



**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO DE UN MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE HIERRO Y COBRE EN
AGUARDIENTE”**

**ROSA IDALIA DUARTE BARRAZA
MILDRED LILIETH GONZÁLEZ RODRÍGUEZ
FIDEL LÓPEZ GÓMEZ
MONOGRAFÍA DE LICENCIATURA
LEÓN, NICARAGUA, JUNIO DEL 2004.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO DE UN MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE HIERRO Y COBRE
EN AGUARDIENTE”**

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICA

PRESENTADA POR:

**Br. ROSA IDALIA DUARTE BARRAZA
Br. MILDRED LILIEETH GONZÁLEZ RODRÍGUEZ
Br. FIDEL LÓPEZ GÓMEZ**

TUTOR:

Dr. SERGIO JOSÉ LÓPEZ GRÍO

LEÓN, NICARAGUA, JUNIO DEL 2004.

PRESENTACIÓN DE LA MONOGRAFÍA

La idea de determinar la calidad del aguardiente que se expende en las cantinas y bares de la ciudad León, surgió ya hace varios años, a través del de intercambios de ideas con otros docentes y estudiantes del Departamento de Química, a este respecto.

Se planteaba inicialmente realizar un control de controlar de calidad abarcando todos los componentes del aguardiente según las especificaciones de la Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense NTON 03 036 00, pero dada las características del estudio planteado y los costos económicos que esto representaba, paulatinamente la idea fue derivando en otra idea de menor costo y alcance, sin perder de vista el objetivo central.

Hace aproximadamente un año, los Brs. Rosa Idalia Duarte , Mildred González y Fidel López, iniciaron el presente trabajo monográfico que contempla la realización de un estudio preliminar de un método espectrofotométrico para analizar contenido de cobre y hierro en aguardiente, como el preámbulo de un estudio de mayor magnitud que se pretende desarrollar para analizar la calidad del aguardiente que se vende en cantinas, bares y expendios, de la ciudad de León.

Este trabajo contempla diversos tópicos en el ámbito de la aplicación del método y deja sentada las pautas para la continuación de futuros estudios en este sentido.

El lector acucioso podrá encontrar en esta Monografía información diversa, un tratamiento adecuado de la información y una profundidad de los contenidos que rebasa las exigencias requeridas para los trabajos de fin de curso de Licenciatura.

Tengo, pues el deber de presentarles este trabajo de monográfico, con la esperanza de que les sirva para los fines por lo cuales lo solicitaron, y les sea de mucha utilidad.

Atentamente:

Dr. Sergio José López Grío
Tutor

DEDICATORIA Br. ROSA IDALIA DUARTE



Dedico esta monografía a Dios por su invaluable bendición de haberme permitido concluir mis estudios de nivel superior.

A mis padres Freddy José Duarte Valverde y Hérmina del Socorro Barraza Mendoza por el apoyo confianza y seguimiento de gran interés que me dieron en el transcurso de mi carrera.

A mis hermanos en especial a Rito Manuel Duarte Barraza, Erick José Duarte Barraza y Nancy del Socorro Duarte Barraza.

A mi sobrina Erika Gabriela Duarte Barraza por ser muy importante para mi.

A mis profesores por brindarme sus conocimientos tanto teóricos como prácticos por no solo ser mis profesores sino mis amigos y a aquellas personas que me guiaron en la elaboración de mi tesis dándome un poco de su valioso y ocupado tiempo.

DEDICATORIA Br. MILDRED GONZÁLEZ



Este trabajo monográfico lo dedico primeramente a Dios el Creador de mi vida, quien me dio sabiduría , fortaleza y con su Amor guía mis pasos por el camino del bien.

A mi hijo amado Kerick Nayid González Rodríguez, por ser la persona más importante en mi vida y con su amor hace que tenga motivos para luchar y alcanzar metas en mi carrera profesional y en la vida diaria.

A mis padres Juan Pablo González Mendoza y Herminia Rodríguez Vidaurre por toda una vida de amor, comprensión, esfuerzos y por haber creído en mi.

A mis hermanos Medardo, Karen y Kevin por su cariño y apoyo.

A mi tía Arely Rodríguez Vidaurre por su apoyo moral, económico y por su cariño.

DEDICATORIA Br. FIDEL LÓPEZ



A Dios Padre, que nos dio la vida, el don de la sabiduría, el entendimiento y la razón para comprender todos los misterios que en el universo existen.

A mis Padres Margarito López Pérez y Amalia Gómez Quintero, por toda una vida de innumerables esfuerzos, dedicación y amor, en la que sin pedir nada a cambio me han apoyado de forma incondicional.

A mi esposa que me ha brindado su apoyo, cariño, amor, respeto y sobre todo que ha tenido paciencia para llegar hasta este momento.

A mi hijo Jareth Moisés López Gámez, la persona mas importante en mi vida, con todo mi cariño.

A mis hermanos(as) que me han dado ánimo y que con su apoyo económico han permitido escalar más para poder alcanzar lo que siempre soñé.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios nuestro Señor por dirigir nuestras vidas en el camino del bien y darnos fortaleza y sabiduría para seguir creciendo cada día y llegar a este momento que es uno de los más importantes en nuestras vidas.

De manera muy especial a nuestros Padres, por su apoyo moral y económico, por haber tenido la paciencia de esperarnos, y de que hoy puedan ver el fruto de todos sus esfuerzos, les amamos grandemente.

A nuestro tutor Dr. Sergio López Grío quien con sus conocimientos y dedicación nos ayudó a la culminación de este trabajo monográfico.

A dos grandes amigos, Lic. Jorge Isaac Cisne Altamirano y Lic. Manuel Antonio Vanegas Carvajal, que dedicaron su tiempo y sus conocimientos para realizar este trabajo, y con los cuales compartimos momentos agradables.

A todos nuestros amigos(as) que nos brindaron su apoyo moral y que por ser tantos no los podemos nombrar.

A todos ellos nuestros más sinceros agradecimientos.

ÍNDICE

I. Resumen.....	1
II: Objetivos.....	2
II.1: Objetivo General.....	2
II.2 objetivos específicos.....	2
III. Marco Teórico.....	3
III.1. Los Alcoholes.....	3
III.2. El Aguardiente de caña.....	3
III.3 El espectro de radiación.....	5
III.4 Métodos de Análisis.....	7
III.5. Ley de Beer.....	11
III.6 Desviaciones con respecto a la Ley de Beer.....	15
III.7. Error Relativo de Concentración.....	16
III.8 El Cobre.....	18
III.9 El Hierro.....	22
III.10 Técnicas de muestreo.....	25
III.10.1 Muestreo Estratificado.....	25
III.10.2 Muestreo por Conglomerados.....	25
III.10.3 Muestreo Sistemático.....	25
III.10.4 Muestreo aleatorio simple.....	25
III.11. Validación de Métodos Analíticos.....	27
III.11.1 Definición.....	27
III.11.2 Jerarquía de la Metodología.....	27
III.11.3 Validación de Métodos.....	28
III.11.4. Desarrollo del Método.....	28
III.11.5. Parámetros de desempeño del método y su significado.....	29
III.11.5.1. El Método de la Adición Patrón.....	29
III.11.5.2. Límite de Detección.....	31
III.11.5.3. Límite de Cuantificación.....	32
III.11.5.4. Selectividad.....	33
III.11.5.5. Sensibilidad.....	33
III.11.5.6. Robustez o Fortaleza.....	33
III.11.5.7. Evaluación de la incertidumbre.....	34
III.11.5.7.1. Incertidumbre de Medición.....	35
III.11.5.7.2. Incertidumbre Estándar.....	36
III.11.5.7.3. Incertidumbre Estándar Combinada.....	36
III.11.5.7.4. Incertidumbre Expandida.....	36
III.11.5.7.5. Incertidumbre estándar Relativa.....	36
IV Parte Experimental.....	37
IV.1. Equipos y Materiales.....	37
IV.2. Reactivos.....	37
IV.3. Procedimiento.....	38
IV.3.1. Preparación de las soluciones.....	38
IV.3.1.1. Solución Estándar de Cobre II(248.05 mg Cu / L).....	38

IV.3.1.2. Solución Estándar de Trabajo de Cobre II(49.6 mg / L)...	38
IV.3.1.3. Solución de 2,2-Bipiridina (0.2 %).....	38
IV.3.1.4. Solución Crómica.....	38
IV.3.1.5. Solución de Ácido Nítrico al 10 %.....	38
IV.3.1.6. Preparación de Muestras de ron (aguardiente) para el Cu.....	39
IV.3.1.7. Solución estándar de Hierro (71.23 ppm).....	39
IV.3.1.8. Preparación de Muestras de Ron(aguardiente) para el Fe.....	39
IV.3.1.9. Solución de Alcohol al 80 %.....	39
IV.3.2. Preparación de Curvas de Calibrado.....	40
IV.3.2.1. Curvas de Calibración Normal para el Cu.....	40
IV.3.2.2. Curvas de Calibración por Adición Patrón para el Cu.....	40
IV.3.2.3. Curvas de Calibración Normal para el Fe.....	40
IV.3.2.4. Curvas de Calibración por Adición Patrón para el Fe.....	40
V. Resultados y Discusión.....	41
V.1. Diagramas de Distribución de los Complejos Formados en la Reacción del Fe (II) y Cu (II) con 2,2-Bipiridina.....	41
V.2. Espectros de Absorción de los Complejos Formados en la Reacción del Fe(II) y Cu (II) con 2,2-Bipiridina.....	45
V.3. Determinación del Error Fotométrico.....	48
V.4 Estudio de Algunos Parámetros del Desempeño del Método Espectrofotométrico, para le determinación del Cu (II) y Fe (II) en Aguardiente.....	51
V.4.1. Introducción.....	51
V.4.2. Linealidad del Método.....	52
V.4.3. Repetibilidad en las Curvas de Calibración.....	54
V.4.4. Límite de Detección y Límite de Cuantificación del Cobre y Hierro.....	58
V.4.5. Efecto Matriz en la Determinación de Cobre (II) y Hierro (II) en Aguardiente.....	61
V.4.6. Porcentaje de Recobro.....	66
V.5. Determinación del Tamaño de la Muestra a Analizar.....	69
V.6. Determinación del contenido de Cobre(II) Y Hierro (II) en Muestras de Aguardiente.....	74
VI: Conclusiones.....	78
VII Recomendaciones.....	79
VIII Bibliografía.....	80
IX. Anexos.....	82

I. RESUMEN

El presente trabajo monográfico se efectuó con el fin de ensayar un método espectrofotométrico con el cual se lograra evaluar el contenido de cobre y hierro como parámetros de calidad química del aguardiente que se expende en bares y cantinas de la ciudad de León.

Los parámetros evaluados se basaron en los recomendados por la Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense (NTON 03 036-00), en lo relativo al contenido de cobre y hierro.

Se evaluó la linealidad, precisión y exactitud del método, así como linealidad y precisión del espectrofotómetro usado en el estudio. Los valores de los coeficientes de correlación (r^2) fueron para el cobre 0.9983 y para el hierro de 0.9985, lo que demuestra un ajuste bastante lineal del modelo de correlación del método. Los valores obtenidos para los límites de cuantificación (LC) y detección (LD) tanto para el cobre como para el hierro fueron de 0.1402 y 0.0543 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y de 0.3826 y 0.0394 $\mu\text{g} / \text{mL}$ respectivamente.

Se efectuó un estudio de repetibilidad de las curvas de calibración normal y de adición patrón utilizando para esto una carta de control que considera los valores obtenidos para el intercepto (b_0) y la pendiente (b_1).

El universo muestral que se consideró, fueron todas las cantinas y bares censados por el SILAIS de la ciudad de León. El tamaño de la muestra utilizada se seleccionó a través de un diseño estadístico combinado (estratificado y aleatorio simple) considerando esta información, el tamaño de la muestra así obtenido fue de 7 cantinas para el sector Perla Maria Norori, de 7 para el sector Subtiava y de 10 para el sector Mántica, siendo el universo total de muestras de 24 cantinas.

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio de un método espectrofotométrico de UV-Vis, para la determinación de cobre y hierro en aguardiente de cantinas y bares de la ciudad de León en el periodo de octubre del 2003 a abril del 2004.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener los diagramas de distribución de los complejos formados entre el Fe(II) y Cu(II) con 2.2'-bipiridina en medio acuoso.
2. Determinar la longitud de onda de máxima absorción para los complejos formados.
3. Determinar el error fotométrico para el máximo de absorbancia de los complejos formados.
4. Obtener parámetros del desempeño del método espectrofotométrico.
5. Realizar un diseño estadístico para efectiva toma de muestras en la ciudad de León.
6. Aplicar el método propuesto a la determinación de Cu y Fe en muestras de aguardiente de cantinas de la ciudad de León.

