

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

**Implementación de una metodología para
determinar Carbono Orgánico Total (COT)
mediante una técnica espectrofotométrica en el
visible**



Trabajo para optar al título de Químico Analista

ARIEL ALEJANDRO LESTRADE GONZALEZ

Profesor Guía

Dra. Gladys Vidal Sáez

MARZO 2007

AGRADECIMIENTOS

- A Dios
- A mi familia, en especial a mi madre y abuelas.
- A mi profesora guía Dra. Gladys Vidal S.
- A mis compañeros y amigos de Licenciatura en Química-Químico y Químico analista.
- A mis amigos en general.
- Al grupo de biotecnología del Centro EULA-Chile, Marioly, Mayra, Alejandra, Pancho, Soledad y en especial a Marisol (Pelu).
- A la Sra. Jacqueline Decap.
- A todas las personas que me acompañaron durante estos largos años de estudio.

...A TODOS GRACIAS.

RESUMEN

La realización de este trabajo tiene por objetivo, implementar una técnica para la determinación del Carbono Orgánico Total (COT) mediante espectrofotometría de luz visible, estableciendo para ello algunos parámetros analíticos tales como: linealidad, exactitud, precisión, límites de detección (LD) y cuantificación (LC).

Para la determinación del COT, se utilizó un set de reactivos comerciales HACH de rango alto, 100-700 miligramos de carbono por litro (mg C /L)

Para determinar los parámetros del COT, este trabajo se desarrolló en dos etapas. La primera de ella, fue realizar un análisis preliminar para determinar la presencia de materia orgánica en la muestra usando la metodología de la Demanda Química de Oxígeno (DQO), y posteriormente se procedió a la determinación del COT en la muestra.

Los resultados obtenidos, muestran una buena linealidad en las curvas de calibración, mientras que los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) alcanzados fueron de 6,7 y 20,1 mg/L, respectivamente.

Referente a la reproducción de este método, los resultados señalan un coeficiente de variación menor al 3%, estos es aceptable e indica que este método tiene una buena precisión.

Con respecto a los porcentajes de recuperación, estos alcanzaron aproximadamente un 95%, lo que indica que este método presenta una buena exactitud.

INDICE

	Paginas
I. INTRODUCCION	6
1. Medición de materia orgánica en el agua	6
2. Métodos para medir COT	8
3. Propiedades analíticas para los métodos	9
II. OBJETIVOS	11
1. Objetivo general	11
2. Objetivos específicos	11
III. MATERIALES Y REACTIVOS	12
1. Instrumentos	12
2. Materiales	12
3. Reactivos	12
IV. ANALISIS PRELIMINAR PARA DETERMINAR CARGA ORGÁNICA	14
1. Determinación de la DQO	14
1.1. Principio	14
1.2. Procedimiento	14
1.3. Curvas de calibración a 600nm	15
1.4. Resultados previos	15
V. METODOLOGIA	18
1. Determinación de COT	18
1.1. Principio	18
1.2. Procedimiento	18
VI. PARAMETROS ANALITICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COT	20
1. Linealidad	20
2. Precisión	21
3. Repetibilidad	22
4. Exactitud	23
5. Límite de detección	24
6. Límite de cuantificación	25
VII. RESULTADOS Y DISCUSION	26
1. Barrido de longitud de onda	26
2. Linealidad	27
3. Repetibilidad	29
4. Exactitud	30
5. Límite de detección y de cuantificación	31

VIII	CONCLUSIONES	33
IX	BIBLIOGRAFIA	34

I. INTRODUCCION

1. Medición de materia orgánica en el agua

El agua es un recurso natural de gran importancia, y a pesar de ser abundante en el planeta, es considerada un recurso limitado. Debido a la actividad humana, en la actualidad existe una gran preocupación por lo que sucede con este recurso que es cada vez más escaso, debido a la contaminación de los cuerpos de aguas (ríos, lagos, mar, etc.), debido a la acción antropogénica, entre otros.

En Chile, según la Ley de Bases del Medio Ambiente, la contaminación es definida como: “La presencia en el ambiente de sustancias, elementos, energía o combinación de ellos, en concentraciones y permanencia superiores o inferiores, según corresponda, a las establecidas en la legislación vigente”. De esta manera los contaminantes que afectan la calidad del agua se pueden clasificar en tres: físicos, químicos y biológicos.

Dentro de los contaminantes químicos, se encuentran tres tipos: 1) los compuestos que forman parte de los ciclos biogeoquímicos (tales como: amonio, nitrito, nitrato y fósforo); 2) microcontaminantes (inorgánicos y orgánicos); y 3) contaminantes orgánicos (cómo: proteínas, carbohidratos, aceites y grasas y otros compuestos como, los tensioactivos, fenoles, organoclorados y organofosforados, etc.

Los compuestos orgánicos están formados principalmente por combinaciones de carbono , hidrógeno y oxígeno , junto con nitrógeno , azufre , calcio , magnesio , fósforo , hierro , entre otros. Los principales grupos de sustancias orgánicas que se encuentran presentes en el agua residual son mayoritariamente las proteínas (40-60%), hidratos de carbono (25-50%), grasas y aceites (10%) (Millán, 1994).

Como lo indica la Figura 1, la descomposición de estos compuestos se desarrolla mientras exista materia orgánica y oxígeno disuelto en el medio.

