orgánicos persistentes (POPs) de gran importancia ambiental debido a su toxicidad, a su ocurrencia generalizada y a la persistencia en el medio ambiente. Estos compuestos han sido designados peligrosos para el medio ambiente, debido a que por sus propiedades fisicoquímicas se pueden bioacumular y/o biomagnificar y tienen un impacto negativo en los seres humanos y en la biota. Los PAHs provienen de fuentes antropogénicas incluyendo la combustión incompleta de carbón y combustibles, aguas residuales y los vertidos de petróleo.

En la última década, estos compuestos han sido prohibidos en todo el mundo, como resultado de los esfuerzos de varias organizaciones internacionales [1-3]. Debido a sus niveles de concentración, en el orden de las trazas, y a las complejas matrices ambientales, la mayoría de las determinaciones de PAHs requieren pasos de extracción/preconcentración previos a la medida instrumental. La preocupación por los residuos de PAHs en matrices ambientales ha llevado al desarrollo de muchos métodos de análisis. La extracción convencional de estos analitos en matrices sólidas se lleva a cabo a través de varias metodologías que han sido extensamente descritas en la literatura: agitación mecánica, Soxhlet, extracción asistida por microondas (MAE), asistida con ultrasonidos (UAE), extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción líquida presurizada (PLE). Estas metodologías han sido adoptadas y estandarizadas por varias organizaciones internacionales (ASTM, ISO, EPA) que han publicado sus procedimientos operacionales estándares, con un estricto protocolo de control de calidad. La extracción por Soxhlet ha

sido el método estándar de preferencia puesto que es una metodología muy fácil de estandarizar, posee altas recuperaciones, requiere poca capacitación y se trabaja, en general, con mayor cantidad de muestra que la mayoría de las otras alternativas (MAE, SFE, etc.) [4]. Por otro lado, la ultrasonicación es una metodología simple y eficiente para extraer trazas de analitos orgánicos de suelos, sedimentos y aguas residuales, cuando se compara con los métodos a reflujo. Hay estudios que demuestran que los rendimientos de extracción de PAHs por ultrasonido son comparables y aún hasta mejores que usando otras metodologías, aunque el ultrasonido ha presentado menores valores de recuperación en otros estudios realizados [5-7]. La reproducibilidad obtenida con extracción asistida por ultrasonido ha resultado en algunos casos mayor [8] y en otros menor [9] que la obtenida con extracción por Soxhlet.

Además, es importante tener en cuenta que los resultados analíticos obtenidos cuando se determinan PAHs en muestras ambientales sujetas a regulaciones, deben ser fiables y comparables con una incertidumbre de medición bien establecida. La estimación de la incertidumbre es uno de los principales focos de interés debido a la importancia que muestra en la calidad de los datos. Un requisito para los laboratorios acreditados bajo los sistemas de calidad ISO/IEC 17025 [10], es la incertidumbre de medición asociada al resultado. Esta información debe estar disponible y además se debe informar si la incertidumbre afecta el cumplimiento de un límite máximo reglamentado. Sin embargo, la ISO/IEC 17025 no establece un método aproximado particular para determinar la incertidumbre de una medida.

Teniendo en cuenta la simplicidad y viabilidad del método estándar UAE para ensayos de rutina, sería satisfactorio determinar cuán comparables son la

recuperación y precisión del método UAE con respecto al método estándar Soxhlet tradicional. Por lo tanto, en el presente trabajo, se realiza un estudio para comparar las características de dos metodologías de extracción, UAE y Soxhlet, utilizando como técnica determinativa la cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS), de acuerdo al método 8270D recomendado por EPA [11]. La comparación se realiza analizando tres materiales de prueba con diferentes niveles de concentración, seleccionados de acuerdo a los niveles guía de las normas internacionales. Así, las incertidumbres de medición para ambos métodos son estimadas usando la información de la evaluación de la veracidad y la precisión.

Estos estudios están destinados a ser aplicados en futuros trabajos para estimar la incertidumbre de medición asociada a los procedimientos de extracción que se aplican a analitos de gran interés ambiental.

2. Parte Experimental

2.1. Reactivos y soluciones

- ✓ Todos los solventes utilizados son de grado analítico (acetona, cloruro de metileno y *n*-hexano).
- ✓ Estándares analíticos de acenafteno (pureza>99%), fenantreno (pureza>>99.5%), fluoranteno (pureza>>98%), pireno (pureza>>98%), naftaleno (pureza>>99.7%), criseno (pureza>>98%) y antraceno (pureza>>99%).
- ✓ Solución estándar de una mezcla de los 16 PAHs prioritarios, recomendados por EPA (2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito en cloruro de metileno): naftaleno (Nap), acenaftileno (Acy), acenafteno (Ace), fluoreno (Flu), fenantreno (Phe), antraceno (Ant), fluoranteno (Flt), pireno (Pyr), benzo[a]antraceno (B[a]A), chriseno (Chr), benzo[b]fluoranteno (B[b]F), benzo[k]fluoranteno (B[k]F), benzo[a]pireno (B[a]P), indeno[123-cd]pireno (I[c,d]P), dibenzo[a,h]antraceno (DB[a,h]A) y benzo[ghi]perileno (B[ghi]P).
- ✓ Solución de acenafteno deuterado, Ace_d, de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en cloruro de metileno, utilizado como estándar interno en las medidas cromatográficas.
- ✓ Sulfato de sodio anhidro prelavado con cloruro de metileno.

2.2. Materiales y equipamiento

- ✓ Cromatógrafo gaseoso Agilent 6890 acoplado a un detector de masa Agilent 5973N.
- ✓ Baño ultrasónico abierto (Cole Parmer®, USA) que opera con una potencia de 300 W y una frecuencia de 40 Khz.
- ✓ Balanza analítica (Mettler Toledo AB104-S) calibrada con pesas estándar de valor nominal 0.002 g (Class E2-OIML, Dolz Hnos SRL) y valor nominal 100 g (Class 1-ANSI/ASTM E617, Troemner Inc.).

2.3. Procedimiento analítico

2.3.1 Preparación de los estándares

Se preparan cinco soluciones conteniendo una mezcla de PAHs y Ace_d, a partir de las soluciones comerciales certificadas, para realizar la cuantificación por GC-MS. Para esto, se utilizan jeringas y material volumétrico calibrado. Por otro lado, se preparan otras tres soluciones estándar conteniendo la mezcla de PAHs, pesando la cantidad apropiada de cada uno de ellos, empleando una balanza analítica calibrada. Esas soluciones son utilizadas para realizar la fortificación de las muestras.

2.3.2 Preparación de las muestras de prueba

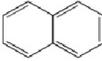
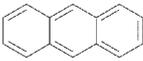
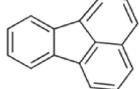
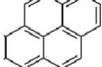
Debido a que no existe material de referencia certificado del tipo de muestras que se está analizando, se preparan tres muestras de prueba, a partir de un material auténtico preacondicionado (PAM) y con diferentes niveles de

concentración. Para realizar esto se colecta una muestra de barro residual industrial del canal colector del Complejo Petroquímico de Bahía Blanca, Argentina. Esta muestra se toma mediante un muestreador de acero inoxidable preacondicionado, que permite extraer objetos extraños. Luego, la muestra se envasa en un recipiente de polipropileno opaco, lavado previamente con metanol. La muestra se traslada inmediatamente al laboratorio para tamizarla y mezclarla en una homogeneización preliminar, y luego se deja sedimentar para eliminar la mayoría del agua ocluida. Posteriormente, se seca a temperatura ambiente durante 120 horas y se homogeneiza nuevamente. Este PAM es finalmente almacenado en un lugar oscuro y a humedad constante. Luego, se toman varias sub-muestras para preparar las muestras de prueba, trabajando de la siguiente manera: a) Una sub-muestra representativa de PAM es analizada por SPME-GC-MS, (en el modo full scan) [12] para determinar la presencia de PAHs nativos; b) Diez sub-muestras de PAM son analizadas para cuantificar los PAHs nativos aplicando el método EPA 3540 C (Extracción por Soxhlet) [13] y el método EPA 8270 D (GC-MS) [11]. Los resultados de cada análisis demostraron que sólo 7 de los 16 PAHs están presentes en la muestra PAM y se listan en la Tabla 1; c) Finalmente, otras tres sub-muestras homogeneizadas (70,2404 g, 74,4216 g and 70,4213 g) se fortifican a tres niveles de concentración con naftaleno, acenafteno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, pireno y criseno y se mantienen en estado estacionario durante 1 mes para que se produzcan las interacciones entre los analitos y la matriz de la muestra [14]. Los tres niveles de concentración se seleccionan de manera de tener la posibilidad de evaluar concentraciones bajas ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$), medias

(3.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y altas (20.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) de cada PAH, con respecto a los valores de referencia internacionales [15].

El procedimiento de fortificación se realiza de acuerdo a la técnica descrita por Llompart et al [16], que consiste en formar una suspensión (“slurry”) de cada sub-muestra con 100 mL de las soluciones estándares de cada PAHs disueltos en una mezcla de hexano-acetona (1:1). Estas sub-muestras fortificadas se dejan secar al aire, con ocasionales agitaciones a temperatura ambiente, durante 5 días. Luego, se colocan en envases adecuados y se guardan en lugar oscuro y seco a 4 °C durante 30 días antes de las primeras extracciones. Asumiendo que no hay pérdidas de analitos durante la agitación y el almacenamiento, las concentraciones finales de PAHs esperadas se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Concentraciones de las muestras de prueba y del material PAM

Analito	Molecular Structure	Expected concentration in the test samples ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			PAM Native concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
		Low level	Medium level	High level	
Naphthalene		111	5.240	27.690	177
Acenaphthene		60	2.822	14.910	81
Anthracene		75	3.547	18.744	67
Phenanthrene		68	3.225	17.040	297
Fluoranthene		113	5.321	28.116	209
Pyrene		68	3.198	16.898	221
Chrysene		57	2.687	14.200	134

El aseguramiento de la homogeneidad de estas muestras de prueba respecto del contenido total de cada PAHs, se evalúa utilizando la aproximación propuesta por Fearn and Thompson [17], y aplicando los métodos EPA 3540 and 8270D. De esta forma se aplican tres test estadísticos para calcular los parámetros experimentales de homogeneidad, que son comparados con los respectivos valores críticos y que se describieron en el capítulo II, Sección 2.4. Las desviaciones estándares de referencia requeridas para la aplicación de estos test estadísticos fueron seleccionadas de la bibliografía [7-8, 18]. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que los valores críticos son mayores que los experimentales para los tres test estadísticos aplicados. En la Tabla 2 se presentan los resultados correspondientes a la varianza de homogeneidad para los distintos analitos en cada material de prueba. A partir de estos resultados se puede asumir que las muestras de prueba son suficientemente homogéneas.