III. MARCO TEÓRICO

III.1. LOS ALCOHOLES

Como alcoholes se consideran a un amplio número de compuestos orgánicos constituidos por la unión de un átomo de carbono saturado a un grupo OH, cuya fórmula general es R-OH. Donde R es cualquier grupo alquílico e incluso sustituido y el grupo OH es llamado radical hidroxilo. El grupo R puede ser de cadena corta o cíclica, puede contener un doble enlace, un átomo de halógeno, un anillo aromático o grupos hidroxilos adicionales. [20]

Los alcoholes se clasifican en primarios, secundarios y terciarios, de acuerdo al tipo de carbono que contiene al grupo OH. Dentro de los alcoholes primarios el considerado de mayor difusión y uso es el llamado Alcohol Etílico cuya fórmula es la siguiente:



El etanol es un líquido incoloro, volátil e inflamable, producto de la destilación y rectificación de los mostos sometidos a fermentación, principalmente alcohólica de los mostos de las materias primas de origen vegetal que contienen azúcares o de aquéllas que contienen almidones sacarificables (caña de azúcar, mieles incristalizables, jarabe de glucosa, jarabes de fructuosa, cereales, frutas, tubérculos, entre otras). El alcohol es un depresor del sistema nervioso central que actúa como anestésico y calmante suave, pero es tóxico en grandes cantidades.

III.2 EL AGUARDIENTE DE CAÑA

El Aguardiente es el producto obtenido de la fermentación alcohólica y destilación de mostos provenientes de productos derivados de la caña de azúcar.

A éste se le conoce, según el país o región con los siguientes nombres: guaro guarón, espíritu de caña, cachaza tafia, pisco y otros. El contenido de alcohol de las bebidas alcohólicas se mide en grados.

Según el proceso al que sea sometido el aguardiente se puede distinguir dos tipos:

- a. **AGUARDIENTE DE CAÑA COMPUESTO:** es aquel cuyo sabor y aroma se han modificado por la adición de aromatizantes naturales de uso permitido, de manera que no se desvirtúen sus características de origen. A este aguardiente se le pueden adicionar o no azúcares o colorantes naturales permitidos.
- b. **AGUARDIENTE SIMPLE:** son aquellos aguardientes que no son sometidos a los procesos de añejamiento, y se les conoce bajo el nombre único de aguardiente, a veces seguidos del nombre de la materia prima que les da origen por ejemplo: Aguardiente de ciruela y con frecuencia con nombres regionales, por ejemplo guaro, guarón, espíritu, calvados, pisco, etc.

En todos estos casos el aguardiente es una mezcla hidroalcohólica simple, sin añejar, de aspectos cristalino y sabor típico derivado de la materia prima que dio origen al alcohol. Su grado alcohólico no podrá ser menor de 34 % ni mayor de 40 % Alc./Vol.

Por otra parte el aguardiente de caña se clasifica según su contenido de azúcares en:

- a. **SECO:** Son los aguardientes que contienen como máximo 1 mg/100ml de sacarosa.
- b. **DULCE:** Son los aguardientes que contienen desde 1.1 mg/100ml hasta 5 mg/100ml de sacarosa.

Sin embargo, existen sustancias volátiles naturales diferentes a los Alcoholes Etílico y Metílico, que provienen de las materias primas empleadas o que se han originado durante el proceso de elaboración de una bebida alcohólica, que son perjudiciales para el hombre en determinadas concentraciones, estos son los llamados congéneres. La concentración de estas sustancias está regulada por Normas de cumplimiento obligatorio en cada país. [9]

III.3. EL ESPECTRO DE LA RADIACIÓN

En determinadas condiciones, los cuerpos emiten energía en forma de radiación, aunque también los cuerpos absorben la radiación que emiten otros cuerpos, asimilando energía

Los aparatos capaces de obtener el espectro de una radiación, es decir capaces de separar la radiación en sus componentes, se llaman espectroscopios. Los aparatos que son capaces de fotografiarla y medirla se llaman espectrógrafo y espectrómetro respectivamente. Cuando el aparato es capaz de medir también la intensidad de la radiación, se denomina espectrofotómetro.

La principal emisión de radiación de los cuerpos es la radiación electromagnética en forma de luz visible. La longitud de onda de la radiación puede variar desde la radiación gamma, hasta las ondas de radio. Esta puede ser medida usando nanómetros (nm), ángstroms (A^0) y hasta metros.

La luz blanca se descompone, en un espectro de diferentes bandas coloreadas, cada una definida por una longitud de onda distinta. Así, la luz de menor longitud de onda en este espectro es la luz violeta, que se ubica alrededor de los 4000 A^0 y la de mayor longitud, la luz roja, se ubica alrededor de los 7000 A^0 .

En la figura III.1 se muestra el espectro de radiación en el que se pueden observar las radiaciones ultravioleta, rayos X y rayos gamma cuyas longitudes de onda son inferiores al violeta y las radiaciones infrarrojo, microondas y ondas de radio cuyas longitudes de onda son superiores al rojo.

Mientras que en la tabla III.1 se muestran las radiaciones y sus intervalos de longitudes de onda.

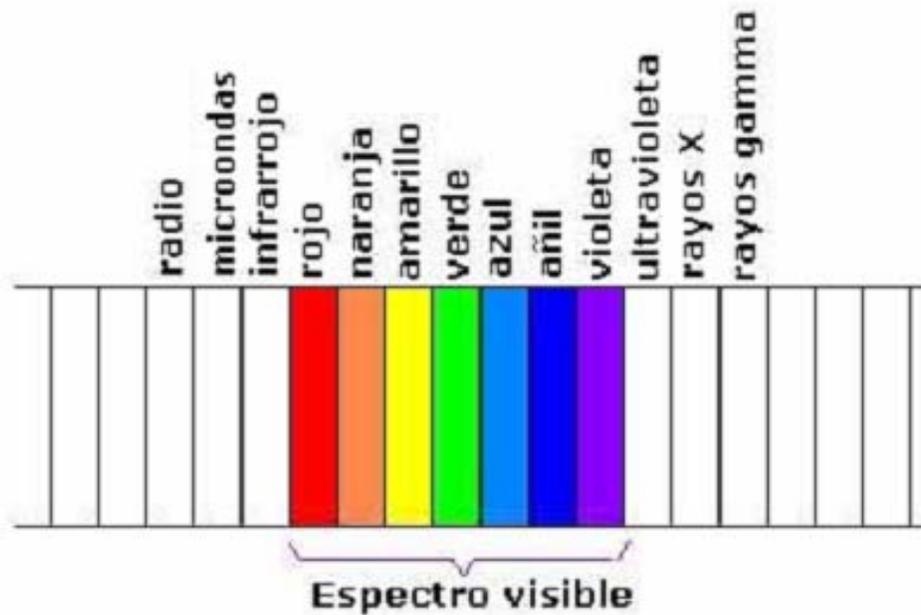


Figura II.1 Espectro de radiación electromagnético

Tabla III.1 Tipos de radiación e intervalo de longitudes de onda

TIPO DE RADIACIÓN	INTERVALOS DE LAS LONGITUDES DE ONDA
Rayos Gamma	Inferiores a 10^{-2} nm
Rayos X	Entre 10^{-2} nm y 15 nm
Ultravioleta	Entre 15 nm y 410 nm
Espectro visible	Entre 410 nm y 780 nm
Infrarrojo	Entre 780 nm y 10^6 nm
Región de Microondas	Entre 10^6 nm y $3 \cdot 10^8$ nm
Ondas de Radio	Mayores de $3 \cdot 10^8$ nm
(1 metro = 10^2 cms = 10^3 mms = 10^9 nm = 10^{10} A⁰)	

La luz ultravioleta que se extiende aproximadamente de los 15 a 410 nm y que se puede dividir en dos zonas, el ultravioleta lejano o de vacío entre 15 a 200 nm y el ultravioleta próximo entre los 200 a 410 nm y la región del visible que abarca de los 410 a los 780 nm, tienen en común que provocan la excitación de electrones externos de los átomos o moléculas. [18]

III.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

El análisis químico proporciona información sobre la composición de una muestra de materia.

Los métodos de análisis de tipo cualitativo y aportan información útil a través de la cual pueden reconocerse especies atómicas o moleculares, deducirse características estructurales o reconocer en la muestra la presencia de determinados grupos funcionales.

Por otra parte los métodos de análisis cuantitativo; proporcionan resultados en forma de datos numéricos que se expresan como porcentaje, partes por millón o miligramos por litro. En ambos tipos de análisis la información necesaria se obtiene por medio de la medida de una propiedad física que se relaciona en forma característica con el o los componentes de interés.

Las propiedades que se utilizan para conocer la composición química de la muestra pueden denominarse **señales analíticas**. Como ejemplo de este tipo de señales cabe citar la emisión o la absorción de la luz, la conductancia, el peso, el volumen y el índice de refracción, pero ninguna es exclusiva de una especie dada; así por ejemplo, todos los elementos metálicos presentes en una muestra cuando se calienta un arco eléctrico a una temperatura suficientemente elevada, emite por lo general radiación ultravioleta o visibles; todas las especies cargadas conducen la electricidad y todos los componentes de una mezcla contribuyen a su peso, su volumen y su índice de refracción.

En consecuencia, en todos los procedimientos analíticos es necesario realizar una separación. En algunos casos esta etapa consiste en la separación física de los componentes químicos individuales que están presentes en la muestra antes de la generación y de la señal analítica. En otros casos se genera y se observa la señal en la muestra entera, luego se aísla o se separa la señal deseada.

La separación de las longitudes de onda por medio de un dispositivo adecuado, por ejemplo, un espectroscopio, hace posible la identificación de cada componente sin que sea necesario separarlo físicamente. En cambio, no existe ningún método general que permita diferenciar la conductancia de los iones sodio y de la causada por los iones potasio. Por tanto si se quiere utilizar la conductancia como señal para el análisis de una de estas especies iónicas en una muestra que también contenga la otra, será necesario realizar la separación física de ambas especies.

Existen diferentes señales que se usan comúnmente con fines analíticos, entre estas tenemos señales de emisión y absorción de radiación, señales provenientes de la interacción de la radiación con la materia, señales de tipo eléctrica y señales de naturaleza variada. En la tabla III.2, se muestran las diferentes señales y los nombres de los diferentes métodos analíticos basados en dichas señales.

Es importante destacar que hasta 1920 la mayoría de los análisis se basaban en las dos últimas señales enumeradas en la tabla, o sea masa y volumen. Por este motivo, los métodos gravimétricos y volumétricos se conocen como **métodos clásicos de análisis**, a diferencia de los demás procedimientos que se denominan **métodos instrumentales**.

Pocas características distinguen claramente los métodos instrumentales de los clásicos, más allá de la cronología de su desarrollo. Algunas técnicas instrumentales son más sensibles que las técnicas clásicas.

Además de los métodos enumerados en la segunda columna de la tabla, existe otro grupo de métodos analíticos que se utilizan para resolver y separar los compuestos estrechamente relacionados. Los métodos comunes de separación comprenden la cromatografía, destilación, la extracción, intercambio iónico, cristalización fraccionada y precipitación selectiva. Después de la etapa de separación se utiliza generalmente una de las señales enumeradas en la tabla para completar al análisis así.

Tabla III.2 Algunas señales analíticas.

Señal	Métodos basados en la medición de la señal.
Emisión de radiación	Espectroscopia de emisión (rayos X, ultravioleta, radiación visible), fotometría de llama. fluorescencia (rayos X, ultravioleta, radiación visible), métodos radioquímicos.
Absorción de la radiación	Espectrofotometría (rayos X, ultravioleta, radiación visible, infrarrojo); colorimetría; absorción atómica, resonancia nuclear magnética y espectroscopia de resonancia espín electrón..
Dispersión de radiación	Turbidimetría, nefelometría, espectroscopia Raman
Refracción de radiación	Refractometría, interferometría
Difracción de radiación	Rayos X, métodos de difracción electrónica.
Rotación de radiación	Polarimetría, dispersión óptica rotatoria y dicroísmo circular.
Potencial eléctrico	Potenciometría, cronopotenciometría
Corriente eléctrica	Polarografía, amperometría coulombimetría
Resistencia eléctrica	Conductimetría.
Razón masa a carga	Espectrometría de masa
Velocidad de reacción	Métodos cinéticos
Propiedades térmicas	Conductividad térmica y métodos de entalpía
Volumen	Análisis volumétrico
Masa	Análisis Gravimétrico

Entre los métodos que se basan en la absorción de la radiación se encuentran los llamados métodos ópticos de análisis, son los que se basan en la interacción de la energía y la materia, pero que su fundamento es: la absorción de radiación; emisión de radiación, dispersión, etc. Definiendo a la radiación electromagnética como la propagación de la energía a través del espacio sin soporte material.