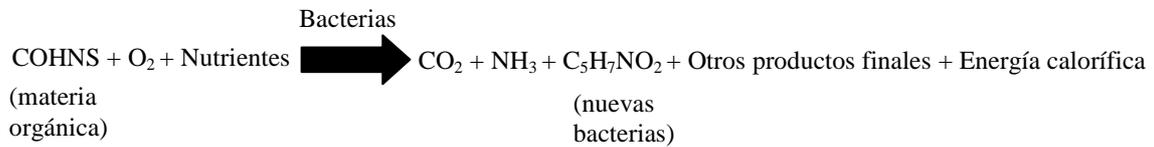


Figura 1. Degradación de la materia orgánica en presencia de oxígeno.

La contaminación de tipo orgánica, es una de las más importantes en magnitud, y sus fuentes son en general de origen doméstico (vertidos urbanos), industrial, agrícola y ganadero. Para medir esta contaminación en el agua de forma global, existen tres índices: DQO, DBO₅ y COT.

La DQO, es definida como la cantidad equivalente de oxígeno consumido por las materias (orgánica e inorgánicas) presentes en el agua, incluyendo compuestos biodegradables y no biodegradables. Para ello se utiliza como oxidante dicromato de potasio en exceso, en medio ácido sulfúrico, en caliente, y en presencia de sulfato de plata, que actúa como catalizador, y de sulfato mercurio para eliminar la interferencia del ion cloruro (Metcalf & Eddy, 1995). Este ensayo es empleado tanto para aguas naturales como residuales, que contengan compuestos tóxicos para la vida biológica (Metcalf & Eddy, 1995). Algunos valores de DQO en aguas no contaminadas, oscilan entre los 1-5 mg/L; para aguas residuales urbanas estos valores aumentan y fluctúan entre los 250-600 mg/L; mientras que en aguas industriales estos valores son ampliamente superados dependiendo del tipo de industria.

La DBO₅, es definida como la medida de la cantidad de oxígeno disuelto requerido para la oxidación de la materia orgánica biodegradable mediante la acción de microorganismos aerobios (Ramalho, 1996). Este parámetro de contaminación orgánica es ampliamente utilizado (Millán, 1994). Habitualmente este ensayo se realiza a 5 días (DBO₅), y puede ser empleado tanto para aguas naturales como para aguas residuales. La correlación entre las medidas del contenido de materia orgánica expresadas en DBO₅ y DQO, indican la biodegradabilidad de la materia contaminante. Un cociente entre DBO₅/DQO para aguas

urbanas por ejemplo, fluctúa entre 0,4-0,8. Mientras que para vertidos de tipo inorgánico este valor del cociente es menor a 0,2, y para vertidos de tipo orgánico es mayor a 0,6 (Metcalf & Eddy, 1995). La determinación de la DBO₅, tiene su principal aplicación en las aguas servidas que llegan a una planta de tratamiento, y además nos permite evaluar la eficiencia del sistema de tratamiento empleado, expresado como porcentaje de eliminación de DBO₅ en el sistema.

Con respecto al COT, este método permite medir el contenido total de carbono presente en el agua, ya sea como compuestos orgánicos fijos o volátiles, naturales o sintéticos, especialmente indicado para bajas concentraciones de materia orgánica. En general, este método se lleva a cabo inyectando una cantidad conocida de muestra, en un horno a alta temperatura o en un medio químicamente oxidante. En presencia de un catalizador, el carbono orgánico se oxida a anhídrido carbónico. En aguas residuales urbanas la concentración de COT puede fluctuar entre los 80-290 mg/L (Metcalf & Eddy, 1995).

2. Métodos para medir COT

El método más común para la medición del COT, están basados en la aplicación de calor y oxígeno, irradiación ultravioleta (UV), oxidantes químicos, o combinaciones de estos, para convertir el carbono orgánico en CO₂. El CO₂ puede ser medido directamente mediante equipos, como un analizador infrarrojo no dispersivo (IRND), se puede reducir a metano (CH₄), y se mide con un detector de ionización de llama (FID) (Campos *et al.*, 2006).

Al no tener equipos sofisticados para la medición del COT, este trabajo pone énfasis en el método directo de la medida de COT, mediante una técnica espectrofotométrica donde el COT, bajo las condiciones del ensayo el carbono orgánico se transforma en CO₂ mediante la digestión con persulfato. Luego el CO₂, es burbujado a una solución con indicador de pH, reaccionando a ácido carbónico. El cambio de color que se produce en esta reacción, será directamente proporcional a la concentración de carbono orgánico presente en la muestra.

3. Propiedades analíticas de los métodos

En general, las propiedades analíticas se pueden dividir en tres grupos según su importancia relativa. Las fundamentales como: exactitud y representatividad; las básicas como: precisión, sensibilidad y selectividad; y las complementarias como: la rapidez, costo, grado de participación humana, robustez y seguridad personal.

La calidad de los resultados de un método o análisis, estará definido por dos propiedades básicas: la exactitud, que es el grado de concordancia entre el resultado obtenido experimental y el valor verdadero o valor garantizado al máximo; y la representatividad, que puede definirse como el grado de concordancia entre la muestra tomada y la definición del problema analítico a resolver.

La exactitud debe ir acompañada de un nivel adecuado de precisión, que es el grado de concordancia entre un resultado y un conjunto de ellos, obtenidos aplicando el mismo procedimiento analítico a la misma muestra en condiciones idénticas o muy distintas. No obstante, puede darse la situación que un proceso analítico sea exacto y no preciso.

Por otra parte no podrá alcanzarse el valor verdadero, sino se garantiza la ausencia de todo tipo de interferencias, y sin que se alcance el nivel de sensibilidad adecuado a la concentración de los analitos.