Tabla 2: Resultados estadísticos para comprobar la homogeneidad de las muestras de prueba.

Analito	Varianza de homogeneidad	
	Valor experimental	Valor crítico
$C_{\text{nivel de fortificación}} (\mu\text{g kg}^{-1}) = 100$		
Naftaleno	0,011	0,016
Acenafteno	0,0001	0,014
Antraceno	0,003	0,006
Fenantreno	0,002	0,006
Fluoranteno	0,0007	0,009
Pireno	0,0006	0,001
Criseno	0,003	0,06
$C_{\text{nivel de fortificación}} (\mu\text{g kg}^{-1}) = 3000$		
Naftaleno	0,001	0,01
Acenafteno	0,014	0,038
Antraceno	0,009	0,017
Fenantreno	0,0007	0,023
Fluoranteno	0,0009	0,018
Pireno	0,006	0,016
Criseno	0,003	0,012
$C_{\text{nivel de fortificación}} (\mu\text{g kg}^{-1}) = 20000$		
Naftaleno	0,0003	0,008
Acenafteno	0,011	0,058
Antraceno	0,038	0,041
Fenantreno	0,0013	0,032
Fluoranteno	0,003	0,025
Pireno	0,0005	0,032
Criseno	0,022	0,032

2.3.3. Procedimientos de extracción

Los estudios de recuperación para cada método de extracción se llevan a cabo trabajando con dos series de cuatro réplicas para cada nivel de concentración. Esto implica realizar 24 experimentos con cada método de extracción. Las condiciones de precisión intermedia están dadas por la variación dentro del laboratorio de todos los factores que afectan al procedimiento analítico (día, reactivos, calibración y analista).

Extracción por Soxhlet: La extracción por Soxhlet se basa en el Método EPA 3540C. Porciones de 5 g de la muestra de prueba son exactamente pesados y mezclados con 5 g de sulfato de magnesio anhidro. Esta mezcla se transfiere a un dedal de extracción y los mismos se colocan en el extractor Soxhlet con 125 mL de una solución de n-hexano:acetona (1:1 v/v). El procedimiento extractivo se lleva a cabo durante 24 h a 5 ciclos/hora. Cuando se completa la extracción, los extractos son evaporados hasta sequedad con una corriente de nitrógeno. Luego, los residuos de estos extractos se disuelven con 1 mL de n-hexano medido exactamente.

Extracción asistida con ultrasonido (UAE): Esta extracción se basa en el Método EPA 3550C. En este estudio, porciones de 5 g de muestra prueba se pesan exactamente en un vial de vidrio de 11 mL con una tapa de PTFE. Se agregan 10 mL de la mezcla de solventes n-hexano: acetona (1:1 v/v) en cada vial y se procede con la extracción en un baño ultrasónico abierto. Cuando la extracción se completa, se transfiere cuantitativamente el sobrenadante a un vial prelavado y se preconcentra a 1 mL siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, en la extracción por Soxhlet. La posición de los viales en el baño ultrasónico y el tiempo de sonicación son optimizados previamente

en forma univariante. Los resultados obtenidos para las cinco posiciones evaluadas no mostraron efectos significativos ($p > 0.05$). Los tiempos de sonicación probados (5, 15, 20, and 30 min) indicaron que 30 min ($p < 0.05$) es el valor óptimo para la extracción.

2.3.4. Condiciones experimentales para el análisis por GC-MS.

La cuantificación de PAHs en los extractos obtenidos se lleva a cabo mediante un análisis por GC-MS. Las condiciones operativas son: He como gas portador, columna capilar HP-5MS (30m X 0.25 mm x 0.25 μm) con un caudal de 1 mLmin^{-1} ; el detector de impacto electrónico trabaja a 70 eV. La temperatura de la fuente de iones y la línea de transferencia al espectrómetro de masa se mantienen a 180 °C y 290 °C respectivamente. El programa de temperaturas usado es: temperatura inicial de la columna, 80°C, mantenida durante 1 min, luego una rampa de 10°C/min hasta 260°C, también mantenida durante 1 min. El inyector se programa a 250°C y trabaja en el modo “splitless”, inyectando 2 μL . Los siete PAHs identificados se determinan utilizando el modo SIM (selective ion monitoring). El monitoreo de iones se selecciona de acuerdo a las recomendaciones de EPA [11]. La cuantificación se realiza utilizando cinco puntos de calibración (concentraciones: 0.02; 0.2; 2; 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$ de la solución de mezcla de PAHs), empleando como estándar interno Ace_d. La adquisición de datos se realiza con el software Chemstation (Agilent Ltd, USA). Las rectas de regresión obtenidas poseen coeficientes de correlación entre 1 y 0,9998. El análisis de la varianza (ANOVA) realizado y los límites de detección se calculan con el software ULC [19]. La Figura 1 presenta los cromatogramas

típicos de los extractos de los materiales de prueba obtenidos con los dos métodos de extracción estudiados.

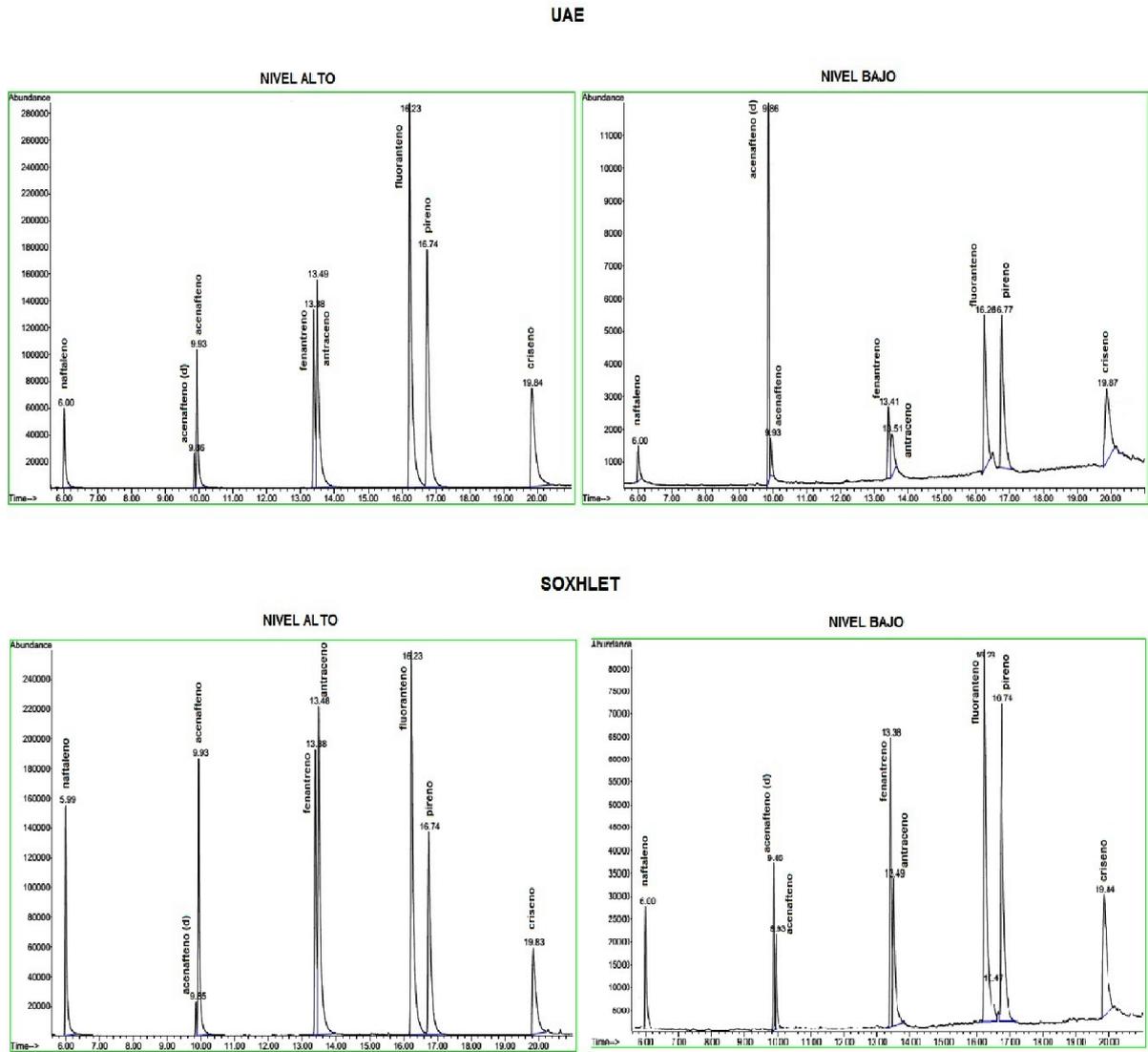


Figura 1: Perfiles cromatográficos típicos de los extractos UAE y Soxhlet

3. Resultados y discusión

3.1. Evaluación de la veracidad

Esta evaluación involucra la estimación del sesgo en términos de recuperación y la estimación del sesgo constante, debido a que las muestras de prueba contienen analito nativo.