La espectrofotometría o espectroscopia de absorción es una técnica instrumental que se basa en la medida de la absorción de radiación electromagnética en una banda definida y estrecha esencialmente monocromática por una especie química.

La potencia radiante de un haz o rayo de radiación es proporcional al número de fotones por unidad de tiempo. La absorción ocurre cuando un fotón choca con una molécula y la lleva a un estado de excitación. La velocidad de absorción cuando un haz de fotones pasa a través de algún medio depende del número de colisiones por unidad de tiempo, de los fotones con los átomos a las moléculas capaces de absorberlos si se duplica el número de moléculas capaces de absorber fotones, ya sea duplicando la longitud del trayecto de la radiación a través del medio (paso óptico) o la concentración de esa especie, la rapidez o tasa de absorción de fotones se duplica .

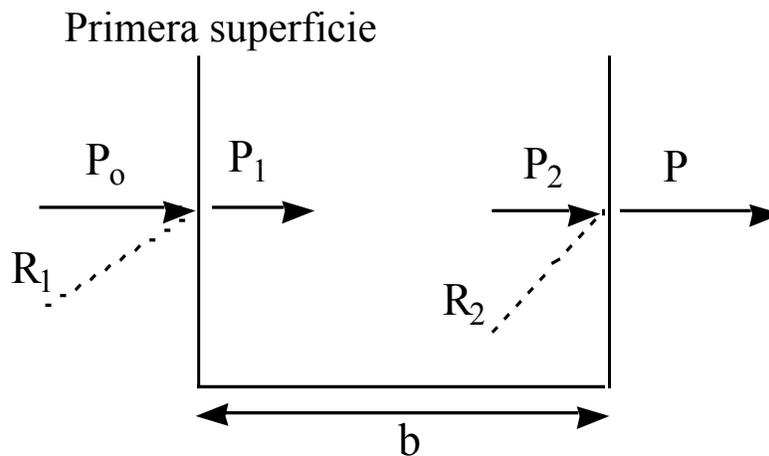


Figura III.2. Proceso de absorción.

Como se puede observar en la figura III.2, la luz de potencia radiante P_0 incide en la primera superficie de la muestra, cuyo espesor es b . La potencia radiante R_1 se refleja y la potencia radiante P_1 se absorbe a medida que atraviesa la muestra, la potencia P_2 llega a la segunda superficie. Aquí, la potencia P se transmite y la potencia R_2 se refleja.[19].

III.5. LEY DE BEER

Cuando una onda electromagnética de longitud de onda definida incide sobre una sustancia, la fracción de la radiación absorbida, ignorando las pérdidas debidas a reflexiones y disipación, es una función de la concentración de la sustancia en la trayectoria de la luz y del espesor de la muestra.

La complicación de la reflexión y de la absorción en la ventana puede evitarse definiendo P_0 como el poder de radiación que pasa a través de una muestra testigo contenida en la misma cubeta de la muestra.

La transmitancia T se define como la relación de intensidades (o del poder de radiación) de la radiación no absorbida (con respecto a la muestra testigo), P , y de la radiación incidente ; de esta forma

$$T = \frac{P}{P_0} \qquad \text{Ecuación III.1}$$

La absorbancia A , es el logaritmo decimal de la recíproca de la transmitancia

$$A = \log \frac{1}{T} = -\log \frac{P}{P_0} \qquad \text{Ecuación III.2}$$

El porcentaje es $100 T$; el porcentaje de absorción es $100 - 100 T$. Las aplicaciones analíticas del comportamiento de absorción de las sustancias pueden ser cuantitativas y cualitativas.

Las aplicaciones cualitativas de la espectrometría de absorción, dependen del hecho de que una cierta especie molecular sólo absorbe luz en regiones específicas del espectro y en grados variables de características de dicha especie particular. Al resultado se le conoce como espectro de absorción de esa especie y es la huella dactilar para propósitos de identificación.

Si consideramos la medida de un haz de fotones que pasa por un sistema de una especie absorbente, entonces el grado de absorción con respecto a la distancia atravesada es directamente proporcional al poder del haz de fotones P (la intensidad se mide en unidades de energía por unidad de tiempo o bien potencia). Así la reducción de la intensidad, $-dI$, puede enunciarse matemáticamente como

$$\frac{dP}{P} = -kP \quad \text{Ecuación III.3}$$

donde k es una constante de proporcionalidad característica de la especie absorbente y de la energía de los fotones, y P representa el poder de radiación a cualquier distancia x , reordenando:

$$-\frac{dP}{P} = -d(\ln P) = kdx \quad \text{Ecuación III.4}$$

Si ahora estipulamos que P_0 es el poder de radiación a $b = 0$ y que P es el poder radiante de la radiación transmitida que emerge del medio absorbente a $x = b$, la Ecuación IV.4 podrá ; integrarse con respecto al total del trayecto de la radiación.

$$\int_{P_0}^P d \ln P = k \int_0^b dx \quad \text{Ecuación III.5}$$

Obteniendo

$$\ln P - \ln P_0 = -kx \quad \text{Ecuación III.6}$$

La ecuación III.6 es la ecuación de la llamada **Ley de Lambert** que indica que para una cierta concentración de absorbente, la intensidad de la luz transmitida, que previamente se ha logrado que sea paralela plana y que entre al medio absorbente, formando ángulos rectos con el plano, disminuye logarítmicamente a medida que la longitud del trayecto aumenta en forma aritmética.

La relación entre la intensidad y la concentración de la especie absorbente tiene mucho más interés por lo que Beer determinó que; al aumentar la concentración del absorbente, se producía el mismo efecto que un aumento de proporcional en la longitud del trayecto de absorción de la radiación. De esta forma, la constante de proporcionalidad k la ecuación IV.6 es a su vez, proporcional a la concentración de soluto absorbente, esto es:

$$k = aC \quad \text{Ecuación III.7}$$

usando logaritmos de base 10 en lugar de naturales, solo puede modificarse el valor de k (o a). Así la forma combinada de las leyes es:

$$\log \frac{P_0}{P} = abC \quad \text{Ecuación III.8}$$

donde a incorpora el factor de conversión de base diez, es decir, 2.303. Esta es la expresión conocida como "**Ley Combinada de Lambert - Beer**" que por lo general se conoce solo como **Ley de Beer**

Sí la longitud de trayecto de la muestra se expresa en centímetros y la concentración y la concentración en gramos de absorbente por litro de solución, la constante a , llamada *absorbancia relativa* específica o coeficiente de absorción, tiene por unidades litro $\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Con frecuencia se desea especificar C en términos de concentraciones molares, manteniendo b en unidades de centímetros, Entonces la ecuación III.8 se escribe como:

$$\log \frac{P_0}{P} = \epsilon bC \quad \text{Ecuación III.9}$$

donde ϵ , en unidades de $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ se llama coeficiente molar o coeficiente molar de absorción o coeficiente de absortividad molar.

Una gráfica de la absorbancia en función de la concentración será una línea recta que pasa por el origen, tal como se muestra en la figura. III.3.

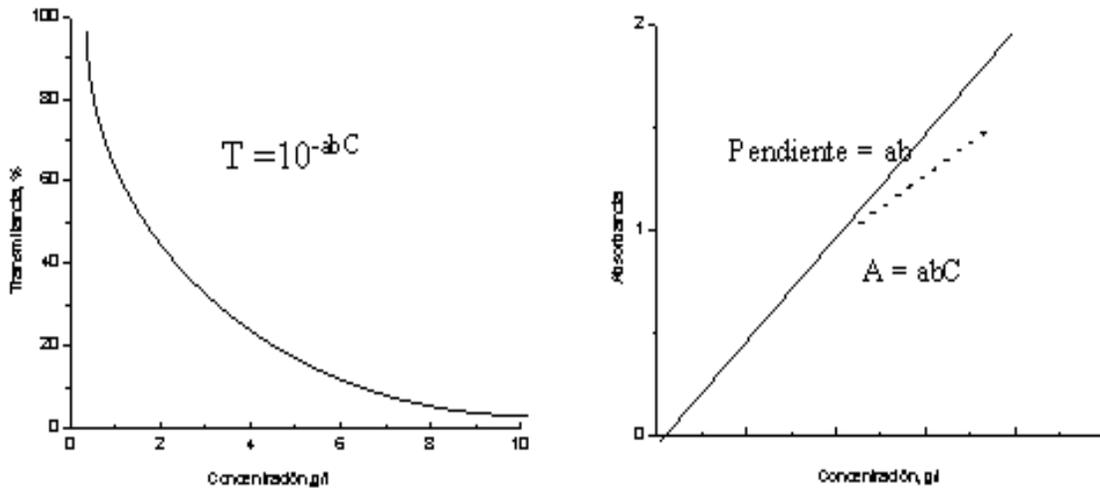


Figura III.3 Representación de la ley de Beer

Las escalas de lectura y de medición de los espectrofotómetros suelen estar calibradas para leer absorbancias y transmitancia. La sensibilidad de un espectrómetro depende de la magnitud de la absorbancia específica y de la absorbancia mínima que puede medirse con el grado de certidumbre requerido. [2,8,19]

III.6. DESVIACIONES CON RESPECTO A LA LEY DE BEER

Se clasifican, las desviaciones, en tres categorías : reales, instrumentales, y químicas.

Las **desviaciones reales** se originan en cambios del índice de refracción del sistema analítico. Kortum y Seiler señalaron que la ley de Beer sólo es aplicable en forma precisa a bajas concentraciones no es la absorbancia específica lo que es constante e independiente de la concentración, sino la expresión.

$$\alpha = \alpha_{real} \frac{n}{(n^2 + 2)^2} \qquad \text{Ecuación III.10}$$

donde **n** es el índice de refracción de la solución. A concentraciones **10⁻³ M** o menores, el índice de refracción es esencialmente constante. Y lo mismo sucede con la absorbancia específica. Esto no elimina la posibilidad de análisis cuantitativos a concentraciones elevadas, pues el uso de soluciones patrón y una curva de calibración pueden proporcionar una exactitud suficiente.

La derivación de la ley de Beer supone una luz monocromática, pero la luz verdaderamente monocromática sólo puede obtenerse en un alto grado con fuentes de emisión de líneas muy especializadas. Todos los monocromadores, cualquiera que sea su calidad y tamaño tienen un poder de resolución finito y, por consiguiente un paso de banda instrumental mínimo.

Sin embargo, si la absorbancia es esencialmente constante en la amplitud del paso de la banda instrumental , la ley de Beer concuerda con límites bastante precisos. De esta forma si la constante de absorbancia no es constante len el intervalo de longitudes de onda usado, la ley de Beer produce errores.

Las **desviaciones químicas** de la Ley de Beer son causadas por desplazamientos de un equilibrio químico o físico en el que participa la especie absorbente. Si una especie absorbente participa en un equilibrio ácido - base, la ley de Beer fallará, a menos que el pH y la fuerza iónica se mantengan constantes.

III.7. ERROR RELATIVO DE CONCENTRACIÓN.

$$C = \frac{A}{ab} = \frac{1}{ab} \log \frac{P_0}{P} = -l \frac{\log T}{ab} \quad \text{Ecuación III.11}$$

En las mediciones de absorción con una fuente constante, los cuantos de luz llegan a tal velocidad que la respuesta del detector no depende de su naturaleza discreta. El error relativo mínimo de concentración para detectores en los que el ruido es independiente de la intensidad de la energía radiante que llega al detector puede obtenerse como sigue. Suponiendo que se obedece la ley de Beer, al reordenar su expansión matemática se obtiene.

Al diferenciar la ecuación IV.11 tenemos:

$$dC = -\frac{0.434A}{ab} \left(\frac{dP}{P} \right) \quad \text{Ecuación III.12}$$

o

$$\frac{dC}{dP} = -\frac{0.434A}{Tab} \quad \text{Ecuación III.13}$$

Remplazando la cantidad ab por su equivalente en la ley de Beer y reordenando se obtiene:

$$\frac{dC}{C} = -\frac{0.434A}{A} \left(\frac{dP}{P} \right) \quad \text{Ecuación III.14}$$

o

$$\frac{dC}{dC} = -\frac{0.434A}{T} \left(\frac{dT}{T} \right) \quad \text{Ecuación III.15}$$

Por lo tanto el error relativo de concentración dC/C , depende en forma inversa del producto de la absorbancia y de la intensidad radiante transmitida.