La representatividad, por otro lado se basa en un muestreo adecuado fundamentado en una buena definición de los objetivos, la existencia de un plan de muestreo y un control estadístico.

En resumen, la exactitud y la representatividad respecto al problema analítico son las propiedades analíticas definitorias de la calidad de los resultados y en definitiva de la calidad de los laboratorios analíticos (Acevedo, 1994)

Para la realización de este método, se evaluarán algunos parámetros de validación, con el objetivo de producir resultados confiables acerca de la presencia y/o concentración de un analito en una muestra determinada, estos parámetros son:

- Linealidad
- Precisión
- Exactitud
- Límites de Detección (LD)
- Límites de Cuantificación (LC)

II. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Implementar una metodología analítica para la determinación del Carbono Orgánico Total (COT) mediante una técnica espectrofotométrica.

2. Objetivos específicos

- Determinar la linealidad del método para el análisis de COT.
- Determinar la precisión y exactitud del método para el análisis de COT.
- Determinar el límite de detección y cuantificación del método para el análisis de COT.

III. MATERIALES Y REACTIVOS

1. Instrumento

- Espectrofotómetro, Spectronic Unicam UV-Visible Serie GENESYS™ 10

2. Materiales

- Cubetas de vidrio
- Pipetas totales de 0,5, 1, 2, 3 mL
- Matraces aforados de 5, 50, 1000 mL
- Vaso de precipitado de 20 mL
- Micropipeta BRAND de 100-1000 µL
- Pipeta automática BRAND 0,5-5mL
- Reactor DQO HACH con control de tiempo y temperatura
- Balanza analítica Precisa XB 120A (0,0001g)
- Placa agitadora Velp Scientifica serie 100,164
- Cronómetro
- Bureta de 50 mL
- Agitador magnético
- Embudo plástico
- Puntillas, lápiz rotulador, parafilms
- Papel indicador de pH

3. Reactivos

- Solución estándar de ftalato ácido de potasio de 1000 mgC/L
- Solución Buffer pH=2,0
- Persulfato de potasio para COT
- Ampollas indicadoras de COT rango medio/alto

- Tubos ácidos de digestión para el rango alto de COT
- Agua libre de materia orgánica
- Solución digestora ($K_2Cr_2O_7(S)$ + $HgSO_4(S)$ + $H_2SO_4(C)$)
- Solución catalítica ($Ag_2SO_4(S)$ + $H_2SO_4(C)$)
- Disolución patrón 1000 mg/L de ftalato ácido de potasio ($KC_8H_5O_4$)
- D(+)-Glucosa ($C_6H_{12}O_6$)
- Dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ p.a
- Sulfato de mercurio $HgSO_4$ p.a.
- Sulfato de plata Ag_2SO_4 p.a.
- Acido sulfúrico concentrado H_2SO_4

IV. ANALISIS PRELIMINAR PARA DETERMINAR CARGA ORGANICA

1. Determinación de la DQO

1.1. Principio

La DQO, designa a la masa de oxígeno contenida en un volumen de agua necesaria para oxidar por medio químico los compuestos orgánicos a CO_2 , junto al material inorgánico capaz de sufrir oxidación. Es un parámetro importante para evaluar el grado de contaminación de las aguas a causa del vertido de residuos industriales líquidos, y además es útil para verificar el grado de eficiencia de una planta de tratamiento, entre otros.

Para la determinación de la DQO, se requiere de un agente oxidante que provoca la degradación de la materia orgánica, y que habitualmente es una solución de dicromato de potasio en ácido sulfúrico concentrado. De esta manera, la cantidad de materia orgánica oxidable, será proporcional al dicromato consumido.

1.2. Procedimiento

Para la digestión de las muestras se utilizaron tubos de vidrios resistentes a altas temperaturas (150°C) provistos de tapa rosca.

Preparación de solución digestora: Se disuelven 10,2160 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y 33,000 g de HgSO_4 en 500 mL de agua destilada. Se añaden 167 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se completa a volumen de 1000 mL.

Preparación solución catalítica: Se disuelven 10,700 g de Ag_2SO_4 en un litro de ácido sulfúrico concentrado. Se deja la mezcla en reposo durante dos días hasta su completa disolución.

En el tubo de digestión se añadieron 2,5 mL de la muestra de glucosa, posteriormente se le agregaron 1,5 mL de solución digestora y 3,5 mL de solución catalítica. Paralelamente se preparó un blanco, el cual contenía 2,5 mL de agua destilada. Luego se procedió a tapar los tubos, y agitarlos para homogenizar la muestra. Posteriormente fueron llevados al reactor e incubados durante 2 horas a 150°C, con el objetivo de digerir la muestra. Terminada las dos horas, se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se procedió a medir su absorbancia a 600 nm. La absorbancia obtenida fue interpolada con la curva de calibración construida para tal efecto.

1.3. Curva de calibración a 600 nm

Como reactivo estándar se utilizó ftalatohidrógeno de potasio ($\text{KC}_8\text{H}_5\text{O}_4$). Para ello se prepararon soluciones cuyo valor de DQO eran conocidos, entre 0 y 900 mg/L. Estas soluciones fueron sometidas a digestión según el procedimiento anterior. Para finalmente obtener una gráfica entre la absorbancia del estándar y el valor respectivo de DQO, expresado en mg/L.

1.4. Resultados previos

En la Tabla I, se muestran los resultados obtenidos de las dos curvas de calibración realizadas para la determinación de la DQO.