3.1.1. Evaluación de las recuperaciones

En principio, se comparan los valores de recuperación de cada método respecto de los criterios de aceptación de la EPA [20]. Luego, se investiga la normalidad de los datos, la presencia de valores anómalos y la homocedasticidad de los mismos aplicando una serie de tests estadísticos (test de Grubbs, simple y doble, test de Shapiro-Wilk y test de Levene). Después de verificar las condiciones antes mencionadas, debido a que el antraceno y el pireno no presentaban homocedasticidad, se modifica a 65% el valor mínimo de aceptación recomendado por EPA. Posteriormente, se calcula el ANOVA para comparar la semejanza de los niveles de fortificación. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: ANOVA de la comparación entre niveles de fortificación

Analito	Soxhlet			UAE		
	ANOVA (entre niveles)	\bar{R}_m	t	ANOVA (entre niveles)	\bar{R}_m	t
Naftaleno	NS (p>0,18)	0,71	10,00	S (p<0,01)	N/A	N/A
Acenafteno	S (p<0,01)	N/A	N/A	S (p<0,01)	N/A	N/A
Antraceno	NS (p>0,60)	0,90	9,00	S (p<0,01)	N/A	N/A
Fenantreno	S (p<0,02)	N/A	N/A	NS (p>0,16)	0,96	0,72
Fluoranteno	NS (p>0,3)	0,73	8,75	S (p<0,01)	N/A	N/A
Pireno	S (p<0,01)	N/A	N/A	S (p<0,05)	N/A	N/A
Criseno	NS (p>0,65)	0,94	3,30	NS (p>0,67)	0,81	6,00

Como se observa en la Tabla 3, sólo ciertos analitos presentan valores de recuperación comparables entre los tres niveles de fortificación. Para estos casos, se calcula la recuperación global, \overline{R}_m , a partir de la siguiente expresión:

$$\overline{R}_m = \frac{1}{3} \sum_1^3 \overline{R}_i \quad (1)$$

donde \overline{R}_i es la recuperación media para cada analito, en cada nivel de fortificación y para cada método de extracción.

Por otro lado, teniendo en cuenta que los valores de recuperación para todos los analitos no son comparables a los tres niveles fortificados, no es posible simplificar la evaluación de la veracidad, en términos de recuperación global. Por lo tanto, para realizar esta evaluación se utilizan los datos correspondientes a los valores de recuperación media, \overline{R}_i y se aplican los respectivos test de significación estadística para comprobar si \overline{R}_i difiere del valor teórico del 100% de recuperación (Ec. 2).

$$[\overline{R}_i - 1] \leq t_{\alpha/2, gl} \mu(\overline{R}_i) \quad (2)$$

donde $\mu(\overline{R}_i)$ es la incertidumbre asociada a cada recuperación media y $t_{\alpha/2, gl}$ es el valor tabulado del estadístico t para una prueba de dos colas con los grados de libertad(gl) asociados a $\mu(\overline{R}_i)$. Si se cumple la expresión (2), el valor de \overline{R}_i no difiere significativamente de la recuperación del 100% para el nivel de significación α elegido.

La $\mu(\overline{R}_i)$ se calcula a partir de los diferentes términos de la varianza: repetitividad, S_r^2 , y la varianza entre series, S_{series}^2 , en las condiciones intermedias de precisión bajo las cuales se desarrolla el estudio:

$$u(\overline{R}_i)^2 = \left(\frac{S_{series}^2}{p} + \frac{S_r^2}{n \cdot p} \right) \quad (3)$$

n es el número efectivo de réplicas que resulta después de aplicar el criterio de aceptación y eliminar datos anómalos, y $p=2$ es el número de series ensayadas.

Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Los valores de t experimentales que están resaltados en la Tabla 4, son mayores que el valor $z= 1,96$ (tabulado para dos colas y $\alpha=0,05$). Esto significa que las recuperaciones obtenidas con ambos métodos de extracción que tienen valores inferiores al 86% (excepto para el caso del criseno cuando se realiza la extracción empleando el método UAE en los dos niveles más bajos de concentración), deben ser utilizadas para corregir los resultados de las futuras muestras de rutina.

Table 4: Resultados de las recuperaciones a distintos niveles de concentración y sus incertidumbres asociadas.

	Soxhlet			UAE		
	\bar{R}_i	$\left[\mu(\bar{R}_i)\right]^{-2}$	t	\bar{R}_i	$\left[\mu(\bar{R}_i)\right]^{-2}$	t
$C_{\text{nivel de fortificación}}(\mu\text{g kg}^{-1})= 100$						
Naftaleno	0,73	$2,2 \cdot 10^{-3}$	<u>5,71</u>	0,86	$8,1 \cdot 10^{-3}$	<u>2,99</u>
Acenafteno	0,74	$4,7 \cdot 10^{-3}$	<u>3,80</u>	0,65	$0,8 \cdot 10^{-3}$	<u>13,45</u>
Antraceno	0,86	$1,6 \cdot 10^{-3}$	<u>3,50</u>	0,99	$0,6 \cdot 10^{-3}$	0,42
Fenatreno	0,92	$1,2 \cdot 10^{-3}$	1,90	1,00	$3,7 \cdot 10^{-3}$	0
Fluoranteno	0,71	$1,9 \cdot 10^{-3}$	<u>6,45</u>	0,93	$3,4 \cdot 10^{-3}$	1,22
Pireno	1,03	$0,4 \cdot 10^{-3}$	1,50	0,72	$6,0 \cdot 10^{-3}$	<u>3,51</u>
Criseno	0,96	$2,4 \cdot 10^{-3}$	0,82	0,80	$14,1 \cdot 10^{-3}$	1,54
$C_{\text{nivel de fortificación}}(\mu\text{g kg}^{-1})= 3000$						
Naftaleno	0,67	$0,9 \cdot 10^{-3}$	<u>10,81</u>	0,73	$17,0 \cdot 10^{-3}$	<u>2,08</u>
Acenafteno	0,95	$3,3 \cdot 10^{-3}$	0,86	1,10	$7,5 \cdot 10^{-3}$	1,15
Antraceno	0,92	$2,1 \cdot 10^{-3}$	1,74	1,00	$0,7 \cdot 10^{-3}$	0
Fenatreno	1,01	$0,6 \cdot 10^{-3}$	0,43	1,03	$10,0 \cdot 10^{-3}$	0,30
Fluoranteno	0,76	$5,8 \cdot 10^{-3}$	<u>3,16</u>	0,71	$7,2 \cdot 10^{-3}$	<u>3,19</u>
Pireno	0,80	$3,0 \cdot 10^{-3}$	<u>3,64</u>	0,91	$7,5 \cdot 10^{-3}$	1,04
Criseno	0,95	$0,6 \cdot 10^{-3}$	1,95	0,86	$23,0 \cdot 10^{-3}$	0,92
$C_{\text{nivel de fortificación}}(\mu\text{g kg}^{-1})= 20000$						
Naftaleno	0,73	$0,1 \cdot 10^{-3}$	<u>23,38</u>	0,65	$4,1 \cdot 10^{-3}$	<u>9,60</u>
Acenafteno	0,93	$17,1 \cdot 10^{-3}$	0,53	0,73	$11,0 \cdot 10^{-3}$	<u>2,55</u>
Antraceno	0,89	$15,0 \cdot 10^{-3}$	0,91	0,65	$1,4 \cdot 10^{-3}$	<u>9,38</u>
Fenatreno	0,97	$0,7 \cdot 10^{-3}$	1,12	0,90	$3,6 \cdot 10^{-3}$	1,66
Fluoranteno	0,69	$20,0 \cdot 10^{-3}$	<u>6,89</u>	0,75	$2,3 \cdot 10^{-3}$	<u>5,21</u>
Pireno	0,65	$0,4 \cdot 10^{-3}$	<u>18,0</u>	0,73	$2,0 \cdot 10^{-3}$	<u>5,98</u>
Criseno	0,91	$11,0 \cdot 10^{-3}$	0,86	0,79	$9,4 \cdot 10^{-3}$	<u>2,16</u>

3.1.2. Evaluación del sesgo constante

Para la estimación del sesgo constante se aplica el método de Youden [21]. Se analizan 2 porciones de diferentes masas del PAM (alrededor de 5 y 10 g para el Soxhlet, y 1 y 2 g para el UAE) que se someten al procedimiento analítico con cada uno de los métodos de extracción estudiados. En ausencia de sesgo, ambos análisis deben proporcionar los mismos resultados. En este caso el sesgo se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$\frac{\bar{x}_n - \delta_{cte}}{W_n} = \frac{\bar{x}_m - \delta_{cte}}{W_m} \quad (4)$$

donde \bar{x}_m y \bar{x}_n son los valores medios de los resultados analíticos obtenidos cuando se analizaron las cantidades W_m y W_n , respectivamente, y δ_{cte} es el sesgo constante que se obtiene aplicando la siguiente ecuación (5):

$$\delta_{cte} = \frac{W_m \bar{x}_n - W_n \bar{x}_m}{W_m - W_n} \quad (5)$$

La ausencia de sesgo constante se debe verificar estadísticamente, comprobando que se cumple la inecuación que se detalla:

$$|\delta_{cte}| < t_{\alpha/2, gl} \cdot u(\delta_{cte}) \quad (6)$$

donde $u(\delta_{cte})$ es la incertidumbre de la estimación del sesgo constante y $t_{\alpha/2, gl}$ es el valor tabulado del estadístico t para una prueba de dos colas con los grados de libertad asociados a $u(\delta_{cte})$. En el caso que la incertidumbre de la

pesada sea muy inferior a la incertidumbre de los resultados analíticos (como generalmente suele ser), $\mu(\delta_{cte})$ se expresa como:

$$u(\delta_{cte}) = \frac{1}{W_m - W_n} \sqrt{(W_m \cdot u(\bar{x}_n))^2 + (W_n \cdot u(\bar{x}_m))^2} \quad (7)$$

donde los valores de $u(\bar{x}_n)$ y $u(\bar{x}_m)$ se obtienen a partir de la desviación estándar asociada a los valores medios \bar{x}_m y \bar{x}_n .

En la Tabla 5 se presentan los valores de los sesgos constantes y sus respectivas incertidumbres para cada analito y cada método de extracción.

Tabla 5: Sesgos constantes para cada analito y cada método de extracción y sus incertidumbres

Analito	Soxhlet			UAE		
	$ \delta_{cte} $ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$\mu(\delta_{cte})$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	t	$ \delta_{cte} $ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$\mu(\delta_{cte})$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	t
Naftaleno	47	25	1,83	39	21	1,86
Acenafteno	20	11	1,75	4	3	1,46
Antraceno	17	16	0,86	30	16	1,56
Fenantreno	4	5	1,03	1	1	1,80
Fluoranteno	41	22	1,79	33	18	1,78
Pireno	9	6	1,44	10	25	0,39
Criseno	18	10	1,70	53	29	1,79

Todos los valores del estadístico t son menores que el valor crítico 1,96 ($\alpha= 0,05$), por lo tanto el sesgo constante resulta ser estadísticamente no significativo para los 7 analitos en estudio, aplicando ambos métodos de extracción.