La transmitancia para la cual el error es mínimo se determina diferenciando la ecuación anterior y estableciendo la derivada igual a cero.

$$\frac{d}{dP} \left(\frac{dC}{C} \right) = -\frac{dT}{2.3} \left(\frac{d}{dP} \right) \left(P \log \frac{P_0}{P} \right)^{-1} = \frac{dT}{2.3} \left(P \log \frac{P_0}{P} \right)^{-2} \left(\log \frac{P_0}{P} - 0.44 \right) = 0 \quad \text{Ec. III.16}$$

Esto produce la solución no trivial

$$\log \frac{P_0}{P} = 0.434 = A \dots T = 0.368 \quad \text{Ecuación III.17}$$

Entonces, el error mínimo resulta ser :

$$\frac{dC}{C} = \frac{-0.434}{(0.368)(0.434)} dT = -2.72 dT \quad \text{Ecuación III.18}$$

Esta ecuación es estrictamente cierta solo cuando se trabaja con diferencias. De esta forma, resulta razonable decir que un error de 0.1 % de la transmitancia produce un error de 0.27 % en la concentración de la muestra.[2, 8, 19].

III.8 EL COBRE.

El cobre es un metal de color pardo rojizo, dúctil y maleable, que pertenece al grupo I B de la Tabla Periódica.

Se suele encontrar en el medio ambiente formando compuestos con valencia 2, pero pueden existir estados metálicos de valencia +1 y +3. Este elemento está presente en la naturaleza en una gran variedad de sales minerales y compuestos orgánicos, y en forma metálica. El metal es muy poco soluble en soluciones acuosas, salinas o ligeramente ácidas, pero se puede disolver en los ácidos nítrico y sulfúrico, así como en soluciones básicas de hidróxido o carbonato de amonio. .[12]

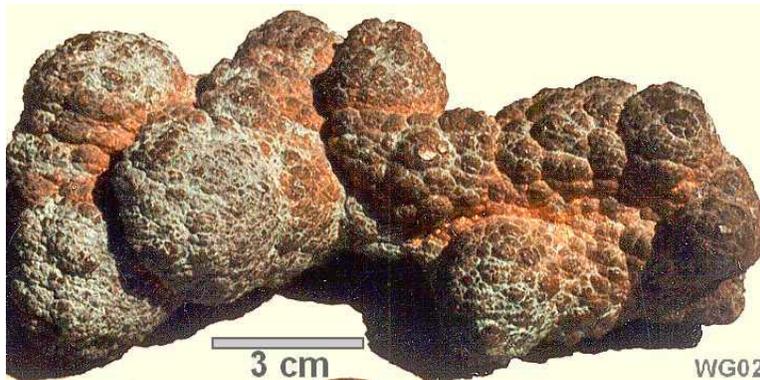


Figura III.4. Trozo de cobre metálico. .[15]

El cobre posee una elevada conductividad eléctrica y térmica y es resistente a la corrosión.

La gran variedad de especies del cobre, inorgánicas y orgánicas, ha dado lugar a una serie de técnicas de muestreo, preparación y métodos analíticos para cuantificar el elemento en muestras del medio ambiente y biológicas. La contaminación de las muestras por cobre procedente del aire, el polvo, los recipientes o los reactivos durante

la preparación y el muestreo es una fuente importante de errores analíticos, por lo que es fundamental el uso de técnicas "limpias"..[13]

Los métodos colorimétricos y gravimétricos para la medición del cobre son fáciles de usar y económicos; sin embargo, su utilidad se limita a las situaciones en las cuales no es indispensable una sensibilidad máxima. Para la medición de concentraciones bajas de cobre en diversas matrices, los métodos más utilizados son los de espectrofotometría de absorción atómica.

La sensibilidad aumenta enormemente con la utilización de la espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, en lugar de la de llama.

En función de los procedimientos de tratamiento previo, separación y concentración de la muestra, se han notificado límites de detección de alrededor 1 µg /litro en agua mediante espectrofotometría con horno de grafito y 20 µg /litro por la de llama y niveles de 0,05–0,2 µg /g de tejido con la primera.

Se puede conseguir una sensibilidad mayor mediante el uso técnicas de emisión, como las técnicas de plasma de argón con acoplamiento inductivo de alta temperatura (ICP), seguidas de espectroscopia de emisión atómica o espectrometría de masas. Existen otras metodologías más sensibles y especializadas, como la fluorescencia por rayos X, los métodos de electrodos selectivos de iones y potenciométricos y la voltametría de descascarillado anódico y de descascarillado catódico.

Desde hace mucho tiempo, el hombre ha tenido conciencia de la estrecha vinculación del cobre con la salud humana. Hoy se sabe que este mineral se combina con proteínas para producir un importante número de enzimas siendo esencial en la transferencia de electrones en una serie de rutas metabólicas críticas del sistema nervioso central. .[14]

Algunos de los procesos en los que participa el cobre son:

1. Participa en la transformación de la melanina para la pigmentación de la piel.
2. Genera la formación de enlaces cruzados en el colágeno y la elastina, sustancias para mantener y reparar los tejidos.
3. Da energía para las reacciones bioquímicas
4. Contribuye al buen funcionamiento del corazón y arterias
5. Participa en la formación de la hemoglobina de la sangre

Por lo mismo, es ampliamente utilizado en productos de belleza ya que retrasa el envejecimiento celular y mantiene elástica la piel.

También se le usa en ciertos tratamientos de la inflamación provocada por la artritis, y se avanza en investigaciones para incorporarlo en medicamentos para úlceras e inflamaciones, radiología, y tratamientos de convulsiones y epilepsia

Las fuentes naturales de exposición al cobre son el polvo arrastrado por el viento, los volcanes, la vegetación en descomposición, los incendios forestales y la dispersión marina. Entre las emisiones antropogénicas cabe mencionar los hornos de fusión, las fundiciones de hierro, las centrales eléctricas y fuentes de combustión como los incineradores municipales. El desplazamiento principal del cobre a la tierra se produce a partir de las escorias y el manto de las minas de cobre y los fangos cloacales. El uso agrícola de productos de cobre representa el 2% de la liberación de cobre al suelo.

Los minerales de cobre se extraen, funden y refinan para la fabricación de numerosos productos industriales y comerciales. Se utiliza ampliamente en utensilios de cocina y sistemas de abastecimiento de agua, así como en fertilizantes, bactericidas, fungicidas, alguicidas y pinturas antiincrustantes. Se emplea asimismo en aditivos de piensos y estimulantes del crecimiento, así como en la lucha contra determinadas enfermedades del ganado vacuno y de las aves.

El cobre se utiliza en la industria como activador en la flotación por espuma de los minerales sulfurosos, la producción de conservantes de la madera, la galvanoplastia, la fabricación de colorantes nitrogenados, como mordiente para tintes de tejidos, en el refinado del petróleo y en la fabricación de los compuestos de cobre.

El envenenamiento agudo de cobre es un suceso raro, y solo ocasionado por la ingestión accidental de soluciones del cobre o nitrato de sulfato de cobre. Las sales anteriores y aquellas sales orgánicas de cobre son poderosos eméticos (sustancias que inducen al vómito) por lo que las dosis grandes que se ingieran de manera inadvertida son rechazadas normalmente. El envenenamiento crónico de cobre por la ingestión en alimentos es también muy raro y los pocos informes existentes se refieren a pacientes con enfermedades del hígado. .[14]

III.9 EL HIERRO.

El hierro es un metal de color gris plateado, maleable, tenaz y es magnético, pertenece al grupo VIII B de la Tabla Periódica. Posee un número atómico de 26 y un peso atómico 55.847. El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre constituyendo el 5% de esta. Los cuatro isótopos estables, que se encuentran en la naturaleza, tienen las masas 54, 56, 57 y 58. Los dos minerales principales que lo contienen son la hematita, Fe_2O_3 , y la limonita, $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Las piritas, FeS_2 , y la cromita, $\text{Fe}(\text{CrO}_2)_2$, se explotan como minerales de azufre y de cromo, respectivamente. El hierro se encuentra en muchos otros minerales y está presente en las aguas freáticas y en la hemoglobina roja de la sangre.



Figura III.5. Trozo de hierro metálico. .[17]

La presencia del hierro en el agua provoca precipitación y coloración no deseada. Existen diversas técnicas de separación de hierro del agua. El uso más extenso del hierro es para la obtención de aceros estructurales; también se producen grandes cantidades de hierro fundido y de hierro forjado. Entre otros usos del hierro y de sus compuestos se tienen la fabricación de imanes, tintes (tintas, papel para heliográficas, pigmentos pulidores) y abrasivos (colcótar).[16]

Existen varias forma alotrópicas del hierro. La ferrita es estable hasta 760 °C (1400 °F).

El cambio del hierro B comprende principalmente una pérdida de permeabilidad magnética porque la estructura de la red (cúbica centrada en el cuerpo) permanece inalterada. La forma alotrópica tiene sus átomos en arreglos cúbicos con empaquetamiento cerrado y es estable desde 910 hasta 1400°C (1670 hasta 2600°F).

Este metal es un buen agente reductor y, dependiendo de las condiciones, puede oxidarse hasta el estado 2+ a 3+ o 6+. En la mayor parte de los compuestos de hierro está presente el ión ferroso, hierro(II), o el ión férrico, hierro(III), como una unidad distinta.

Por lo general, los compuestos ferrosos son de color amarillo claro hasta café verdoso oscuro; el ión hidratado $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, que se encuentra en muchos compuestos y en solución, es verde claro. Este ión presenta poca tendencia a formar complejos de coordinación, excepto con reactivos fuertes, como el ión cianuro, las poliaminas y las porfirinas.

El ión férrico, por razón de su alta carga (3+) y su tamaño pequeño, tiene una fuerte tendencia a capturar aniones. El ión hidratado $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, que se encuentra en solución, se combina con OH^- , F^- , Cl^- , CN^- , SCN^- , N_3^- , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ y otros aniones para forma complejos de coordinación.

Un aspecto interesante de la química del hierro es el arreglo de los compuestos con enlaces al carbono. La cementita, Fe_3C , es un componente del acero. Los complejos con cianuro, tanto del ión ferroso como del férrico, son muy estables y no son intensamente magnéticos, en contraposición a la mayor parte de los complejos de coordinación del hierro. Los complejos con cianuro forman sales coloradas.

El Hierro puede ser encontrado en carne, productos integrales, patatas y vegetales. El cuerpo humano absorbe Hierro de animales más rápido que el Hierro de las plantas.

El Hierro es una parte esencial de la hemoglobina: el agente colorante rojo de la sangre que transporta el oxígeno a través de nuestros cuerpos.

Puede provocar conjuntivitis, coriorretinitis, y retinitis si contacta con los tejidos y permanece en ellos. La inhalación crónica de concentraciones excesivas de vapores o polvos de óxido de hierro puede resultar en el desarrollo de una neumoconiosis benigna, llamada siderosis, que es observable como un cambio en los rayos X. Ningún daño físico de la función pulmonar se ha asociado con la siderosis.

La inhalación de concentraciones excesivas de óxido de hierro puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en trabajadores expuestos a carcinógenos pulmonares. LD50 (oral, rata) =30 gm/kg. (LD50: Dosis Letal 50. Dosis individual de una sustancia que provoca la muerte del 50% de la población animal debido a la exposición a la sustancia por cualquier vía distinta a la inhalación. Normalmente expresada como miligramos o gramos de material por kilogramo de peso del animal.)

El hierro (III)-O-arsenito, pentahidratado puede ser peligroso para el medio ambiente; se debe prestar especial atención a las plantas, el aire y el agua. Se recomienda encarecidamente que no se permita que el producto entre en el medio ambiente porque persiste en éste. [16]

III.10. TÉCNICAS DE MUESTREO.

Un diseño muestral es un plan definido especificado antes de recopilar cualquier dato, para obtener una muestra de una población dada. Los tipos de muestreo que existen son :

1. Muestreo estratificado
2. Muestreo por conglomerados
3. Muestreo sistemático.
4. Muestreo aleatorio simple.

III.10.1. Muestreo Estratificado.

El objetivo del diseño de encuestas por muestreo, es maximizar la cantidad de información obtenida, ó bien, minimizar el límite para el error de estimación a un costo dado. El muestreo irrestricto aleatorio, diseño básico de muestreo, suele suministrar buenas estimaciones de cantidades poblacionales a un costo dado.