Tabla I. Valores de absorbancia para la construcción de la curva de calibración de DQO

Estándar de $C_8H_5O_4K$ mg/L	Abs. 1	Abs. 2	Promedio Abs.	Desv. estándar
50	-----	0,009	0,016	0,005
150	0,047	0,030	0,044	0,012
300	0,092	0,081	0,082	0,008
450	0,138	0,121	0,122	0,012
600	0,182	0,164	0,165	0,013
750	0,227	0,224	0,210	0,002
900	0,271	0,263	0,245	0,006

En la Figura 2, se observa la curva de calibración entre la absorbancia y la concentración del estándar, obteniendo un alto grado de correlación entre las variables reflejado por el ajuste lineal de la recta con un valor de R^2 promedio de 0,9995.

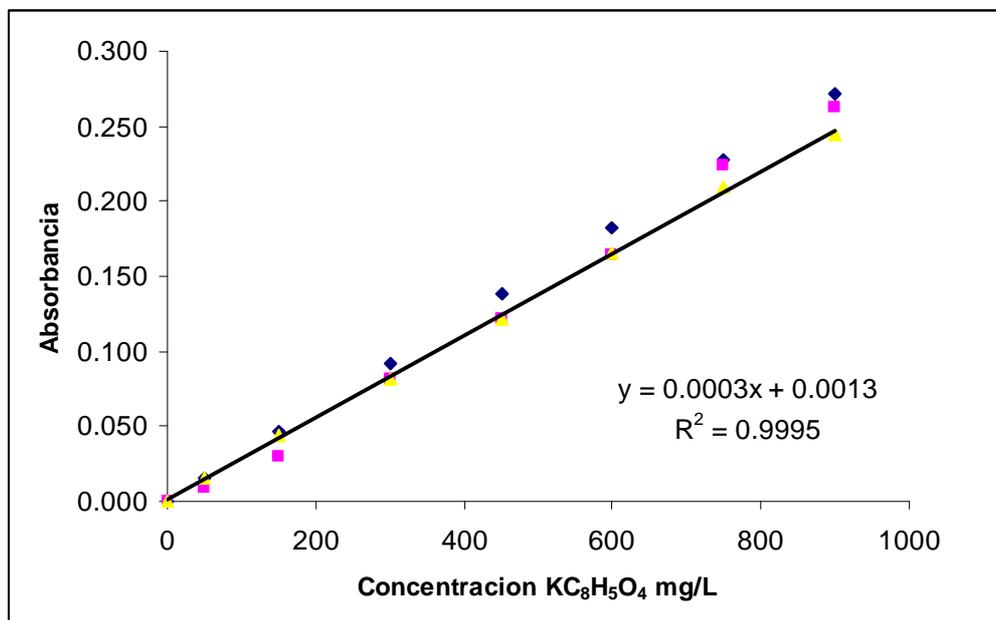


Figura 2. Curva de calibración de la DQO.

Para determinar la DQO se empleó glucosa, como fuente de materia orgánica a una concentración conocida (500 mg/L). De los valores obtenidos en la Tabla II, se destaca que en la muestra de glucosa cuantificada para este método, el valor de la desviación estándar fue de 5 y el coeficiente de variación (CV) expresado en porcentaje fue de 1,1, lo que nos indicaría una buena precisión del método.

Tabla II. Muestra de Glucosa a 500 mg/L.

Concentración real (mg/L)	Absorbancia	Concentración experimental (mg/L)
500	0,146	482
500	0,146	482
500	0,148	489
500	0,150	496
500	0,147	486
500	0,148	489
Promedio		487
Desv. Estándar		5
% CV		1,1
% Recuperación		97,4

V. METODOLOGÍA

1. Determinación del COT

1.1. Principio

Para la determinación del COT mediante espectrofotometría, primero es evaluado bajo condiciones levemente ácidas de tal forma de remover el carbono inorgánico. En el exterior del vial, el carbono orgánico en la muestra es digerida por persulfato y ácido, a la forma de CO_2 . Durante la digestión, el CO_2 reacciona con un indicador de pH en el interior de la cápsula. La absorción del CO_2 en el indicador forma ácido carbónico. El ácido carbónico cambia el pH de la solución indicadora, la cual cambia de color. La intensidad de color esta relacionada con la cantidad de carbono presente en la muestra. El test se realiza a una longitud de onda de 436 nm, realizando previamente un barrido en el espectrofotómetro entre 400-600 nm.

1.2. Procedimiento

- Se fija la temperatura de el reactor de DQO, entre 103-105°C.
- Usando una pipeta automática se tomaron 5 mL de muestra, los cuales fueron vertidos a un vaso de precipitado de 20 mL que contenía una barra agitadora.
- Luego se agregaron 0,2 mL de solución buffer a pH 2,0, y se mide el pH de la solución con papel pH.
- Se colocó el vaso de precipitado sobre una placa agitadora a baja velocidad durante 10 minutos.
- Se etiquetaron dos viales de digestión ácida de rango alto, uno como muestra y el otro como blanco.
- Empleando un embudo, se adicionó el contenido de un sobre de persulfato a cada vial de digestión ácida (líquido incoloro).
- En seguida se añadió 0,3 mL de agua libre de COT al vial etiquetado como blanco, y 0,3 mL de muestra preparada, al vial de muestra. Para posteriormente agitar hasta homogenización.