3.2. Incertidumbre de muestras futuras de rutina

Para estimar la incertidumbre de las muestras que se analizarán en el futuro, se utiliza la información obtenida en la evaluación de la veracidad, la información de la precisión intermedia del método y la información obtenida en la evaluación de la homogeneidad de las muestras de prueba. De acuerdo a lo descrito por Maroto y col. [22], la incertidumbre de los resultados obtenidos cuando se aplica cada uno de los métodos a las muestras futuras se calcula aplicando la siguiente expresión:

$$u(x_{\text{corr}}) = \sqrt{\frac{(x_{\text{corr}}u(F_{\text{hom}}))^2}{F_{\text{hom}}^2} + \frac{F_{\text{hom}}^2}{R^2} \left(\frac{s_{\text{run}}^2}{p_s} + \frac{s_r^2}{n_s p_s} \right) + \frac{F_{\text{hom}}^2 u(\delta_{\text{ct}})^2}{R^2} + \frac{(F_{\text{hom}} x_{\text{corr}} u(R))^2}{R^2}} \quad (8)$$

3.2.1. Incertidumbre de la falta de homogeneidad, $\mu(F_{\text{hom}})$

Este término se obtiene a partir de la información obtenida en la evaluación de la homogeneidad de las muestras de prueba, según la siguiente expresión:

$$\mu(F_{\text{hom}}) = \frac{RSD_{\text{hom}}}{\sqrt{N_p}} \quad (9)$$

siendo RSD_{hom} la desviación estándar relativa de la falta de homogeneidad, que se calcula con los datos de varianzas experimentales de homogeneidad presentados en la Tabla 2, según la siguiente expresión:

$$RSD_{\text{hom}} = \frac{S_{\text{hom}}^2}{R_i} \quad (10)$$

Se espera que este término, $\mu(F_{\text{hom}})$, no contribuya significativamente en el balance de la incertidumbre expandida, porque las muestras de prueba son suficientemente homogéneas, es decir el factor de homogeneidad es estadísticamente igual a la unidad, $F = 1$. No obstante, en el presente estudio se calcularon las contribuciones, $\mu(F_{\text{hom}})$, considerando los casos más desfavorables para cada nivel de concentración, es decir utilizando las mayores varianzas experimentales de homogeneidad de cada nivel de la Tabla 2. Cuando las muestras futuras de rutina presenten homogeneidades diferentes a las de los materiales de prueba utilizados en la evaluación de veracidad, se debe incluir el real valor de F y cuantificar su incertidumbre asociada.

3.2.2. Incertidumbre asociada a la precisión del método, $[\mu(\bar{R}_T)]$

Este término se calcula utilizando la Ec. 3, pero en las condiciones de precisión que se empleen en el futuro, es decir con n (número de réplicas) y $p=2$ (número de series) ensayadas en la rutina futura. En la Tabla 6 se presentan los valores de esta contribución de incertidumbre, calculados para tres condiciones de precisión intermedia ($p=1$; $p=2$ y $p=3$).

Tabla 6.: Contribución de incertidumbre asociada a la precisión del método

Analito	Soxhlet			UAE		
	$\left[\mu\left(\bar{R}_I\right)\right]^2$			$\left[\mu\left(\bar{R}_I\right)\right]^2$		
	$p=1$	$p=2$	$p=3$	$p=1$	$p=2$	$p=3$
$C_{\text{nivel de fortificación}}(\mu\text{g kg}^{-1})= 100$						
Naftaleno	$11,7 \cdot 10^{-03}$	$5,90 \cdot 10^{-03}$	$3,90 \cdot 10^{-03}$	$22,5 \cdot 10^{-03}$	$11,2 \cdot 10^{-03}$	$7,50 \cdot 10^{-03}$
Acenafteno	$11,8 \cdot 10^{-03}$	$5,90 \cdot 10^{-03}$	$3,90 \cdot 10^{-03}$	$2,50 \cdot 10^{-03}$	$1,21 \cdot 10^{-03}$	$0,80 \cdot 10^{-03}$
Antraceno	$3,72 \cdot 10^{-03}$	$1,90 \cdot 10^{-03}$	$1,30 \cdot 10^{-03}$	$1,52 \cdot 10^{-03}$	$0,77 \cdot 10^{-03}$	$0,51 \cdot 10^{-03}$
Fenatreno	$3,14 \cdot 10^{-03}$	$1,60 \cdot 10^{-03}$	$1,00 \cdot 10^{-03}$	$8,10 \cdot 10^{-03}$	$4,12 \cdot 10^{-03}$	$2,70 \cdot 10^{-03}$
Fluoranteno	$6,72 \cdot 10^{-03}$	$3,40 \cdot 10^{-03}$	$2,20 \cdot 10^{-03}$	$12,1 \cdot 10^{-03}$	$6,40 \cdot 10^{-03}$	$4,30 \cdot 10^{-03}$
Pireno	$0,90 \cdot 10^{-03}$	$0,46 \cdot 10^{-03}$	$0,31 \cdot 10^{-03}$	$7,74 \cdot 10^{-03}$	$7,10 \cdot 10^{-03}$	$4,70 \cdot 10^{-03}$
Criseno	$5,93 \cdot 10^{-03}$	$3,00 \cdot 10^{-03}$	$2,00 \cdot 10^{-03}$	$36,5 \cdot 10^{-03}$	$18,0 \cdot 10^{-03}$	$12,0 \cdot 10^{-03}$
$C_{\text{nivel de fortificación}}(\mu\text{g kg}^{-1})= 3000$						
Naftaleno	$2,70 \cdot 10^{-03}$	$1,30 \cdot 10^{-03}$	$0,88 \cdot 10^{-03}$	$36,1 \cdot 10^{-03}$	$17,3 \cdot 10^{-03}$	$11,5 \cdot 10^{-03}$
Acenafteno	$10,0 \cdot 10^{-03}$	$5,00 \cdot 10^{-03}$	$3,30 \cdot 10^{-03}$	$25,6 \cdot 10^{-03}$	$13,5 \cdot 10^{-03}$	$9,00 \cdot 10^{-03}$
Antraceno	$6,40 \cdot 10^{-03}$	$3,20 \cdot 10^{-03}$	$2,20 \cdot 10^{-03}$	$1,76 \cdot 10^{-03}$	$0,88 \cdot 10^{-03}$	$0,58 \cdot 10^{-03}$
Fenatreno	$1,37 \cdot 10^{-03}$	$0,73 \cdot 10^{-03}$	$0,48 \cdot 10^{-03}$	$32,4 \cdot 10^{-03}$	$17,0 \cdot 10^{-03}$	$11,0 \cdot 10^{-03}$
Fluoranteno	$18,0 \cdot 10^{-03}$	$9,00 \cdot 10^{-03}$	$6,00 \cdot 10^{-03}$	$20,7 \cdot 10^{-03}$	$10,4 \cdot 10^{-03}$	$6,90 \cdot 10^{-03}$
Pireno	$6,24 \cdot 10^{-03}$	$3,10 \cdot 10^{-03}$	$2,10 \cdot 10^{-03}$	$27,9 \cdot 10^{-03}$	$14,0 \cdot 10^{-03}$	$9,20 \cdot 10^{-03}$
Criseno	$2,40 \cdot 10^{-03}$	$1,20 \cdot 10^{-03}$	$0,81 \cdot 10^{-03}$	$44,1 \cdot 10^{-03}$	$34,0 \cdot 10^{-03}$	$23,0 \cdot 10^{-03}$
$C_{\text{nivel de fortificación}}(\mu\text{g kg}^{-1})= 20000$						
Naftaleno	$0,40 \cdot 10^{-03}$	$0,20 \cdot 10^{-03}$	$0,13 \cdot 10^{-03}$	$5,33 \cdot 10^{-03}$	$2,64 \cdot 10^{-03}$	$1,76 \cdot 10^{-03}$
Acenafteno	$48,4 \cdot 10^{-03}$	$24,0 \cdot 10^{-03}$	$16,0 \cdot 10^{-03}$	$22,5 \cdot 10^{-03}$	$11,5 \cdot 10^{-03}$	$7,70 \cdot 10^{-03}$
Antraceno	$32,4 \cdot 10^{-03}$	$17,0 \cdot 10^{-03}$	$11,0 \cdot 10^{-03}$	$3,97 \cdot 10^{-03}$	$2,00 \cdot 10^{-03}$	$1,32 \cdot 10^{-03}$
Fenatreno	$2,08 \cdot 10^{-03}$	$1,00 \cdot 10^{-03}$	$0,69 \cdot 10^{-03}$	$15,4 \cdot 10^{-03}$	$7,80 \cdot 10^{-03}$	$5,20 \cdot 10^{-03}$
Fluoranteno	$4,90 \cdot 10^{-03}$	$2,40 \cdot 10^{-03}$	$1,60 \cdot 10^{-03}$	$9,03 \cdot 10^{-03}$	$4,50 \cdot 10^{-03}$	$3,00 \cdot 10^{-03}$
Pireno	$1,02 \cdot 10^{-03}$	$0,51 \cdot 10^{-03}$	$0,34 \cdot 10^{-03}$	$9,80 \cdot 10^{-03}$	$4,90 \cdot 10^{-03}$	$3,30 \cdot 10^{-03}$
Criseno	$22,2 \cdot 10^{-03}$	$11,0 \cdot 10^{-03}$	$7,40 \cdot 10^{-03}$	$19,6 \cdot 10^{-03}$	$15,0 \cdot 10^{-03}$	$10,2 \cdot 10^{-03}$

3.2.3. Incertidumbre del sesgo constante, $\mu(\delta_{cte})$

Estas incertidumbres se presentan en la Tabla 5.

3.2.4. Incertidumbre de la recuperación, $[\mu (\bar{R}_i)]$

Con se menciona en la Sección 3.1.1., los valores de las incertidumbres de las recuperaciones individuales de cada analito con cada método de extracción se obtienen aplicando la Ec. 3, con los datos de varianzas, número de réplicas y número de series obtenidos en el presente estudio. Estas contribuciones de incertidumbre asociadas a la recuperación están presentadas en la Tabla 4.