Una muestra aleatoria estratificada es la obtenida mediante la separación de los elementos de la población en grupos que no presenten traslapes, llamados estratos, y la selección posterior de una muestra irrestricta aleatoria simple de cada estrato. .[5, 7]

$$n = \frac{N\Gamma^2}{(N-1)(D + \Gamma^2)} \quad \text{Ecuación III.19}$$

III.10.2. Muestreo por Conglomerados.

Es aquella que se obtiene estratificando primero el marco de muestreo y seleccionando después todos los elementos de algunos estratos, pero no todos los estratos.

III.10.3. Muestreo Sistemático

Permite obtener una muestra aleatoria sistemática, que es aquella donde se selecciona todo k-ésimo elemento de la población después de un inicio aleatorio entre los primeros

k-elementos, donde $k = \frac{N(\text{Población})}{n(\text{muestra})}$. [22]

III.10.4. Muestreo Aleatorio Simple

Una muestra es aleatoria si cada elemento de la población tiene igual oportunidad de ser incluida en la muestra. Esta definición implica que la selección de muestras aleatorias ha de ser, de alguna manera, dejada a la casualidad, y por cierto, es práctica usual basar el muestreo aleatorio en algún tipo de juegos de azar.

Sea N y n respectivamente el número de elementos en la población y en la muestra si se hace el muestreo de cada una de las $\binom{N}{n}$ muestras tiene la misma probabilidad de ser escogida y el resultado es una muestra aleatoria.

$$n = \left(\frac{Z_{\alpha/2} \Gamma}{\beta} \right)^2 \quad \text{Ecuación III.20}$$

Error de estimación es del 20%, $\beta = 0.20$, el nivel de confianza es de 95 %, $Z_{\alpha/2} = 1.96$.

[5]

III.11. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

III.11.1 DEFINICIÓN

La validación del método es un requisito importante en la práctica del análisis químico. La validación es el conjunto de verificaciones necesarias para asegurar las características de desempeño y limitaciones de un método y demostrar que este está científicamente regido bajo las condiciones para las cuales debe ser aplicado. Se comparan los parámetros de desempeño del método con los requerimientos necesarios de los datos analíticos.

La validación de un método es un proceso basado en la confirmación de su desempeño y de que el mismo es consistente con los requerimientos de su aplicación. El laboratorio de servicio y su personal tienen una clara responsabilidad de justificar la confianza del cliente, proporcionando la respuesta correcta a la parte analítica del problema, en otras palabras debe demostrarse que los resultados son “adecuados para el propósito”. Para esto será suficiente que cualquier decisión que se tome basada en él sea confiable. De manera que, el desempeño del método debe ser válido y, de igual manera, deberá estimarse la incertidumbre del resultado y analizar las muestras adecuadas.

III.11.2. JERARQUÍA DE LA METODOLOGÍA

La jerarquía de la metodología procede de lo general a lo específico, puede considerarse como sigue

Técnica → método → procedimiento → protocolo

La técnica es el principio científico útil para proveer información sobre la composición de una sustancia.

El método es la adaptación de una técnica para mediciones de parámetros analíticos seleccionados.

El procedimiento son las direcciones generales escritas necesarias para utilizar un método.

El protocolo son las serie de direcciones definitivas que deben seguirse sin excepción para utilizar un método.

III.11.3. VALIDACIÓN DE MÉTODOS

Algunos aspectos importantes a tomar en cuenta para ver si es necesario verificar las características de desempeño de la validación de un método, y saber si son las adecuadas para su uso en la resolución de un problema analítico en particular. La validación es necesaria en los siguientes casos:

1. Desarrollo de un método nuevo para resolver un problema.
2. Revisión de un método establecido para incorporar mejoras o ampliar su aplicación a un nuevo problema.
3. Cuando el control de calidad indica que un método establecido está cambiando a través del tiempo.
4. Un método establecido usado por primera vez en un laboratorio (diferente) o con diferentes analistas o instrumentos de laboratorio.
5. Para demostrar la equivalencia entre dos o mas métodos (el nuevo y el normal o revalidación).

III.11.4. DESARROLLO DEL MÉTODO

Puede tomarse de diferentes formas: en un extremo, puede significar adaptar un método existente, realizando cambios menores, de tal manera que sea adecuado para la nueva aplicación, en el otro extremo el químico analista podrá comenzar desde unas ideas en borrador y aplicar la experiencia para establecer un método adecuado, al punto de que podría involucrar una innovación significativa.

III.11.5. PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO Y SU SIGNIFICADO

III.11.5.1 EL MÉTODO DE LA ADICIÓN PATRÓN

Uno de los principales problemas en las determinaciones de los analitos en las muestras es el efecto de matriz, la cual se define como las interferencias de los diferentes componentes de la muestra en la determinación del componente principal. Esto significa que la señal detectada será una respuesta no solamente del componente principal (o analito) sino debido a otros componentes de la matriz. El efecto de matriz puede o aumentar o disminuir la señal verdadera, lo que trae como consecuencia un error sistemático en la determinación analítica. Para minimizar las interferencias de la matriz, se ha implementado la curva de calibración por el método de adición de adición estándar.

La técnica analítica mas común para el análisis cuantitativo se basa en la concentración de una curva patrón o estándar.

Adición Patrón: Para ganar seguridad en la utilización de las rectas de calibrado, o sea, de la correcta similitud en el comportamiento de patrones y problemas, es aconsejable el método de las adición estándar.

Las dudas suelen plantearse en los sistemas analíticos complejos o para las muestras con matrices difícilmente reproducibles en los patrones, cual es el caso de alimentos, muestras biológicas o del medio ambiente, y evidentemente cuando concurren las dos circunstancias, por ejemplo, en la determinación de metales pesados por voltamperometría de redisolución anódica en sangre. La duda surge al no disponer de muestras de la misma matriz pero sin contaminación del metal, para utilizarla en la preparación de los patrones de calibración.

Una solución es preparar los patrones con la misma muestra. Para ello se toman varios volúmenes iguales de la disolución a analizar, añadiendo a algunas de ellas cantidades perfectamente conocidas de la especie química a determinar y todas las alícuotas se enlazan al mismo volumen. Con ello se dispone de una serie de preparaciones que contienen, además de la cantidad problema (no conocida), las cantidades adicionadas, incluyendo la adición cero y valores que cubren el margen de linealidad.

El método de las adiciones se apoya en dos premisas no siempre válidas; una es suponer que en el sistema analítico los patrones adicionados se comportan de la misma forma que lo hace la sustancia contenida en la muestra, pues no podemos asegurar que correspondan a la misma especie o combinación química (estado de oxidación o de complejación, etc.). Otra suposición es que la relación señal / concentración mantiene la misma función lineal (concretamente la misma pendiente) fuera del margen calibrado, pues se deduce la concentración por extrapolación. Si con el método de las adición patrón se detecta interferencia, se recomienda modificar las condiciones experimentales o utilizar modificaciones de matriz para eliminar o reducir al mínimo la interferencia.

Los criterios de eficiencia pueden clasificarse en primarios y secundarios. Los criterios primarios son:

- a. Precisión, es una medida de que tan cerca están los resultados entre si y usualmente se expresa por medio del valor de la desviación estándar, que describe la dispersión, o sea que, describe el tamaño de los errores aleatorios.
- b. Exactitud o Bias (sesgo), que mide la magnitud de los errores sistemáticos.
- c. Limite de detección, que mide la cantidad mínima que puede diferenciarse de la señal de ruido de fondo.

III.11.5.2. LÍMITE DE DETECCIÓN

Uno de los puntos característicos de la recta de calibrado es la señal para la concentración cero, que puede tener diferente significado si corresponde a la medida realizada sobre los reactivos sin la muestra (prueba en blanco de los reactivos).

O bien, se realiza sobre la muestra sin alguno de los reactivos esenciales (prueba en blanco de la matriz de la muestra). Las explicaciones que puedan darse a la desviación desde cero hacia valores positivos o negativos de la señal para las pruebas en blanco, constituyen un buen índice del grado de conocimiento que el científico posee del procedimiento analítico .

Ambas señales de las pruebas en blanco suelen acumularse sobre las de la muestra, aunque de manera diferente a las señales de los patrones, por lo que es más prudente mantener estos valores en la representación de la recta de calibrado, y sustraer al resultado de concentración del correspondiente a la prueba en blanco.

La señal de la prueba en blanco también presenta errores experimentales y, por lo tanto, una dispersión de valores que afectan al límite de detección del procedimiento.

$$L.D = \frac{3.29 * Sb_0}{b_1} \qquad \text{Ecuación III.21}$$

Así como la pendiente de la recta de calibrado es un índice de la sensibilidad del procedimiento analítico, la precisión de esta pendiente y la de la ordenada en el origen establecen el límite de detección, o sea la cantidad mínima de sustancia detectable cuantitativamente.

El valor del límite de detección se establece con criterios de probabilidad de cometer error por asignar un valor a la señal de un blanco, o bien por asignar el valor del blanco (no detectable) cuando en realidad la muestra contiene cantidad significativa de sustancia.

También aquí la estadística proporciona diversos modelos para establecer estos límites, según el grado de seguridad que se desee alcanzar. En algunas técnicas instrumentales se llama "ruido de fondo" a la dispersión de la señal del blanco, estableciéndose como límite de detección la concentración que da una señal doble o triple respecto a la señal de fondo.

Es incorrecto utilizar expresiones como "no detectable", "ausencia" o "0", como resultado correspondiente a señales iguales a la prueba en blanco, siendo correcto decir que el resultado de una señal no diferenciable de la prueba en blanco es "inferior al límite de detección", cuyo valor se ha determinado previamente.

Los criterios secundarios son los que tienen influencia en los primarios; estos son:

1. Linealidad, que describe el comportamiento entre la respuesta y la concentración a través del modelo de calibración (una desviación del modelo representa un bias).
2. Rango, representa el intervalo (niveles inferior y superior del analito) en el cual la relación lineal u otro modelo de calibración utilizado es correcta.

III.11.5.3. LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

Es la más baja concentración del analito que puede ser cuantificada con suficiente precisión y exactitud. También es definido, convencionalmente, como la concentración de analito que corresponde al blanco de la muestra, más 5, 6 ó 10 desvíos estándar de la media (del blanco), también se le conoce como "límite de determinación".

Se suele calcular utilizando la siguiente fórmula:

$$LQ = \frac{10 * Sb_0 - b_0}{b_1} \qquad \text{Ecuación III.22}$$

III.11.5.4. SELECTIVIDAD

Este parámetro asegura que la señal medida no es influenciada por otras sustancias presentes en la muestra y en caso contrario, garantiza la remoción de las mismas, otro aspecto importante de la selectividad es si el analito puede existir en la muestra de una forma, tal como enlazado o libre, inorgánico u organometálico, o en diferentes estados de oxidación.

III.11.5.5. SENSIBILIDAD

Es el parámetro que mide la magnitud del cambio en la función de respuesta (o señal) con la concentración y corresponde a la pendiente de la curva de respuesta.

III.11.5.6. ROBUSTEZ O FORTALEZA

En cualquier método, existen ciertas etapas que, sino se llevan a cabo con cuidado provocan un efecto degradante sobre su desempeño e inclusive, podría hacer que el método no responda del todo. Estas etapas deben identificarse, normalmente, como parte del desarrollo del método y de ser posible evaluar su influencia utilizando pruebas de robustez.

Esto se refiere a hacer variaciones deliberadas al método e investigar su consecuente efecto en el desempeño (ya sea en su precisión o exactitud), esto hace posible la identificación de variables en el método que tienen el efecto mas significativo y por tanto, aseguran que cuando se utiliza el método, son controladas adecuadamente.

La puesta en práctica de la robustez se puede ver a tres niveles

1. Requiere verificar la insensibilidad del método a cambios menores en las condiciones operacionales y del medio ambiente incluyendo la reproducibilidad de otro analista.
2. Requiere una verificación del efecto de cambios en condiciones severas, tal como, el uso de columnas cromatográficas obtenidas por diferentes proveedores o la sustitución de diferentes equipos y efectuar la experimentación en diferentes laboratorios conocido como análisis de ínter laboratorio.
3. Requiere verificar la robustez en un estudio de colaboración entre al menos ocho laboratorios diferentes.

Una prueba de robustez requiere tiempo, paciencia, y en muchos laboratorios no la efectúan por que la consideran como un gasto y no como una inversión. Esta prueba se debe ver como parte de las buenas practicas de laboratorio, sobre todo en laboratorios donde más de un experimentador efectuando el mismo procedimiento analítico (o similar).

III.11.5.7. EVALUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE.