- Se enjuagaron dos ampollas azul indicadora con agua desionizada, y se limpió con un paño suave (libre de pelusas). En este punto, fue importante evitar tocar las ampollas después de limpiar, para lo cual las ampollas fueron manipuladas desde la parte superior.
- Se colocó una ampolla cerrada en cada vial de ácido digestión. Quebrando la parte superior de la ampolla.
- Luego cada vial fueron cerrados herméticamente, y se colocaron a incubar en el reactor de DQO durante 2 horas, a 103-105°C.
- Transcurrido este tiempo se retiran los viales del digestor, se enfrian a temperatura ambiente y se procede a leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 436 nm.

VI. PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL COT

1. Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para entregar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Siempre que sea posible se debe buscar una respuesta de tipo lineal para facilitar su trazado, interpolación e interpretación. Por ejemplo, en algunos procedimientos como en los inmunoensayos, la respuesta del método no suele ser lineal, pero sí proporcional a la concentración. En estos casos son válidos otros ajustes matemáticos.

Con los resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las cantidades o concentraciones (**x**, variable independiente), y la respuesta (**y**, variable dependiente, por ejemplo áreas, alturas, absorbancias, etc.). La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo $y = b \cdot x + a$, obtenida por un método de ajuste generalmente, el de cuadrados mínimos. En algunos casos puede ser necesaria alguna transformación matemática previa, como es el uso de logaritmos, recíprocos de las variables, entre otros, para obtener funciones lineales.

La representación gráfica de la recta de regresión, en un sistema de coordenadas junto con los valores experimentales, permite visualizar la bondad del ajuste.

El coeficiente de correlación (R^2) nos indica el grado de relación entre la variable **x** (concentración), y la variable **y** (respuesta). Su valor máximo es 1. Si R^2 es cercano a la unidad, esto significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica la ausencia de relación lineal entre las variables.

El valor recomendable para un buen ajuste lineal está dado por un $R^2 \geq 0,999$, aunque en el caso de impurezas se admite un valor $\geq 0,990$.

Para determinar este parámetro se preparó una curva de calibración empleando 5 concentraciones de ftalatohidrógeno de potasio ($KC_8H_5O_4$): 100, 250, 400, 550 y 700 mg/L. Luego se realizaron mediciones de la absorbancia a la longitud de onda de trabajo, y en cubetas de vidrio del mismo paso óptico. Luego se graficó la absorbancia en relación a las concentraciones estudiadas, la cuál será recta si el sistema cumple con la Ley de Lambert-Beer.

2. Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia (o dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples, a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. La procedencia de las muestras destinadas al estudio de la precisión puede ser reales o sintéticas (preparadas en el laboratorio).

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo. Esta variabilidad, es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión.

La precisión engloba diferentes tipos de estudio:

- Repetibilidad
- Precisión intermedia
- Reproducibilidad

Para este estudio, sólo se determinó como parámetro de precisión la repetibilidad.

3. Repetibilidad

La repetibilidad estudia la variabilidad de un método, efectuando para ello una serie de análisis sobre una misma muestra y bajo similares condiciones operativas, es decir un mismo analista, iguales equipos y reactivos, entre otros; en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

La repetibilidad se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas, y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Dónde:

S: desviación estándar

X: media aritmética de los resultados

Uno de los factores que más pueden influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito. Así por ejemplo, cuando se trabaja a concentraciones altas (materia prima) se aceptan valores de coeficientes de variación más bajos que cuando se trabaja a concentraciones más bajas (por ejemplo impurezas). Por otro lado, el valor aceptado del coeficiente de variación depende del intervalo de aceptación especificado en el método de análisis. El número de replicas se deduce a partir del coeficiente de variación de repetibilidad del método.

Para este caso se verifica la repetibilidad del sistema, trabajando con una solución estándar de una determinada concentración, que por lo general presenta un valor que está en la mitad de la curva de calibración. Esta solución es medida siete veces, bajo las condiciones antes señaladas. Una vez realizada la repetibilidad, con los datos obtenidos se saca el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación porcentual.

4. Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico, expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero, o un valor de referencia, y el valor experimental encontrado.

No debe confundirse exactitud y precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que está el valor verdadero. Se puede tener mediciones muy precisas pero poco exactas, sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión.

De la definición de exactitud surge el principal problema: ¿cuál es el valor verdadero del analito en la muestra?. Por desgracia el valor verdadero en muchos casos se desconoce como por ejemplo, en la industria alimentaría debido a la gran variedad de matrices posibles y que prácticamente no existen patrones de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero, y la exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón, o bien analizando muestras de placebo o de problema a las que se ha añadido una cantidad conocida de dicho patrón.

La exactitud, se expresará como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito, añadida sobre la muestra, o como diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero, junto a los intervalos de confianza. De esta manera para calcular matemáticamente el porcentaje de recuperación (R) de un método, se aplica la siguiente expresión.

$$\text{Porcentaje de recuperación (R)} = \frac{\bar{X}_m}{\mu} * 100$$

$$\text{Exactitud} = \bar{X}_m - \mu$$

Dónde:

\bar{X}_m : valor medio hallado

μ : valor aceptado como verdadero

Para chequear la exactitud del método, en este trabajo fue preparado un estándar de 300 mgC/L a partir de una solución stock de ftalatohidrógeno de potasio de 1000 mgC/L, transfiriendo 1,5 mL de stock estándar a un matraz aforado de 5 mL, y se completo el volumen con agua libre de COT.