3.2.5. Cálculo de incertidumbre expandida

En las Tablas 7 y 8 se presentan las contribuciones de incertidumbre calculadas anteriormente, los valores de incertidumbre expandida, $U (k=2)$, y las incertidumbres globales relativas porcentuales para el método UAE y el método Soxhlet, respectivamente. Además, la Figura 2 muestra las incertidumbres globales relativas porcentuales para ambos métodos y los distintos niveles de fortificación. En esta Figura se observa que los valores de incertidumbre son mayores para el menor nivel de fortificación y que la incertidumbre relativa es similar para los analitos más volátiles, trabajando con ambos métodos de extracción. Para los analitos menos volátiles (pireno y criseno), se obtienen mejores valores de incertidumbre con el método Soxhlet. Este método presenta los menores valores de incertidumbre relativa para los dos niveles mayores de evaluación.

Por otra parte, en la Figura 3, se representan las contribuciones relativas porcentuales de cada una de las fuentes de incertidumbre identificadas y

calculadas. En esta Figura se puede apreciar que la contribución de incertidumbre asociada al sesgo constante es significativa y comparable a la contribución asociada a la precisión de cada método, para el nivel más bajo de fortificación. Asimismo, se visualiza que a los niveles de evaluación medio y alto, la contribución del sesgo constante no representa una fuente significativa de incertidumbre.

Respecto a la contribución asociada a la precisión, se observa en las Tablas 7 y 8, que para ambos métodos y para la mayoría de los analitos, la incertidumbre global se reduce significativamente al aumentar el número de análisis desde $p=1$ hasta $p=3$, debido a la disminución de la contribución de incertidumbre asociada a la precisión de cada método. Esto último se puede apreciar en la Figura 4, en la cual se presenta a modo de ejemplo sólo el nivel medio de fortificación. Esta reducción se produce desde el mayor nivel de fortificación al nivel más bajo. Por otra parte, la contribución de incertidumbre asociada a la falta de homogeneidad es no significativa para ambos métodos y para los tres niveles de evaluación. Esta contribución también resulta no significativa, aún adicionándole una componente de incertidumbre asociada a potenciales inestabilidades de los materiales de prueba [por ejemplo:

$$\mu_{inestabilidad} = \mu(F_{\text{hom}})].$$

Tabla 7. UAE

Analito	$\frac{(\mu(R_i)x_{fut})^2}{\bar{R}_i^4}$			$\frac{(\mu(F_{hom}))^2}{\bar{R}_i^2}$	$\frac{\mu(\delta_{cte})^2}{\bar{R}_i^2}$	$\frac{x_{corr}^2 \cdot \mu(R_i)^2}{\bar{R}_i^2}$	$\frac{U}{x_{corr}(\%)}$	$\frac{U}{x_{corr}(\%)}$	$\frac{U}{x_{corr}(\%)}$	$\frac{U}{x_{corr}(\%)}$	$\frac{U}{x_{corr}(\%)}$	
	(p=1)	(p=2)	(p=3)				(p=1)	(p=1)	(p=2)	(p=2)	(p=3)	(p=3)
C_{nivel de fortificación} (µg kg⁻¹)= 100												
Naftaleno	4,11 10 ⁰²	2,05 10 ⁰²	1,37 10 ⁰²	2,79 10 ⁻⁰²	5,96 10 ⁰²	8,92 10 ⁰¹	66	66	60	60	57	57
Acenafteno	1,59 10 ⁰²	0,77 10 ⁰²	0,51 10 ⁰²	5,20 10 ⁻⁰²	0,23 10 ⁰²	1,91 10 ⁰¹	28	28	22	22	19	19
Antraceno	0,15 10 ⁰²	0,08 10 ⁰²	0,05 10 ⁰²	2,06 10 ⁻⁰²	0,01 10 ⁰²	0,56 10 ⁰¹	9	9	8	8	7	7
Fenantreno	0,81 10 ⁰²	0,41 10 ⁰²	0,27 10 ⁰²	2,06 10 ⁻⁰²	2,56 10 ⁰²	3,70 10 ⁰¹	39	39	37	37	36	36
Fluoranteno	1,21 10 ⁰²	0,64 10 ⁰²	0,43 10 ⁰²	2,06 10 ⁻⁰²	3,24 10 ⁰²	3,40 10 ⁰¹	44	44	41	41	40	40
Pireno	2,88 10 ⁰²	2,64 10 ⁰²	1,75 10 ⁰²	3,98 10 ⁻⁰²	12,1 10 ⁰²	11,6 10 ⁰¹	80	80	80	80	77	77
Criseno	3,65 10 ⁰²	1,80 10 ⁰²	1,20 10 ⁰²	2,06 10 ⁻⁰²	8,41 10 ⁰²	14,0 10 ⁰¹	73	73	68	68	66	66
C_{nivel de fortificación} (µg kg⁻¹)= 3000												
Naftaleno	11,4 10 ⁰⁵	5,48 10 ⁰⁵	3,65 10 ⁰⁵	2,91 10 ⁻⁰²	8,28 10 ⁰²	28,7 10 ⁰⁴	2,39 10 ⁰³	80	1,83 10 ⁰³	61	1,62 10 ⁰³	54
Acenafteno	2,30 10 ⁰⁵	1,22 10 ⁰⁵	0,81 10 ⁰⁵	1,55 10 ⁻⁰²	0,09 10 ⁰²	6,75 10 ⁰⁴	1,09 10 ⁰³	36	0,87 10 ⁰³	29	0,77 10 ⁰³	26
Antraceno	0,16 10 ⁰⁵	0,08 10 ⁰⁵	0,05 10 ⁰⁵	1,55 10 ⁻⁰²	0,01 10 ⁰²	0,59 10 ⁰⁴	0,30 10 ⁰³	10	0,2410 ⁰³	8	0,21 10 ⁰³	7
Fenantreno	2,92 10 ⁰⁵	1,53 10 ⁰⁵	0,99 10 ⁰⁵	1,55 10 ⁻⁰²	2,56 10 ⁰²	9,00 10 ⁰⁴	1,24 10 ⁰³	41	0,98 10 ⁰³	33	0,87 10 ⁰³	29
Fluoranteno	7,34 10 ⁰⁵	3,68 10 ⁰⁵	2,44 10 ⁰⁵	3,08 10 ⁻⁰²	6,43 10 ⁰²	12,9 10 ⁰⁴	1,86 10 ⁰³	62	1,41 10 ⁰³	47	1,22 10 ⁰³	41
Pireno	2,51 10 ⁰⁵	1,26 10 ⁰⁵	0,83 10 ⁰⁵	1,55 10 ⁻⁰²	6,25 10 ⁰²	6,75 10 ⁰⁴	1,13 10 ⁰³	38	0,88 10 ⁰³	29	0,78 10 ⁰³	26
Criseno	3,97 10 ⁰⁵	3,06 10 ⁰⁵	2,07 10 ⁰⁵	1,55 10 ⁻⁰²	8,41 10 ⁰²	20,7 10 ⁰⁴	1,56 10 ⁰³	52	1,43 10 ⁰³	48	1,29 10 ⁰³	43
C_{nivel de fortificación} (µg kg⁻¹)= 20000												
Naftaleno	1,27 10 ⁰⁷	0,63 10 ⁰⁷	0,42 10 ⁰⁷	6,49 10 ⁻⁰²	10,8 10 ⁰²	4,00 10 ⁰⁶	8,18 10 ⁰³	41	6,42 10 ⁰³	32	5,73 10 ⁰³	29
Acenafteno	3,17 10 ⁰⁷	1,62 10 ⁰⁷	1,08 10 ⁰⁷	4,99 10 ⁻⁰²	0,17 10 ⁰²	8,26 10 ⁰⁶	12,6 10 ⁰³	63	9,89 10 ⁰³	49	8,74 10 ⁰³	44
Antraceno	0,89 10 ⁰⁷	0,45 10 ⁰⁷	0,30 10 ⁰⁷	6,29 10 ⁻⁰²	0,02 10 ⁰²	1,33 10 ⁰⁶	6,39 10 ⁰³	32	4,82 10 ⁰³	24	4,14 10 ⁰³	21
Fenantreno	0,62 10 ⁰⁷	0,31 10 ⁰⁷	0,21 10 ⁰⁷	2,66 10 ⁻⁰²	2,56 10 ⁰²	1,44 10 ⁰⁶	5,51 10 ⁰³	28	4,27 10 ⁰³	21	3,75 10 ⁰³	19
Fluoranteno	1,14 10 ⁰⁷	0,57 10 ⁰⁷	0,38 10 ⁰⁷	4,72 10 ⁻⁰²	5,76 10 ⁰²	1,64 10 ⁰⁶	7,22 10 ⁰³	36	5,41 10 ⁰³	27	4,66 10 ⁰³	23
Pireno	1,38 10 ⁰⁷	0,69 10 ⁰⁷	0,46 10 ⁰⁷	4,99 10 ⁻⁰²	11,7 10 ⁰²	1,50 10 ⁰⁶	7,82 10 ⁰³	39	5,80 10 ⁰³	29	4,96 10 ⁰³	25
Criseno	2,01 10 ⁰⁷	1,54 10 ⁰⁷	1,05 10 ⁰⁷	4,26 10 ⁻⁰²	13,5 10 ⁰²	6,02 10 ⁰⁶	10,2 10 ⁰³	51	9,26 10 ⁰³	46	8,12 10 ⁰³	41