En la “Guía para la expresión de la incertidumbre de las mediciones” (GEUM, por sus siglas en inglés) de la Organización internacional para la normalización (ISO). Se dan métodos prácticos para determinar, calcular y reportar la incertidumbre de las mediciones de una manera clara.

Es importante notar que hasta el presente, cualquier medición realizada por un científico ha tenido un error y lo será así en el futuro.

Se hace necesario tener un método normalizado para describir y reportar la calidad de los datos procedentes de las mediciones. Esta técnica esta basada en dos principios:

- a. **Primero:** La contribución a la incertidumbre puede ser estimada ya sea por observación del experimento repetido o por otros medios : por ejemplo usando datos tales como la incertidumbre de los materiales de referencias publicados o el juicio profesional.
- b. **Segundo:** Separar la contribución no obstante evaluada, son expresadas en forma de varianzas y cuando es necesario combinadas como tales.

La implementación de estos principios desarrollados en el GEUM real en un modelo cuantitativo del sistema de medición, típicamente acuerpado en una ecuación matemática que influyen todos los factores de entradas relevantes (factores de influencia). La incertidumbre general luego es estimada vía la propagación de la incertidumbre. La ley referida es para usar los principios de propagación del error usualmente. La expresión general es:

$$U[Y_{(X_1, X_2, \dots, X_n)}] = \sqrt{\sum_{i=1, n} \left[\frac{\delta_Y}{\delta_{X_i}} u(x_i) \right]^2 + \sum_{i, k=1, n-1 \neq k} \left[\frac{\delta_Y}{\delta_{X_i}} * \frac{\delta_Y}{\delta_{X_k}} S(x, ik) \right]} \quad \text{Ec. III.23}$$

donde el resultado $Y(X_{ij} \dots)$ es una función de n parámetros $X_i, X_j, \dots, u(Y \dots)$ su incertidumbre estándar, $U(X_i)$ la incertidumbre asociada con X_i , $\delta y / \delta x_i$ es la diferencia parcial con respecto a X_i y $S(x, ik)$ es la covarianza entre X_i y X_k . El termino de la covarianza no se aplica cuando los efectos son independientes esto es, $S(x, ik) = 0$. Es por consiguiente esencial y eficaz estudiar todos los efectos relevantes individuales sobre los resultados.

III.11.5.7.1. INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN

Es el parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que pudieran ser razonablemente atribuidos a la magnitud a medir.

III.11.5.7.2. INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR

Es la incertidumbre del resultado de una medición expresado como una desviación estándar.

III.11.5.7.3. INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR COMBINADA

Es la incertidumbre estándar del resultado de una medición cuando este es obtenido de una combinación de valores de otras cantidades y es igual a la raíz cuadrada positiva de una suma de términos; estos términos son las varianzas o covarianzas de las otras cantidades, ponderadas de acuerdo a la variación del resultado de la medición con el cambio de estas cantidades.

III.11.5.7.4. INCERTIDUMBRE EXPANDIDA

Es la cantidad que define un intervalo para el resultado de una medición, en el cual puede esperarse que se encuentre una fracción grande de la distribución de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al objeto medible. Esta se denota por U_e y se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada (U_c) por un factor de cobertura (K)..

$$U_e = KU_c \quad \text{Ec. III.24}$$

El factor de cobertura (K) se escoge con base en el nivel deseado de confianza a ser asociado con el intervalo. En general K estará en el ámbito 2-3 correspondientes al nivel de confianza entre el 99%.

III.11.5.7.5. INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA.

Se denota por IER y se obtiene dividiendo la media de la incertidumbre combinada con respecto a la media poblacional de los factores multiplicado por cien. .[21]

$$\%IER = \frac{\bar{U}}{\bar{X}} * 100 \quad \text{Ec. III.25}$$

IV. PARTE EXPERIMENTAL.

IV.1. EQUIPOS Y MATERIALES

1. Espectrofotómetro Shimatzu (Modelo UV 1203, serie 530109)
2. Balanza Analítica Sartorius (Modelo H110, serie 10301663)
3. pH – metro Crison (pH micro 22002) serial No 3438
4. Plancha de calentamiento Fisher Scientific Model No 11 – 500 – 12 SH
5. Balones aforados de 100 ml clase A Pyrex
6. Balones aforados de 50 ml clase A Kimax
7. Balones Aforados de 25 ml clase A Vidra Foc
8. Beaker de 10 ml clase A Pirex
9. Probeta de 100 ml EXA
10. Probeta de 10 ml Gor .
11. Pipeta serologica de 10 ml Clase A KEBO Lab
12. Pipeta Aforada de 5 ml clase A BELLCO
13. Pipeta aforada de 2 ml clase A BELLCO
14. Micro pipeta Fija de 100 μ l Fija Labssystem
15. Celdas de Plástico
16. Viales de 50 ml
17. Pizetas de 500 ml Fisher Brand
18. Pizetas de 250 ml Fisher Brand

IV.2 REACTIVOS

1. $\text{Cu}(\text{SO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Merck
2. Ácido ascórbico Fisher Scientific.
3. 2,2'- Bipyridina Merck.
4. Alcohol Fisher Scientific.
5. Agua desionizada. Campus Médico.
6. $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ Sal de Mohr. Merck
7. Ácido sulfúrico concentrado Fisher Scientific.
8. Ácido Clorhídrico concentrado Fisher Scientific.
9. Ácido Nítrico concentrado Fisher Scientific.

IV.3. PROCEDIMIENTO

IV.3.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

IV.3.1.1. SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE COBRE II (248.05 mg Cu / L)

Se Pesa 0.09651 g de sulfato de cobre Penta hidratado aproximadamente, se transfiere a un frasco volumétrico de 100 ml luego agregar un poco de agua y disolver, una vez disuelto aforar a 100 ml. Guardar en una botella de vidrio tapada.

IV.3.1.2. SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE TRABAJO DE Cu II (49.6 mg / L)

Se toman 10 ml de la solución madre de cobre (248.05 ppm) con una pipeta volumétrica y se transfirió a un frasco volumétrico de 50 ml luego se diluye a volumen de aforo con agua desionizada.

IV.3.1.3. SOLUCIÓN DE 2,2 BIPYRIDINA (0.2 %)

Se pesaron 0.2 g de 2,2 Bipyridina y se lleva a un frasco de 100 ml, se agregan 20 ml de agua desionizada y luego se calienta en una plancha de calentamiento por 10 min. dejar enfriar a temperatura ambiente y luego aforar con agua desionizada.

IV.3.1.4 SOLUCIÓN CRÓMICA

En una balanza analítica pesamos 2 gr de Cromato de potasio , le agregamos 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y lo transferimos a un balón de 500 ml aforándolo con agua desionizada hasta enrase.

IV.3.1.5 SOLUCIÓN DE ÁCIDO NÍTRICO AL 10 %

En un balón de 100 ml agregar 10 ml de Ácido nítrico concentrado y luego aforar hasta enrase con agua desionizada.

IV.3.1.6. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE RON (AGUARDIENTE) PARA EL Cu

Se toman 2 ml de la muestra con una probeta de 10 ml y se transfiere a un balón aforado de 25 ml luego se agregan 0.0489 g de ácido ascórbico, después 2 ml de 2,2 bipyridina al 0.2 % y se deja que se desarrolle el color por 60 min. luego se lee en el espectrofotómetro a 328.5 nm.

IV.3.1.7. SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE HIERRO (71.23 ppm)

Pesar 0.05 gr de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,disolver en agua desionizada, a esta solución se le agrega 1 ml de HCl concentrado y se transfieren cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 ml. Los 100 ml se completan con agua desionizada.

IV.3.1.8. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE RON (AGUARDIENTE) PARA EL Fe

Se toman 2 ml de la muestra con una probeta de 10 ml y se transfiere a un balón aforado de 25 ml luego se agregan 0.1mg de ácido ascórbico, después 2 ml de 2,2 bipyridina al 0.2 % y se deja que se desarrolle el color por 60 min. luego se lee en el espectrofotómetro a 522.5 nm.

IV.3.1.9. SOLUCIÓN DE ALCOHOL AL 80 % :

Tomar 84 ml de alcohol al 95 % en un balón de 100 ml y aforamos con agua desionizada hasta enrase.

IV.3.2. PREPARACIÓN DE CURVAS DE CALIBRADO

IV.3.2.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN NORMAL PARA EL Cu

Usando pipetas volumétricas se preparan una serie de estandartes de cobre, transfiriendo 2.5 , 3.7 , 5.0 , 6.3 y 7.5 ml de la solución de trabajo (49.6 mg / L) a un balón de 25 ml estos estándares que contienen 5.0 , 7.5 , 10.0 , 12.5 y 15.0 mg de Cu / L respectivamente luego se le agregan 0.0489 g de ácido ascórbico a continuación se le agrega 2 ml de 2,2 bipyridina y se afora con alcohol al 80 %, para luego dejar que desarrolle el color por 60 min. y luego medir la absorbancia a 328.5 nm.

IV.3.2.2. CURVA DE CALIBRACIÓN POR ADICIÓN PATRÓN PARA EL Cu

Se toman 2 ml de la muestra y luego se le agrega a cada balón de 25 ml de 2.5 , 3.7 , 5.0 , 6.3 y 7.5 respectivamente luego se le agregaron a cada frasco 0.0489 g de ácido ascórbico después se le agrego 2 ml de 2,2 bipyridina y se afora con alcohol al 80 % . dejar que se desarrolle el color por 60 min. Para después medir la absorbancia a 328.5 nm.

IV.3.2.3 CURVAS DE CALIBRACIÓN NORMAL PARA Fe

Usando pipetas volumétricas se preparan una serie de estándares de hierro, transfiriendo 0.877, 1.75, 2.63, 3.5, 4.38 ml de la solución estándar de hierro (71.23 mg/L) a un balón de 25 ml estos estándares que contienen 2.5 ,5.0 , 7.5 , 10.0 , Y 12.5 mg de Fe /L respectivamente luego se le agregan 0.1 g de ácido ascórbico a continuación se le agrega 2 ml de 2,2 bipyridina y se afora con alcohol al 80 %, para luego dejar que desarrolle el color por 60 min. y luego medir la absorbancia a 522.5 nm.

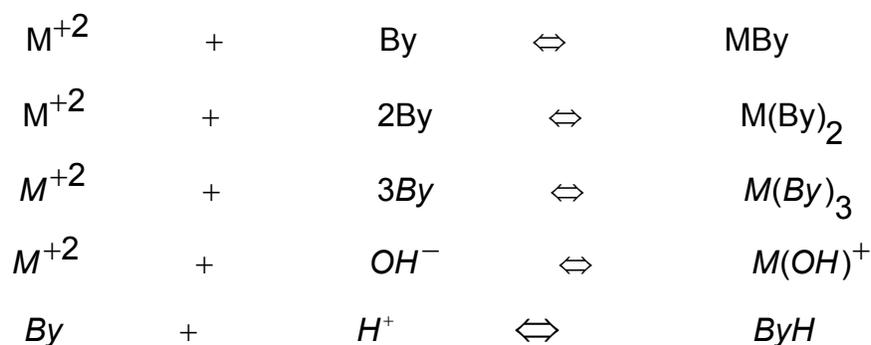
IV.3.2.4. CURVA DE CALIBRACIÓN POR ADICIÓN PATRÓN PARA Fe

Se toman 2 ml de la muestra y luego se le agrega a cada balón de 25 ml 0.877, 1.75, 2.63, 3.5, 4.38 ml de la solución estándar de hierro respectivamente luego se le agregaron a cada frasco 0.1 g de ácido ascórbico después se le agrego 2 ml de 2,2 bipyridina AL 0.2% y se afora con alcohol al 80 % , dejar que se desarrolle el color por 60 min. Para después medir la absorbancia a 328.5 nm.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

V.1. DIAGRAMAS DE DISTRIBUCIÓN DE LOS COMPLEJOS FORMADOS EN LA REACCIÓN DEL Fe(II) y Cu(II) CON 2,2'-BIPRIDINA.