Luego se realizó la técnica de adición del estándar de la siguiente forma:

- Se adicionaron 0,1; 0,2 y 0,3 mL de estándar de 300 mgC/L a tres viales de ácido digestión.
- Luego a cada vial, se añadió el contenido de un sobre de persulfato.
- Se agregaron 0,3 mL de muestra a cada vial. Luego se agitó suavemente para mezclar, y se procedió a digerir la muestra.
- Se enjuagaron tres ampollas azul indicadora con agua desionizada, y se limpió con un paño suave, libre de pelusas. En este punto, fue importante evitar contacto con las ampollas, para lo cual fueron manipuladas desde la parte superior.
- Se colocó una ampolla cerrada en cada vial de ácido digestión. Quebrando la parte superior de la ampolla.
- Luego fueron cerrados herméticamente cada vial, y se colocaron a incubar en el reactor de DQO durante 2 horas, a 103-105°C.

Nota: la concentración debería aumentar en 100 mgC/L por cada 0,1 mL de incremento de solución estándar de 300 mgC/L agregado.

5. Límite de detección (LD)

El LD es la concentración más baja de analito que puede detectarse bajo las condiciones experimentales establecidas. El LD es determinado analizando por lo menos unas 10 veces el blanco, y determinando su desviación estándar absoluta, la IUPAC recomienda leer 25 veces el blanco, pero 10 veces es suficiente para una buena aproximación. Aunque no existe un acuerdo universal sobre la terminología, y existen varios criterios para su cuantificación, en cualquier caso se recomienda informar el mecanismo seleccionado (AQA, 2005).

Para calcular el LD, se emplea la siguiente expresión matemática:

$$\mathbf{LD= 3 \times SD \text{ blanco}/ Pendiente}$$

LD: límite de detección

3 x SD blanco: 3 veces la desviación estándar absoluta del blanco

Pendiente: pendiente de la curva en el rango lineal

6. Límite de cuantificación (LC)

El LC, es la menor concentración de analito que puede cuantificarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas. El LC se expresa en las mismas unidades de concentración empleadas para el analito en la muestra.

El LC se obtiene generalmente desde la curva de calibración, midiendo por lo menos 10 veces el estándar de menor concentración de la curva y determinando su desviación estándar, para lo cual se procede de la misma manera que para el LD, pero usando la desviación estándar de menor concentración o asumiendo arbitrariamente que el LC corresponde a 3 ó 5 veces el LD (AQA, 2005).

El LC está dado por la siguiente expresión:

$$\mathbf{LC= 3 \times LD}$$

LC: Límite de cuantificación

3*LD: Tres veces el límite de detección

Para el análisis de estos parámetros, fueron preparados diez blancos a los cuales se les determinó su absorbancia leyendo tres veces cada blanco. De esta manera se pudo obtener el promedio y desviación estándar de los blancos preparados, para proceder a calcular los respectivos LD y LC.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

1. Barrido de longitud de onda (λ)

Se utilizó un estándar de menor concentración de la curva de calibración, para obtener un espectro de absorción entre longitudes de ondas de 400-600nm (Tabla III), el cual se representa gráficamente en la Figura 3, obteniendo un máximo de absorción a 436nm, determinando de esta manera la longitud de trabajo para realizar esta metodología.

Tabla III. Valores de absorbancia para determinar longitud de onda de trabajo

Longitud de onda (nm)	Absorbancia	Longitud de onda (nm)	Absorbancia
400	0.048	448	0.093
403	0.056	451	0.090
406	0.056	454	0.086
409	0.069	457	0.081
412	0.075	460	0.077
415	0.079	463	0.073
418	0.084	466	0.067
421	0.088	469	0.062
424	0.092	472	0.055
427	0.095	475	0.049
430	0.097	478	0.042
433	0.098	481	0.034
436	0.099	484	0.029
439	0.098	487	0.023
442	0.097	490	0.017
445	0.096	493	0.011