Tabla 8. SOXHLET

Analito	$\frac{(\mu(R_i)x_{fui})^2}{\bar{R}_i^4}$			$\frac{(\mu(F_{hom}))^2}{\bar{R}_i^2}$	$\frac{\mu(\delta_{cle})^2}{\bar{R}_i^2}$	$\frac{x_{corr}^2 \cdot \mu(R_i)^2}{\bar{R}_i^2}$	$\frac{U}{x_{corr}(\%)}$	$\frac{U}{x_{corr}(\%)}$	$\frac{U}{x_{corr}(\%)}$	$\frac{U}{x_{corr}(\%)}$	$\frac{U}{x_{corr}(\%)}$	
	(p=1)	(p=2)	(p=3)				(k=2)	(k=2)	(k=2)	(k=2)	(k=2)	
	(p=1)	(p=2)	(p=3)				(p=1)	(p=1)	(p=2)	(p=2)	(p=3)	(p=3)
C _{nivel de fortificación} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)= 100												
Naftaleno	4,13 10 ⁰²	2,08 10 ⁰²	1,37 10 ⁰²	3,68 10 ⁻⁰²	12,68 10 ⁰²	4,12 10 ⁰¹	83	83	78	78	72	72
Acenafteno	3,92 10 ⁰²	1,97 10 ⁰²	1,30 10 ⁰²	3,58 10 ⁻⁰²	2,21 10 ⁰²	8,58 10 ⁰¹	53	53	45	45	35	35
Antraceno	0,68 10 ⁰²	0,35 10 ⁰²	0,24 10 ⁰²	2,65 10 ⁻⁰²	0,34 10 ⁰²	2,16 10 ⁰¹	22	22	19	19	15	15
Fenantreno	0,31 10 ⁰²	0,16 10 ⁰²	0,10 10 ⁰²	1,96 10 ⁻⁰²	2,56 10 ⁰²	1,22 10 ⁰¹	35	35	34	34	33	33
Fluoranteno	2,65 10 ⁰²	1,34 10 ⁰²	0,87 10 ⁰²	3,89 10 ⁻⁰²	10,5 10 ⁰²	3,97 10 ⁰¹	74	74	70	70	66	66
Pireno	0,09 10 ⁰²	0,05 10 ⁰²	0,03 10 ⁰²	1,96 10 ⁻⁰²	0,36 10 ⁰²	0,40 10 ⁰¹	14	14	13	13	13	13
Criseno	0,59 10 ⁰²	0,30 10 ⁰²	0,20 10 ⁰²	1,96 10 ⁻⁰²	1,00 10 ⁰²	2,40 10 ⁰¹	27	27	25	25	22	22
C _{nivel de fortificación} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)= 3000												
Naftaleno	1,21 10 ⁰⁵	0,58 10 ⁰⁵	0,39 10 ⁰⁵	3,21 10 ⁻⁰²	15,06 10 ⁰²	1,86 10 ⁰⁴	0,75 10 ⁰³	25	0,56 10 ⁰³	18	0,28 10 ⁰³	9
Acenafteno	0,90 10 ⁰⁵	0,45 10 ⁰⁵	0,30 10 ⁰⁵	1,44 10 ⁻⁰²	1,21 10 ⁰²	2,97 10 ⁰⁴	0,69 10 ⁰³	23	0,55 10 ⁰²	18	0,35 10 ⁰³	12
Antraceno	0,58 10 ⁰⁵	0,29 10 ⁰⁵	0,20 10 ⁰⁵	1,44 10 ⁻⁰²	0,25 10 ⁰²	1,89 10 ⁰⁴	0,55 10 ⁰³	18	0,44 10 ⁰³	15	0,28 10 ⁰³	9
Fenantreno	0,12 10 ⁰⁵	0,06 10 ⁰⁵	0,04 10 ⁰⁵	1,44 10 ⁻⁰²	2,56 10 ⁰²	0,49 10 ⁰⁴	0,26 10 ⁰³	9	0,22 10 ⁰³	7	0,14 10 ⁰³	5
Fluoranteno	4,84 10 ⁰⁵	2,43 10 ⁰⁵	1,61 10 ⁰⁵	2,49 10 ⁻⁰²	9,16 10 ⁰²	9,04 10 ⁰⁴	1,52 10 ⁰³	51	1,16 10 ⁰³	39	0,60 10 ⁰³	20
Pireno	1,37 10 ⁰⁵	0,68 10 ⁰⁵	0,46 10 ⁰⁵	2,25 10 ⁻⁰²	0,56 10 ⁰²	4,22 10 ⁰⁴	0,85 10 ⁰³	28	0,66 10 ⁰³	22	0,41 10 ⁰³	14
Criseno	0,22 10 ⁰⁵	0,11 10 ⁰⁵	0,07 10 ⁰⁵	1,44 10 ⁻⁰²	10,0 10 ⁰²	0,50 10 ⁰⁴	0,33 10 ⁰³	11	0,25 10 ⁰³	8	0,14 10 ⁰³	5
C _{nivel de fortificación} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)= 20000												
Naftaleno	0,56 10 ⁰⁷	0,28 10 ⁰⁷	0,19 10 ⁰⁷	4,80 10 ⁻⁰²	12,68 10 ⁰²	0,10 10 ⁰⁶	1,63 10 ⁰³	8	1,24 10 ⁰³	6	0,64 10 ⁰³	3
Acenafteno	1,94 10 ⁰⁷	0,96 10 ⁰⁷	0,64 10 ⁰⁷	2,56 10 ⁻⁰²	1,21 10 ⁰²	6,80 10 ⁰⁶	10,2 10 ⁰³	51	8,1 10 ⁰³	40	5,22 10 ⁰³	26
Antraceno	1,30 10 ⁰⁷	0,68 10 ⁰⁷	0,44 10 ⁰⁷	2,56 10 ⁻⁰²	0,25 10 ⁰²	6,00 10 ⁰⁶	8,71 10 ⁰³	44	7,15 10 ⁰³	36	4,90 10 ⁰³	24
Fenantreno	0,05 10 ⁰⁷	0,04 10 ⁰⁷	0,03 10 ⁰⁷	2,56 10 ⁻⁰²	2,56 10 ⁰²	0,29 10 ⁰⁶	1,76 10 ⁰³	9	1,66 10 ⁰³	8	1,07 10 ⁰³	5
Fluoranteno	0,86 10 ⁰⁷	0,42 10 ⁰⁷	0,28 10 ⁰⁷	5,38 10 ⁻⁰²	11,11 10 ⁰²	1,68 10 ⁰⁶	6,43 10 ⁰³	32	4,86 10 ⁰³	24	2,59 10 ⁰³	13
Pireno	0,24 10 ⁰⁷	0,12 10 ⁰⁷	0,08 10 ⁰⁷	6,25 10 ⁻⁰²	0,88 10 ⁰²	0,39 10 ⁰⁶	3,36 10 ⁰³	17	2,53 10 ⁰³	13	1,25 10 ⁰³	6
Criseno	0,89 10 ⁰⁷	0,44 10 ⁰⁷	0,30 10 ⁰⁷	2,56 10 ⁻⁰²	1,00 10 ⁰²	4,40 10 ⁰⁶	7,29 10 ⁰³	36	5,93 10 ⁰³	30	4,20 10 ⁰³	21

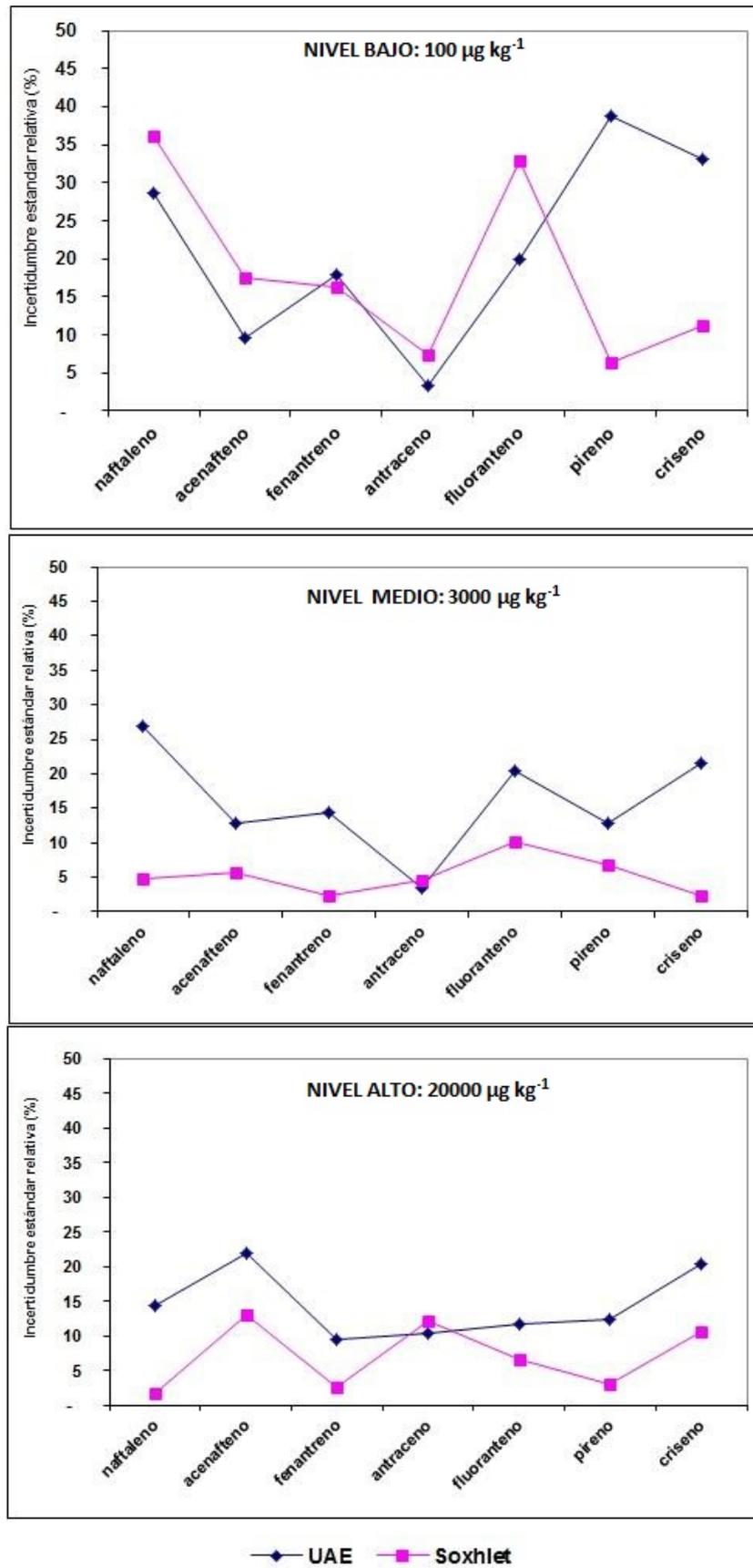


Figura 2: Incertidumbre relativa (%) para ambos métodos de extracción (p=3)