Previo a la realización del trabajo experimental se realizó un estudio de las zonas de predominio de los complejos de los metales considerados Fe(II) y Cu(II) con el complejante 2,2' bipyridina en medio acuoso, para esto se elaboró un diagrama de distribución considerando los posibles equilibrios de formación involucrados. Según la bibliografía consultada tanto en el caso del Fe(II) como en el del Cu(II), se reporta la existencia de tres complejos, por lo que consideramos los equilibrios siguientes:



Basándonos en estos equilibrios definimos las funciones de distribución necesarias para elaborar los diagramas de distribución, considerando el posible efecto del pH en la formación de estos. Las funciones consideradas fueron las siguientes:

$$\phi_{Mu} = \frac{1}{1 + \beta_1[By] + \beta_2[By]^2 + \beta_3[By]^3 + \beta_{OH}[OH]}$$

$$\phi_M = \frac{1}{1 + \beta_1 \left[\frac{C_{By}}{1 + \beta_a[H]^+} \right] + \beta_2 \left[\frac{C_{By}}{1 + \beta_a[H]^+} \right]^2 + \beta_3 \left[\frac{C_{By}}{1 + \beta_a[H]^+} \right]^3 + \beta_{OH}[OH]}$$

$$\phi_{MBy} = \phi_M \beta_1 [By]$$

$$\phi_{M(By)_2} = \phi_M \beta_1 [By]^2$$

$$\phi_{M(By)_3} = \phi_M \beta_1 [By]^3$$

$$\phi_{MOH} = \phi_M \beta_{OH} \left[\frac{K_W}{[H^+]} \right]$$

Una vez definidas estas funciones procedimos a la elaboración de los diagramas de distribución tanto del Fe(II) como del Cu(II) con la 2,2'-bipiridina en el intervalo de pH de 0 a 14. Los diagramas obtenidos se muestran en la figuras V.1. (a). y V.1. (b).

Los valores de $\log\beta$ de los complejos que se utilizaron en la construcción de estos diagramas se muestran en la Tabla V.1.

Tabla V.1 Constantes de formación de complejos.

Especie	$\text{Log}\beta_1$	$\text{Log}\beta_2$	$\text{Log}\beta_3$	$\text{Log}\beta_{\text{OH}}$	pKa
Cu(II)	8.1	13.5	17.0	6.0	-
Fe(II)	4.4	8.0	17.6	4.5	-
2,2'-By	-	-	-	-	4.45

De acuerdo al diagrama de distribución obtenido para el cobre, se deduce que el Cu en estado elemental no tiene presencia apreciable en el intervalo de pH considerado observándose una pequeña presencia entre pH 0 y 0.5. Por otro lado la especie $\text{Cu}(\text{OH})^+$, no tiene presencia alguna en el intervalo estudiado.

Sin embargo las especies del Cu y 2,2'-bipiridina tienen presencia apreciable en este intervalo de pH. Así por ejemplo la especie $\text{Cu}(\text{By})_1$ tiene presencia entre valores de pH entre 0 y 3.5, obteniendo su máxima presencia a pH 0, por otro lado la especie $\text{Cu}(\text{By})_2$ tiene presencia entre pH 0 y 14 obteniéndose su máxima presencia a un pH 2.5, finalmente la especie $\text{Cu}(\text{By})_3$ es la de mayor presencia, existiendo entre pH 1.5 a 14, en este caso se observa que dicha especie posee su máxima presencia a partir de pH 5.5 extendiéndose esta hasta pH 14.

En el caso del Fe(II), se puede inferir que el hierro en estado elemental tiene una presencia apreciable entre valores de pH entre 0 y 3.0. Por otro lado la especie $\text{Fe}(\text{OH})^+$, no tiene presencia alguna en el intervalo estudiado, tal y como en el caso del Cu..

En lo que se refiere a los complejos del Fe(II) y 2,2'-bipiridina, estos tienen presencia variable en el intervalo de pH considerado. Así la especie $\text{Fe}(\text{By})_1$ tiene presencia entre pH 0.5 y 1.5, obteniendo su máxima presencia a pH 2.0, aunque es casi despreciable. Por otro lado la especie $\text{Fe}(\text{By})_2$ prácticamente no existe en el intervalo de pH estudiado. Finalmente la especie $\text{Fe}(\text{By})_3$ tiene una gran presencia entre valores de pH entre 1.0 y 14, observándose que dicha especie posee su máxima presencia a partir de pH 3.5 extendiéndose esta hasta pH 14.

Del estudio de estos diagramas de distribución se puede decir, que las especies que son más estables son aquellas que existen en un mayor intervalo de valores de pH, tal es el caso de las especies $\text{Fe}(\text{By})_3$ y $\text{Cu}(\text{By})_3$, ambas existen simultáneamente a partir de pH 3.5,.

Por otra parte las dos restantes especies $\text{M}(\text{By})_2$ y MBy , existen solo en rangos reducidos de pH, y en porcentajes muy pequeños, por lo que si se desea trabajar con estas especies de complejos se debe tener el cuidado de trabajar con valores de pH muy específicos, al contrario de las especies $\text{M}(\text{By})_3$

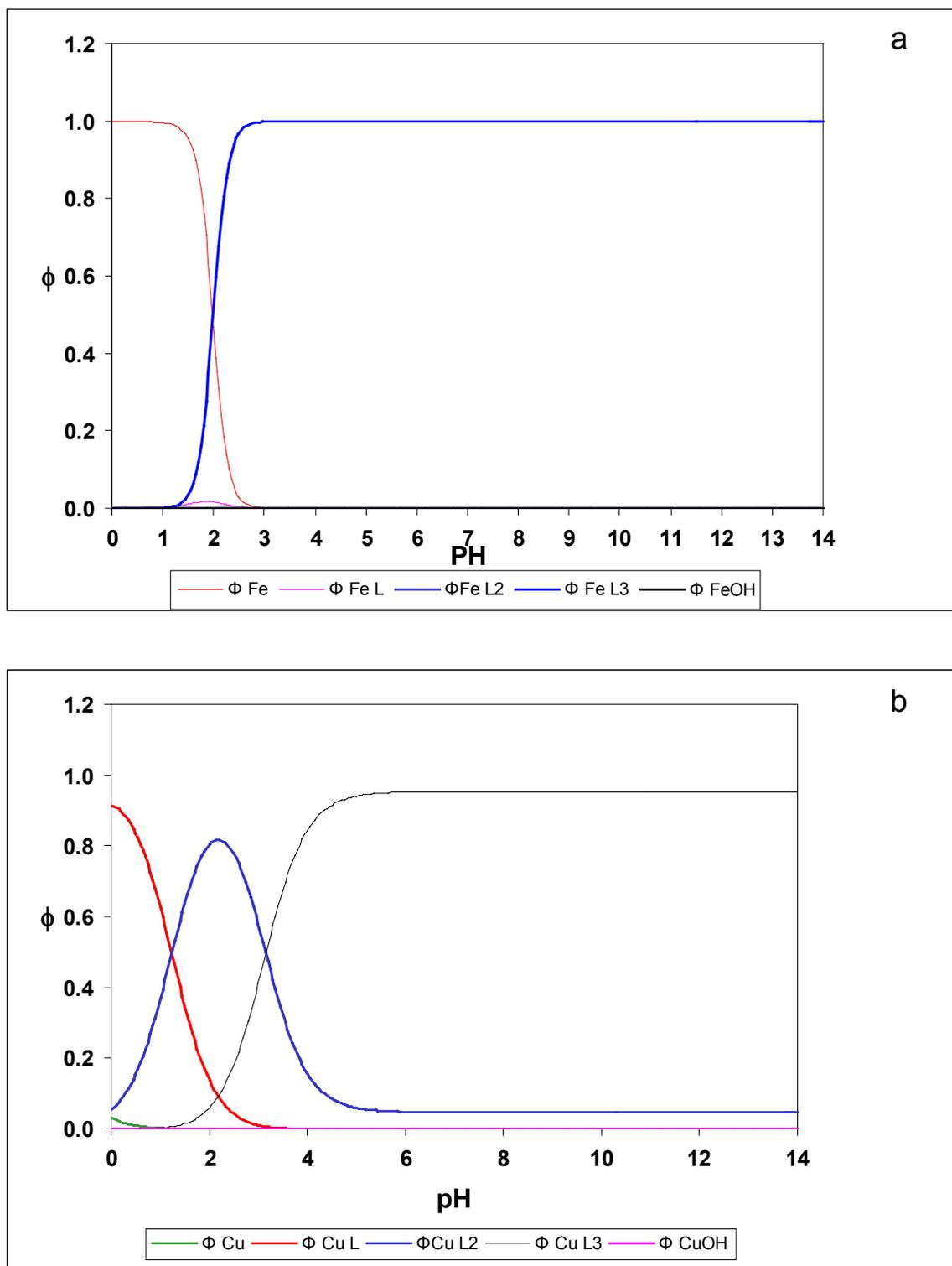


Figura V.1. Diagramas de distribución de las especies: Fe(II) y 2,2'-bipiridina (a) y Cu(II) y 2,2'-bipiridina (b).

V.2. ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LOS COMPLEJOS FORMADOS EN LA REACCIÓN DEL Fe(II) y Cu(II) CON 2,2'-BIPRIDINA.

Para determinar la longitud de onda de máxima absorbancia de los complejos formados por el Fe(II) y el Cu(II) con la 2,2' bipiridina en medio acuoso, se prepararon soluciones de un estándar de cobre y de hierro a concentraciones conocidas.

En el caso del cobre se usó una solución cuya concentración era de 49.6 ppm, la que una vez al ponerse en contacto con las cantidades estipuladas en el método con el complejante 2,2'-bipiridina, formó una solución trasparente de aspecto ligeramente marrón, que al medírsele el valor de pH se confirmó que era de 4.2.

Si analizamos el distribución elaborado previamente, podemos afirmar que el complejo formado a este valor de pH es $\text{Cu}(\text{By})_3$ por lo que en lo sucesivo se considerará para todos los efectos del cobre en este estudio al complejo mencionado.

En lo que se refiere al hierro se utilizó una solución estándar de concentración 71.23 ppm, la que una vez al ponerse en contacto con las cantidades estipuladas en el método con el complejante 2,2'-bipiridina, formó una solución trasparente de aspecto rojizo, que al medírsele el valor de pH se confirmó que era de 3.0, al igual que el caso del complejo formado por el cobre se determinó en base al diagrama de distribución que la especie obtenida en las condiciones del estudio para el hierro era el complejo $\text{Fe}(\text{By})_3$.

Por lo que los complejos formados en este estudio se forman en base a los siguientes equilibrios:



Una vez establecida la identidad de los complejos formados en las condiciones de pH de trabajo, se procedió a la obtención de los espectros de absorción de los complejos formados tanto para el estándar de cobre como para el estándar de hierro.

En el caso del cobre se realizó un barrido en espectro visible, específicamente en el rango de longitudes de onda de 290 nm a 450 nm, determinándose que el máximo de absorbancia para el complejo formado se encuentra a una longitud de onda de 328.5 nm tal y como se observa en la figura V.2 a, con una absorbancia máxima de 2.33.

Por otra parte en el caso específico del hierro se utilizó un rango de longitudes de onda comprendido entre 490 a 585 nm, determinándose que el máximo de absorbancia para el complejo formado en estas condiciones es de 522.5 nm lo que se observa en la figura V.2 b, con una absorbancia máxima de 0.888.

Los resultados de este estudio se muestran en la tabla V.2:

Tabla V.2. Elemento, concentración, pH, complejo, $\lambda_{\text{máx}}$ y absorbancia obtenida para los complejos de cobre y hierro con 2,2'-bipiridina.