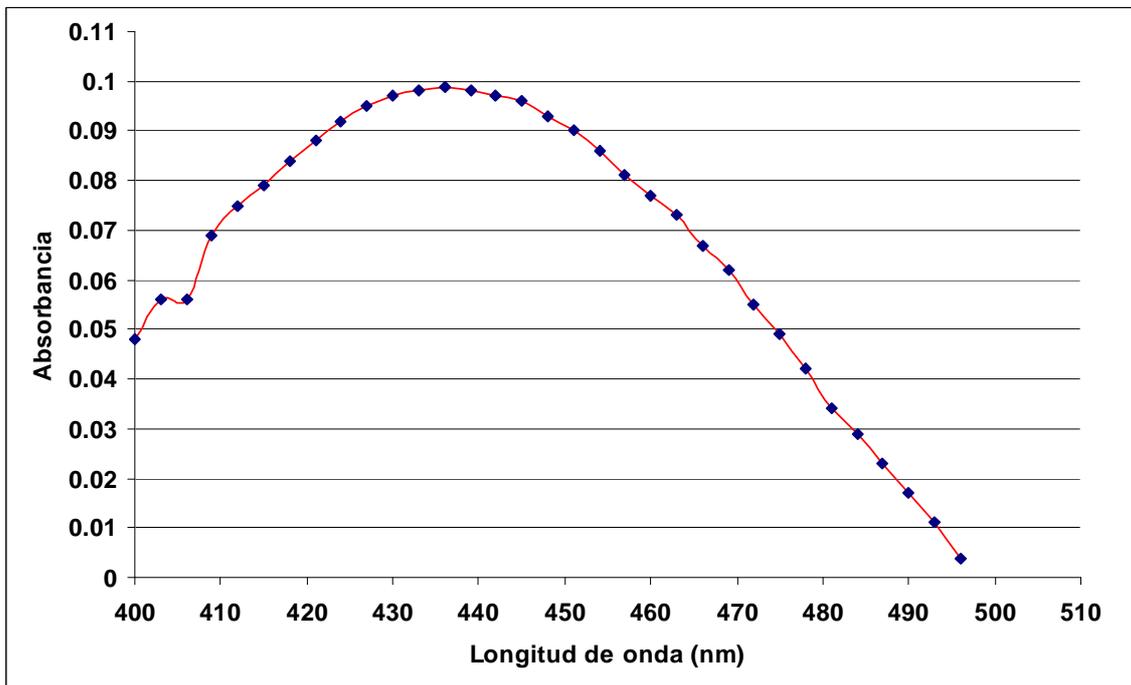


Figura 3. Espectrograma

2. Linealidad

En la Figura 4, se muestra la curva de calibración para el COT, reflejando que existe correlación entre las distintas concentraciones del estándar y las absorbancia obtenidas, confirmada por el coeficiente de regresión lineal el cual fue de 0,9977, lo que contribuye a que este sea un método seguro para la determinación de COT.

En las Tablas IV y V, se muestra un resumen de los resultados obtenidos para las tres curvas de calibración.

Tabla IV. Valores de absorbancia de las tres curvas de calibración para el análisis de COT.

Concentración (mg/L)	Curva N° 1 Día 1 Abs.	Curva N° 2 Día 2 Abs.	Curva N° 3 Día 3 Abs.	Promedio Curvas Abs	Desviación Estándar
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
100	0,093	0,069	0,080	0,081	0,012
250	0,197	0,181	0,208	0,195	0,013
400	0,303	0,320	0,328	0,317	0,013
550	0,486	0,448	0,448	0,461	0,022
700	0,584	0,611	0,611	0,602	0,015
Pendiente	0,0008	0,0009	0,0009		
Intercepto	0,0031	0,0178	0,0063		
Correlación	0,9926	0,9952	0,9973		

Tabla V. Valores de curva de calibración para COT

Concentración mg/L	Promedio Absorbancia
0	0,000
100	0,081
250	0,195
400	0,317
550	0,461
700	0,602

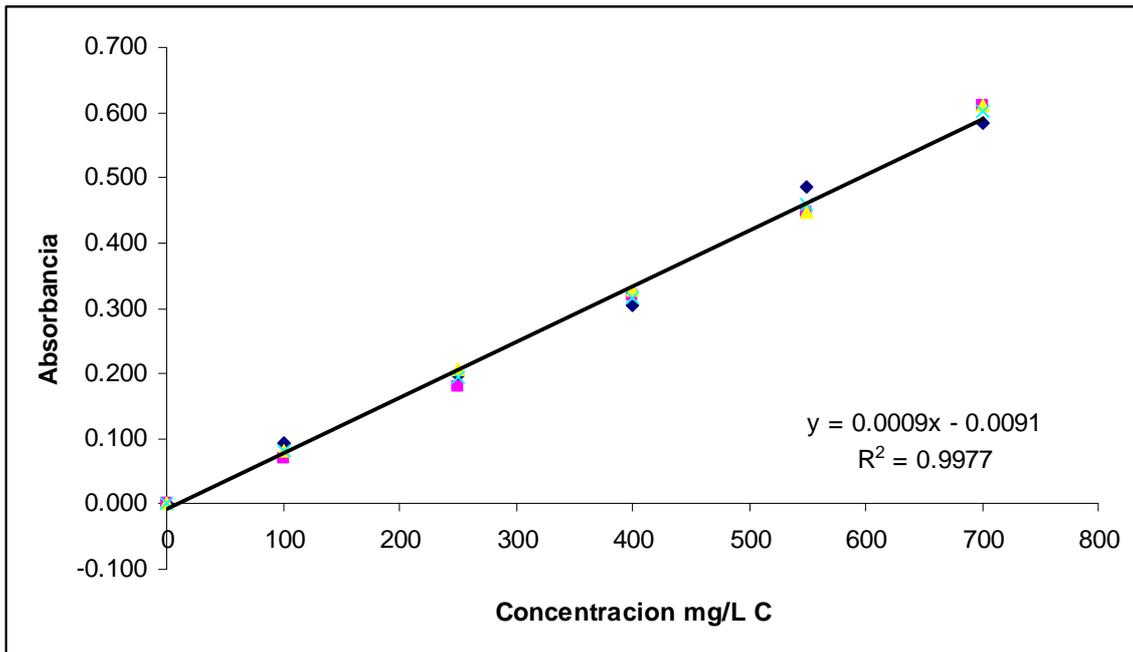


Figura 4. Curva de calibración del COT.

3. Repetibilidad

Como se señala anteriormente, la precisión estudia la variabilidad que existe entre los diferentes resultados, pero sin tener en cuenta su proximidad al valor real. La repetibilidad depende generalmente del proceso de preparación de la muestra. Es decir cuanto mayor sea la manipulación de la muestra más probable es que la variabilidad del método aumente.

De esta manera la repetibilidad que se obtuvo del método, es buena ya que el coeficiente de variación es bajo, 2,4, siendo aceptable (Tabla VI), dependiendo solo del instrumento utilizado.