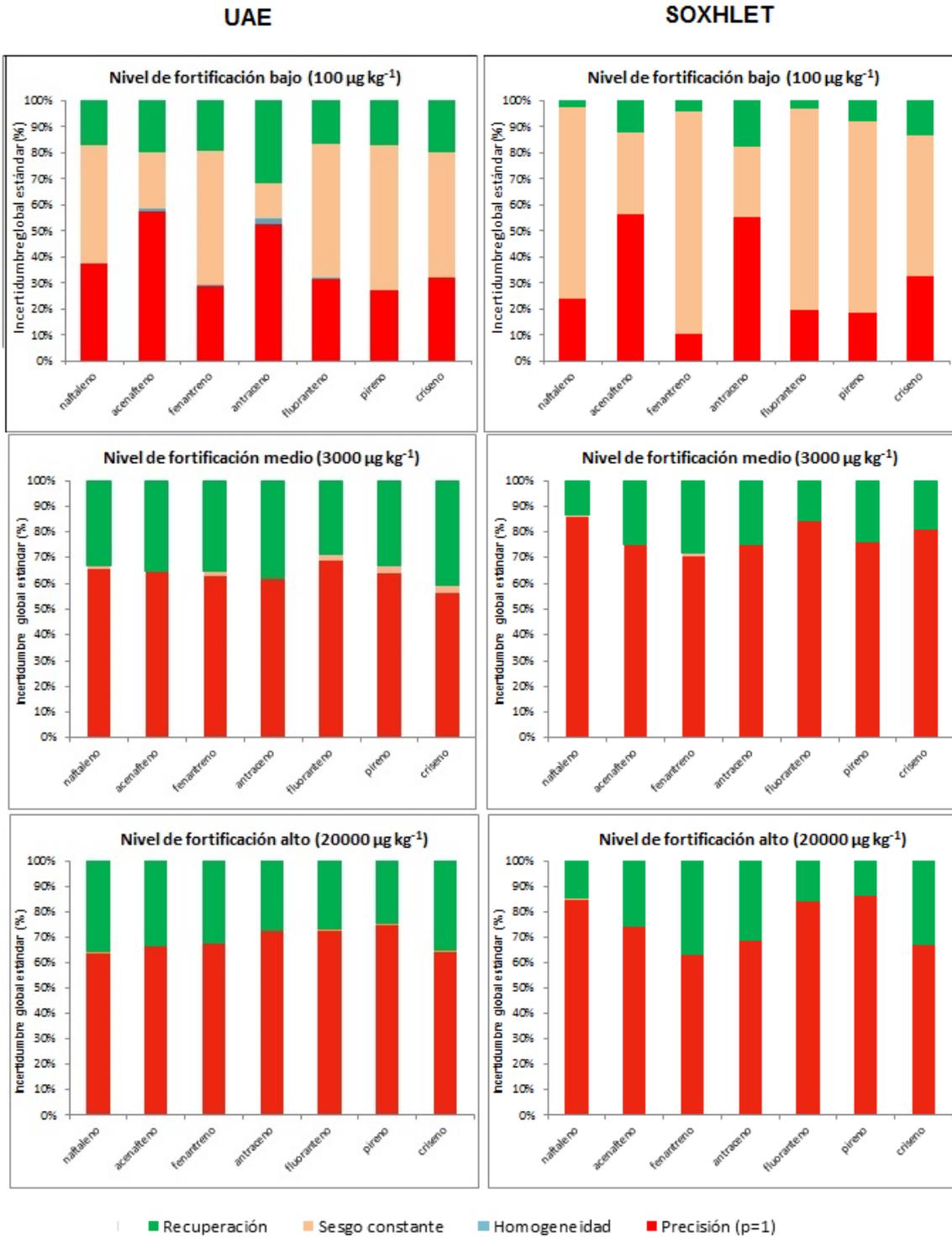
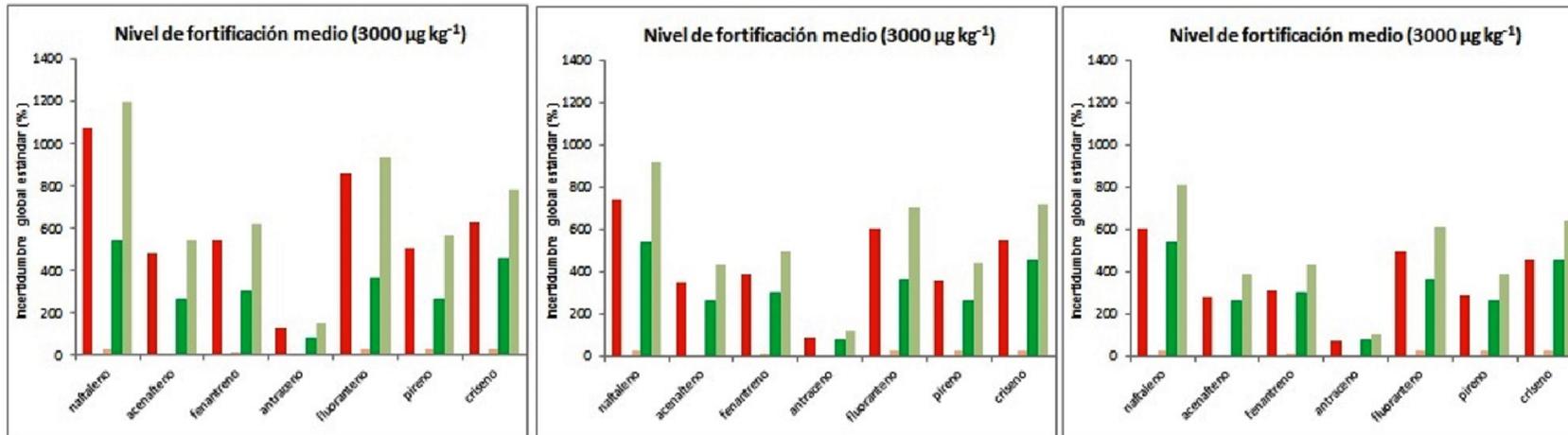
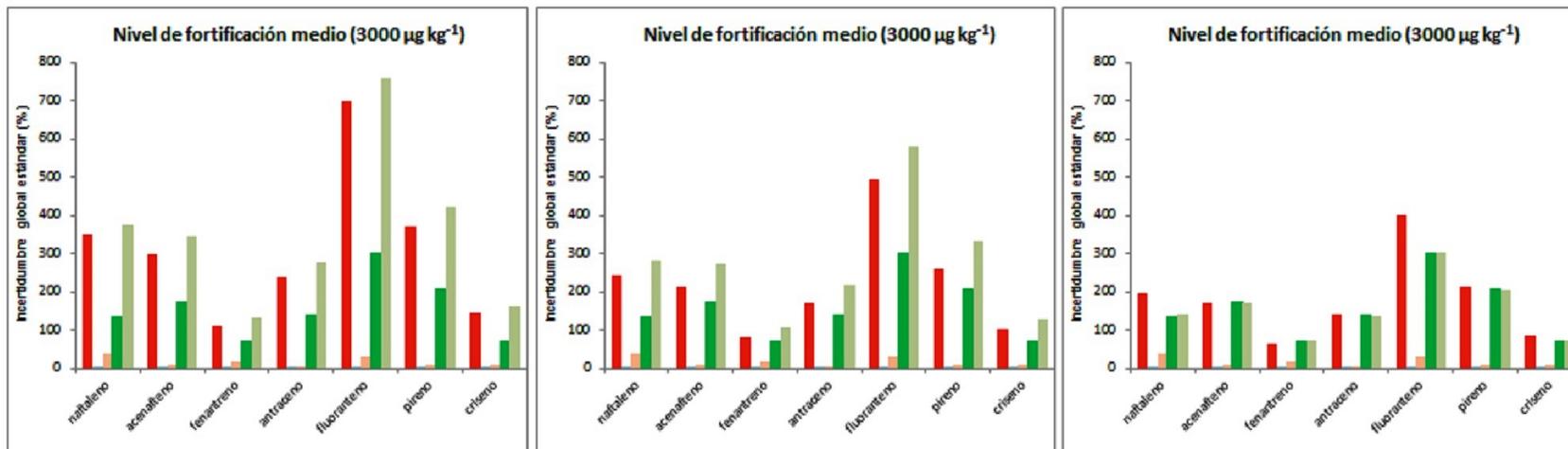


Figura 3: Contribuciones relativas de incertidumbre para ambos métodos de extracción ($p=3$)

UAE



SOXHLET



$p=1$

$p=2$

$p=3$

■ Precisión ($p=1$) ■ Homogeneidad ■ Sesgo constante ■ Recuperación ■ Incertidumbre global

Figura 4: Efecto de la precisión de cada método ($p=1$, $p=2$ y $p=3$) en el balance de incertidumbre

4. Conclusiones

Se ha logrado preparar tres materiales de prueba de diferentes niveles de concentración, suficientemente homogéneos, que resultan de utilidad e importancia para evaluar la veracidad y calcular la incertidumbre de dos métodos de extracción normalizados diferentes.

El balance de incertidumbre de ambos métodos indica cómo se puede disminuir significativamente la incertidumbre de ambos métodos, cuando se amplía el número de análisis realizados en las condiciones de precisión intermedia de cada método.

A bajos niveles de concentración, el sesgo constante contribuye significativamente en el balance de incertidumbre para ambos métodos de extracción. Esto demuestra que, cuando se realizan determinaciones analíticas en niveles de concentración próximos a los límites de cuantificación, este sesgo cumple un rol fundamental en el balance de incertidumbre y debe ser calculado. Sin embargo, a los otros dos niveles de concentración estudiados, este sesgo no representa un efecto significativo en el balance de incertidumbre.

Cabe destacar que, teniendo en cuenta el análisis de la evaluación estadística realizada para cada nivel de concentración, para cada método utilizado en el pretratamiento, no se puede calcular una recuperación global de manera simplificada, puesto que los resultados de las recuperaciones obtenidos presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Respecto al análisis comparativo de las incertidumbres globales entre ambos métodos, se destaca una marcada ventaja del método Soxhlet respecto del método UAE, cuando se trabaja a los dos niveles mayores de fortificación.

En cambio, el método UAE resulta más ventajoso para cuantificar los analitos más volátiles en el nivel de concentración más bajo.