Tabla VI. Repetibilidad de un estándar de Glucosa de 450 mg C /L

Concentración Real mg/L	Abs. 1	Abs. 2	Promedio Absorbancia	Concentración Experimental mg/L
450	0,413	0,383	0,398	452
450	0,412	0,410	0,411	467
450	0,386	0,389	0,388	441
450	0,396	0,390	0,393	447
450	0,384	0,390	0,387	440
450	0,388	0,383	0,386	438
450	0,388	0,377	0,383	435
Promedio mg/L				446
Desv. Estándar				11
CV(%)				2,4

4. Exactitud

La exactitud indica si los resultados que se obtienen con un método analítico están próximos al valor verdadero o al que se acepta convencionalmente como valor verdadero, para este caso se obtuvieron porcentajes de recuperación aceptables (Tabla VII). Sin embargo, no siempre esto fue así ya que también se obtuvieron valores de recuperación cercanos al 100%, esto depende de la efectividad del método de preparación, extracción y concentración del analito. También fue posible observar un valor superior al 100% durante la investigación, en este caso cuando se obtienen resultados superiores al valor verdadero, si es posible se deberían modificar las condiciones del método para optimizar la selectividad.

Tabla VII. Valores de absorbancia de una muestra de Glucosa de 200 mgC/L para determinar el parámetro exactitud.

Muestra Glucosa 200 mg/L	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	Promedio Abs.	Concentración mg/L	R (%)
Adición 1 +100 mg/L	0,235	0,236	0,235	0,235	272	90,5
Adición 1 +100 mg/L	0,242	0,242	0,242	0,242	279	93,0
Adición 2 + 200 mg/L	0,330	0,328	0,329	0,329	376	93,4
Adición 2 +200 mg/L	0,336	0,337	0,336	0,336	384	96,0
Adición 3 + 300 mg/L	0,450	0,440	0,443	0,443	503	100,5
Adición 3 + 300 mg/L	0,444	0,442	0,443	0,443	502	100,4

5. Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación son parámetros analíticos de gran interés, sobre todo cuando se están evaluando concentraciones a niveles de trazas (este no es el caso); ya que calculando estos límites se puede saber que por debajo de una determinada concentración, no hay certeza de poder detectar el analito.

Los resultados obtenidos para ambos límites fueron de valores bajos (Tabla VIII) lo que significa que el sistema utilizado para la determinación de COT es bastante sensible, y puede cuantificar bajas concentraciones de COT en las muestras.

En este sentido cabe destacar la importancia que adquieren el LD y LC como herramientas indispensables en cualquier método analítico ya sea a niveles trazas, $\mu\text{g/L}$, mg/L , entre otros.

Tabla VIII. Valores de absorbancia de diez muestras blanco para determinar los límites de detección y cuantificación del método.

Muestra	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	Promedio Abs.
Blanco	-0,005	-0,004	-0,006	-0,005
Blanco	0,000	0,000	0,003	0,001
Blanco	-0,004	-0,002	0,000	-0,002
Blanco	-0,001	0,000	-0,002	-0,001
Blanco	-0,002	-0,001	-0,002	-0,002
Blanco	0,000	-0,001	0,000	0,000
Blanco	0,000	-0,002	0,000	-0,001
Blanco	-0,002	0,000	0,000	-0,001
Blanco	0,000	0,000	-0,001	.0,000
Blanco	-0,004	-0,002	-0,004	-0,003
			Promedio	0,002
			Desv. Estándar	0,002
			LD	6,7 mg/L
			LC	20,1 mg/L

VIII. CONCLUSIONES

- Se implemento exitosamente una metodología analítica para la determinación cuantitativa de COT.
- Los set comerciales empleados para la determinación de COT, a concentraciones de 100-700 mgC/L para este estudio, arrojan curvas de calibración lineales, existiendo proporcionalidad entre las concentraciones de los estándares y sus absorbancias siendo demostrado por los coeficientes de regresión lineal, en donde las tres curvas presentan valores cercanos a uno.
- Los parámetros analíticos estudiados para la determinación de COT, presentan una desviación estándar baja, y un coeficiente de variación aceptable no mayor al 3%, por lo que se puede concluir que estos parámetros presentan buena precisión y exactitud.
- Con respecto a los LD y LC para la determinación de COT, este método presenta valores bajos de concentración, 6,7 mg/L para el LD, y 20,1 mg/L para el LC, lo que nos indica que esta metodología tiene una muy buena sensibilidad.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, A. 1994. Laboratorios Analíticos como garantizar la calidad. 151 pp.
- AQA, Análisis Químico Aplicado I. 2003. Apuntes de Análisis Químico Aplicado I. Editado por el Departamento de Química Analítica & Inorgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción. 8 pp.
- A.E.F.I. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria). 2001. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona, 331 pp.
- Campos, J.L. y Mosquera-Corral, A. 2006. Herramientas metodológicas aplicadas al tratamiento de aguas residuales. Programa de doctorado: Ingeniería Química e Ambiental. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Santiago de Compostela, España, 48 pp.
- Metcalf & Eddy. 1995. Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización. Volumen 1. Tercera edición, editorial McGrawHill, España. 505 pp.
- Millán, C. 1994. Química y Ambiente. Universidad de Concepción, 350 pp.
- Millán, C. 1994. Análisis de Aguas. Universidad de Concepción, 184 pp.
- Ramalho, A. 1996. Tratamiento de aguas residuales. Editorial Revertè, 705 pp.
- Rodríguez, P. 2002. Tesis de Pregrado: Determinación de parámetros de validación para métodos analíticos usados en el análisis de agua por espectrofotometría visible. Universidad de Concepción, 34 pp.
- Skoog, D.A. 2001. Principios de Análisis Instrumental. 5ª edición en español, McGraw-Hill, 1028 pp.