Bibliografía

- [1] European Commission, Health and Consumer Protection **Directorate-General. Document SCF/CS/CNTM/PAH/29 add1 final Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects.** Brussels - Belgium. 2002.
- [2] U.S. EPA. **Development of a Relative Potency Factor (RPF) approach for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) mixtures (External Review Draft).** U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/635/R-08/012A, 2010.
- [3] World Health Organization. IARC **Monographs. Volume 103.** Lyon. France. 2013.
- [4] M.D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, **J. Chromatog A**, 1217 (2010) 2383–2389.
- [5] M. Marini, E. Frapiccini, **Chemosphere** 90 (2013) 1839–1846.
- [6] T. Oluseyi, K. Olayinka, B. Alo, R. M. Smith, **Int. J. Environ. Res.**, 5(3):681-690, Summer 2011.
- [7] Y.F Song, X Jingb, S Fleischmannc, B.-M Wilkec, **Chemosphere** 48 (2002) 993–1001)
- [8] D. R. Banjoo, P.K. Nelson. **J. Chromatog. A**, 1066 (2005) 9–18.
- [9] V. Flotron, J. Houessou, A. Bosio, C. Delteil, A. Bermond, V. Camel. **J. Chromatog. A**, 999 (2003) 175–184.
- [10] International Organization for Standardization, **ISO 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories**, ISO Geneva, 2005.

- [11] USEPA, Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), **EPA Method 8270D**, Revision 4, United States Environmental Protection Agency, Ohio, PA 45268, 2007.
- [12] N.Tombesi, R.Freije, F. Augusto, **Extech 2005: Advances in Extraction Technologies**. Unicamp. Brasil. 2005.
- [13] USEPA, Soxhlet extraction, **EPA Method 3540**, Revision 3, US Government Printing Office, Washington, DC, USA, 1996.
- [14] A. Criado, S. Cárdena, M. Gallego, M. Valcárcel, **J. Chromatog. A** 1050 (2004) 111-118.
- [15] Buchman, M. F. (2008). NOAA screening quick reference tables. **NOAA Hazmat Report**, 08-1, 34 pag. Seattle, WA, USA.
- [16] M. P. Llupart, R.A. Lorenzo, R. Cela, K. Li, J. M. R. Bélanger, J. R. Jocelyn Pare, **J. Chromatog. A** 774 (1997) 243-251.
- [17] T. Fearn, M. Thompson, **Analyst** 126 (2001) 1414-1417.
- [18] W. Wang, B. Meng, X. Lu, Y.Liu, S. Tao, **Anal. Chim. Acta** 602 (2007) 211-222.
- [19] R. Boque, F.X. Rius, D.L. Massart, **J. Chem. Educ.** 71 (1994) 230–232.
- [20] Region 1 EPA-NE, **Data Validation Functional Guidelines for Evaluating Environmental Analyses, Part II, Section VOA/SV-IX**; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Science and Technology:Washington, DC, 1996.
- [21] W.J. Youden, **Anal. Chem.** 19 (1947) 946-950.
- [22] A. Maroto, R. Boque, J. Riu, F.X. Rius, **Anal. Chim. Acta** 440 (2001) 171-184.

Capítulo V

Conclusiones Finales

El estudio y la cuantificación de la incertidumbre de diferentes procesos de medición química representan el eje principal de este trabajo de tesis. Para llevar a cabo estos estudios se seleccionaron metodologías analíticas aplicadas rutinariamente en la determinación de analitos de importancia ambiental. En todos los casos estudiados, se plantean escenarios desfavorables respecto de la disponibilidad de referencias de alta jerarquía metrológica (métodos absolutos, materiales de referencia certificados, métodos de referencia acreditados).

A continuación se detallan las conclusiones que se obtienen a partir de los objetivos enunciados en el Capítulo I:

1. Se desarrolla y presenta una metodología donde se calcula la incertidumbre de los resultados obtenidos en la determinación de mercurio en aguas residuales industriales, utilizando la información obtenida de un ejercicio de interlaboratorio diseñado a tal fin. La metodología propuesta permite alcanzar los siguientes objetivos:

- a) Diseñar y conducir un ejercicio de interlaboratorio con un bajo número de laboratorios participantes (>5 laboratorios) y a dos diferentes niveles de concentración de mercurio en una matriz compleja.
- b) Obtener información que resulta de gran utilidad, no sólo para el cálculo de la incertidumbre asociada a los resultados analíticos obtenidos en los ensayos de rutina, sino que además permite evaluar el desempeño de los laboratorios participantes.

La metodología propuesta requiere del esfuerzo conjunto de los laboratorios participantes y del laboratorio coordinador del ejercicio interlaboratorio, pero permite resolver, de manera metódica y rigurosa, la problemática común planteada por dichos laboratorios respecto de la cuantificación de la incertidumbre de sus resultados y de la valoración de sus desempeños individuales.

2. Posteriormente, se presenta y desarrolla una metodología que permite calcular la incertidumbre de los resultados obtenidos en la determinación de PAHs totales. La metodología propuesta utiliza la información de la evaluación de la exactitud de dicho ensayo químico en un intervalo restringido de concentraciones de interés regulatorio. De esta forma se logra:

- a) Producir un material de referencia en el laboratorio que reúne las características de representatividad, homogeneidad, estabilidad e incertidumbre necesarias para detectar y cuantificar el sesgo del método analítico, como así también para evaluar la precisión del mismo. Adicionalmente, el material producido puede ser utilizado en el proceso de optimización de un nuevo método desarrollado en el laboratorio.
- b) Calcular la incertidumbre de los resultados y establecer el balance de incertidumbres de los dos métodos analíticos estudiados (normalizado y desarrollado en el laboratorio).
- c) Establecer que la etapa de sub-muestreo del proceso analítico es la fuente de incertidumbre más significativa y recomendar el desarrollo y aplicación de procedimientos de validación de procesos de sub-muestreo o división de muestras que se practican en los laboratorios de rutina.

La metodología propuesta utiliza la información generada en cada laboratorio, sin requerir de esfuerzos adicionales a los necesarios para cumplir con el proceso de validación del método analítico y con el requisito de estimación de la incertidumbre de la calibración y uso de balanzas analíticas.

3. Por último, se estudian la significación del sesgo y el balance de incertidumbres de dos procesos de medición química estandarizados para la determinación de hidrocarburos aromáticos polinucleares en muestras de barros residuales industriales, empleando la técnica GC-MS. Los estudios se basan en la información que se obtiene cuando la exactitud de ambos métodos se evalúa utilizando 3 materiales de prueba, representativos de la matriz real de rutina y preparados en el laboratorio, con niveles de concentración de interés regulatorio. Los resultados de estos estudios permiten concluir que:

- a) Los materiales de prueba preparados en el laboratorio son muy útiles para detectar y cuantificar los sesgos constante y proporcional (en términos de recuperación) de los dos métodos estudiados, como así también permiten evaluar la precisión y cuantificar todas las contribuciones de incertidumbre de ambos procesos de medición.
- b) Es factible establecer el balance de incertidumbre de ambos métodos para cada nivel de concentración. El análisis de estos balances permite identificar al sesgo constante como la principal contribución de incertidumbre para el nivel de concentración menor (cercano a los límites de cuantificación de los laboratorios de rutina).
- c) Se puede disminuir significativamente la incertidumbre de los resultados obtenidos con ambos métodos cuando se amplía el número

de análisis realizados en las condiciones de precisión intermedia de cada método (desde $p=1$ a $p=3$).

d) El método de extracción tradicional Soxhlet presenta una marcada ventaja respecto del método UAE, cuando se trabaja a los dos niveles mayores de fortificación de los materiales de prueba. El método UAE resulta más ventajoso para cuantificar los analitos más volátiles en el menor nivel de fortificación.

La metodología presentada puede ser aplicada en los laboratorios de análisis de rutina para evaluar la exactitud y cuantificar la incertidumbre de sus resultados. Sólo requiere del esfuerzo adicional de preparar y verificar los materiales de prueba necesarios para el/los nivel/es de concentración evaluado/s.

Las conclusiones que surgen de estos estudios aportan información relevante para la selección y cuantificación de la incertidumbre de metodologías de extracción y determinación de hidrocarburos aromáticos polinucleares (considerados de criterio por la EPA) en muestras de una matriz compleja como los barros residuales industriales.

Apéndice

Producción derivada de esta Tesis

Publicaciones

“Quantification of uncertainty in mercury wastewater analysis at different concentration levels and using information from proficiency test with a limited number of participants”. M.T. Pereyra, A. G. Lista y B.S. Fernández Band.

Talanta, (2013) 111, 69-75.

“Measurement uncertainty estimated from accuracy assessment by using an in-house reference material: Two case studies for the extraction of total PAH in industrial wastewater sludges”.

M. T. Pereyra, B. S. Fernández Band, A. G. Lista.

Microchem J, DOI 10.1016/j.microc.2014.12.001.

“A comparative study of measurement uncertainty of two EPA extraction methods for PAHs in industrial sludges”.

M. T. Pereyra, B. S. Fernández Band, R. Boqué, J. Riu, A. G. Lista.

En redacción.

Publicaciones en Actas de Congresos

“Estimación de la incertidumbre analítica empleando la información obtenida en ensayos de aptitud interlaboratorios con número limitado de participantes”.

M. T. Pereyra, A. G. Lista y B.S. Fernández Band.

II Reunión Argentina Geoquímica de la Superficie, 23-27/4/12, Editorial de la Universidad Nacional del Sur, 2012, ISBN 978-987-1620-86-9

Trabajos presentados en reuniones científicas

- ***1º Congreso Ibero-Americano de Química Analítica;*** Niteroi, Brasil; 12-16/09/05.
- ***Evaluación de la incertidumbre de la etapa de pretratamiento de un proceso de análisis,*** M. T. Pereyra, A. G. Lista y B. S. Fernández Band.

- **VI Congreso Argentino de Química Analítica**, Santa Fe, Argentina, 26-29/09/11.
 - *Evaluación comparativa de la incertidumbre de dos métodos de extracción para el análisis de hidrocarburos aromáticos polinucleares en sedimentos contaminados.* M. Pereyra, C. Domini, A.G. Lista, B.S. Fernández Band.

- **II Reunión Argentina de Geoquímica de la Superficie**, Bahía Blanca, Argentina, 23-27 abril de 2012.
 - *Estimación de la incertidumbre analítica empleando la información obtenida en ensayos de aptitud interlaboratorios con número limitado de participantes,* M. T. Pereyra; A. G. Lista y B. S. Fernández Band.