Elemento	Concentración	pH	Complejo	$\lambda_{\text{máx}}$	Abs
Cobre	49.6 ppm	4.2	Cu(By)3	328.5	2.33
Hierro	71.23 ppm	3.0	Fe(By)3	522.5	0.888

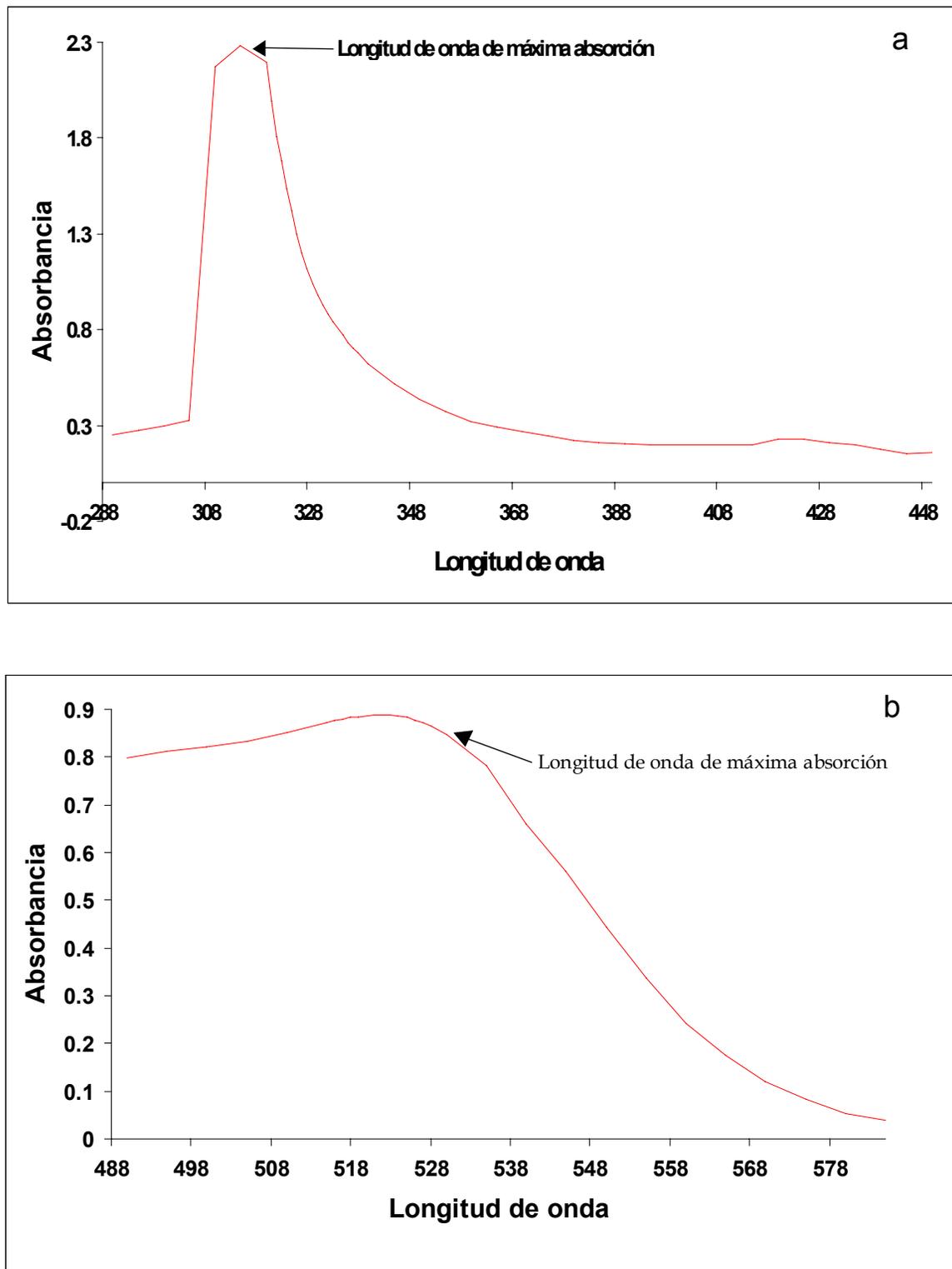


Figura V.2. Espectros de absorción para los complejos de: Cu(II) y 2,2'-bipiridina (a) y Fe(II) y 2,2'-bipiridina (b).

V.3. DETERMINACIÓN DEL ERROR FOTOMÉTRICO

Para determinar el rango de mayor precisión y exactitud en la medida de absorbancia en la que se debe trabajar se evaluó el error relativo de concentración o error fotométrico en función de la absorbancia. Para esto se utilizó una ecuación que toma en cuenta estos aspectos, la ecuación utilizada fue:

$$\% \frac{\Delta C}{C} = \frac{t_{\alpha,0.95} * S_T}{\sqrt{n}} * \frac{1}{2.303 * A * 10^{-A}} * 100 \quad \text{Ec. V.1}$$

Donde: $\Delta C / C$, es el porcentaje de error relativo, $t_{\alpha,0.95}$ es el valor de la tabla T de student, \sqrt{n} , es la raíz cuadrada del número de muestras, 2.303 es una constante, A es la absorbancia, S_T , es el valor de la desviación estándar de la transmitancia y 10^{-A} es la transmitancia.

Se realizaron 30 lecturas de las soluciones de los complejos formados a las longitudes de onda de trabajo para el cobre y hierro. Una vez obtenidas y tabuladas se aplicó la ecuación V.1, de esta forma se obtuvieron los gráficos de los errores fotométricos en los que se puede incurrir cuando se trabaja con soluciones de complejos de Fe(II) y Cu(II) con 2,2'-bipiridina. Los resultados obtenidos para el cobre y hierro se muestran en la figura V.3 (a) y V.3.(b) respectivamente

En el caso del cobre puede observarse que en un intervalo de absorbancia de 0.4 a 0.5 se produce el menor porcentaje de error con un valor menor de 0.1. En el caso del valor de absorbancia de 0.1 el porcentaje de error fotométrico es de 0.19 %, mientras que para una absorbancia de 1.3 el error es de 0.23%.

Cabe destacar que el porcentaje de error para este caso es casi despreciable porque para el intervalo de lecturas realizadas este resultó ser menor de 0.25%.

De aquí que las soluciones se prepararon con el cuidado que proporcionarían lecturas de absorbancia que cayeran en este intervalo.

Por otra parte en el caso del Hierro puede observarse que en un intervalo de absorbancia de 0.39 - 0.48 se produce el menor error cuyo valor es menor de 0.4. Se puede observar que para una absorbancia de 0.1 el error fotométrico es de 0.79% y para una absorbancia de 1.3 el menor error posible es de 0.94%.

Aquí al igual que en el caso del cobre el porcentaje de error es también casi despreciable porque para las lecturas obtenidas resultó ser menor del 1%.

Al igual que el caso del cobre las soluciones se prepararon de tal manera que proporcionarían absorbancias en el intervalo considerado en las gráficas.

De lo anterior se deduce que si se realizan lecturas paralelas de soluciones complejadas de cobre y hierro, el menor error posible correspondería a las soluciones de cobre, y por lo tanto su sensibilidad para el estudio considerado es mayor que para el caso del Hierro.

Los resultados de este estudio se muestran en la tabla V.3.

Tabla V.3. Rango de longitudes de onda y porcentaje de error fotométrico.

Elemento	$\lambda_{\text{máx}}$	Rango de absorbancia	% de error fotométrico
Cobre	328.5	0.4 – 0.5	< 0.1 %
Hierro	522.5	0.39 – 0.48	< 0.4 %

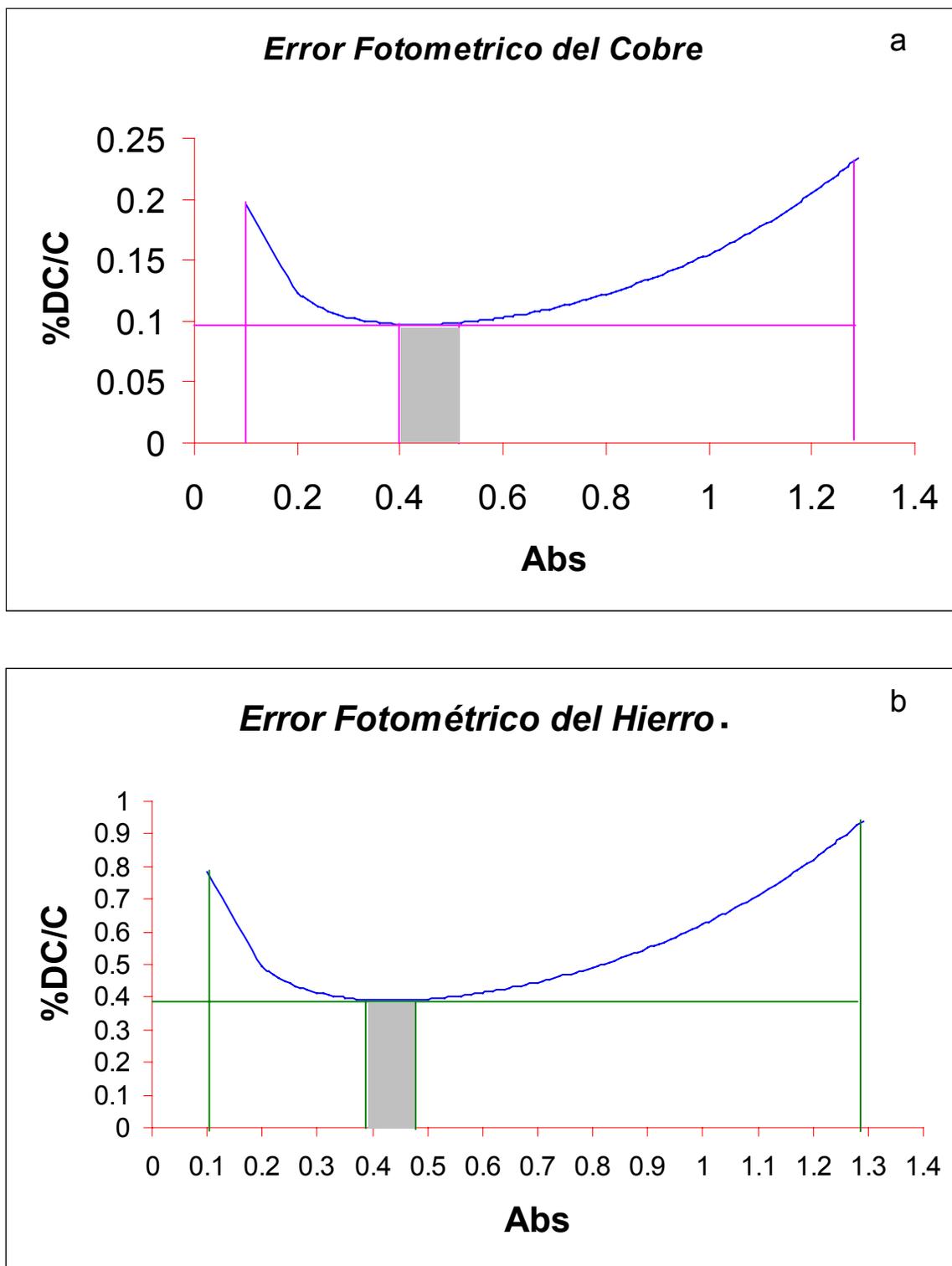


Figura V.3 :Error fotométrico del para los complejos cobre (a) y hierro (b), como una función del porcentaje de error frente a los valores de absorbancia.

V.4 ESTUDIO DE ALGUNOS PARÁMETROS DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE Cu (II) Y Fe(II) EN AGUARDIENTE.

V.4.1. INTRODUCCIÓN.

Para determinar el comportamiento del método sugerido en las condiciones planteadas en el estudio, se consideraron diversas estrategias tendientes a obtener algunos parámetros del desempeño del método, de forma que una vez determinados se clarificara la capacidad de éste para determinar concentraciones de Cu(II) y Fe(II) en los límites establecidos por la Norma Nicaragüense a éste respecto.

Una vez contrastados los pro y los contra de cada una de las estrategias consideradas por el equipo del estudio, se optó por realizar una especie de pre-validación del método de forma que fuera lo suficientemente rigurosa pero a la vez lo más general posible, logrando con esto completar un estudio preliminar extenso, con suficiente validez pero no con la profundidad requerida para un estudio de mayor magnitud, logrando con esto completar el objetivo principal del estudio.

Los parámetros que se estudiaron fueron:

1. Linealidad
2. Repetibilidad
3. Límite de detección
4. Límite de cuantificación
5. Efecto de matriz
6. Porcentaje de recuperación

V.4.2. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

La linealidad de modelo de calibración esta determinada por el coeficiente de determinación (r^2), que describe la fracción de la suma de cuadrados, debido a los factores del modelo en relación a la suma de cuadrados de las media corregidas.

Para probar la linealidad del modelo de calibración ensayado se efectuaron curvas de calibración de 5 puntos, en un intervalo de tiempo de 5 días consecutivos (**Ver tabla V.4**) utilizando para esto soluciones estándares con concentraciones de Cu y Fe entre 5 y 15 mg/L y 2.5 y 12.5 mg/L respectivamente, obteniendo las lecturas de absorbancia correspondiente a cada concentración ensayada.

Una vez tabulados los valores obtenidos representamos los valores de absorbancia frente a las concentraciones en mg/L de Cu y Fe, obteniendo gráficos lineales tal y como se muestra en la figura V.4.

Una vez representados los valores de absorbancia y de concentración, se procedió a realizar un análisis de regresión lineal simple, el que indica valores de coeficiente de determinación (r^2) de 0.9966 para el Cu y de 0.9985 para el Fe, lo que nos indica que existe una buena linealidad del modelo ensayado.

Los valores de intercepto, pendiente y coeficiente de determinación se muestran en la siguiente tabla.

Tabla V.4. Parámetros obtenidos para el ajuste de los modelos de regresión.

Elemento	Intercepto	Pendiente	r^2
Cobre	0.0606	0.0481	0.9966
Hierro	0.0646	0.1461	0.9985

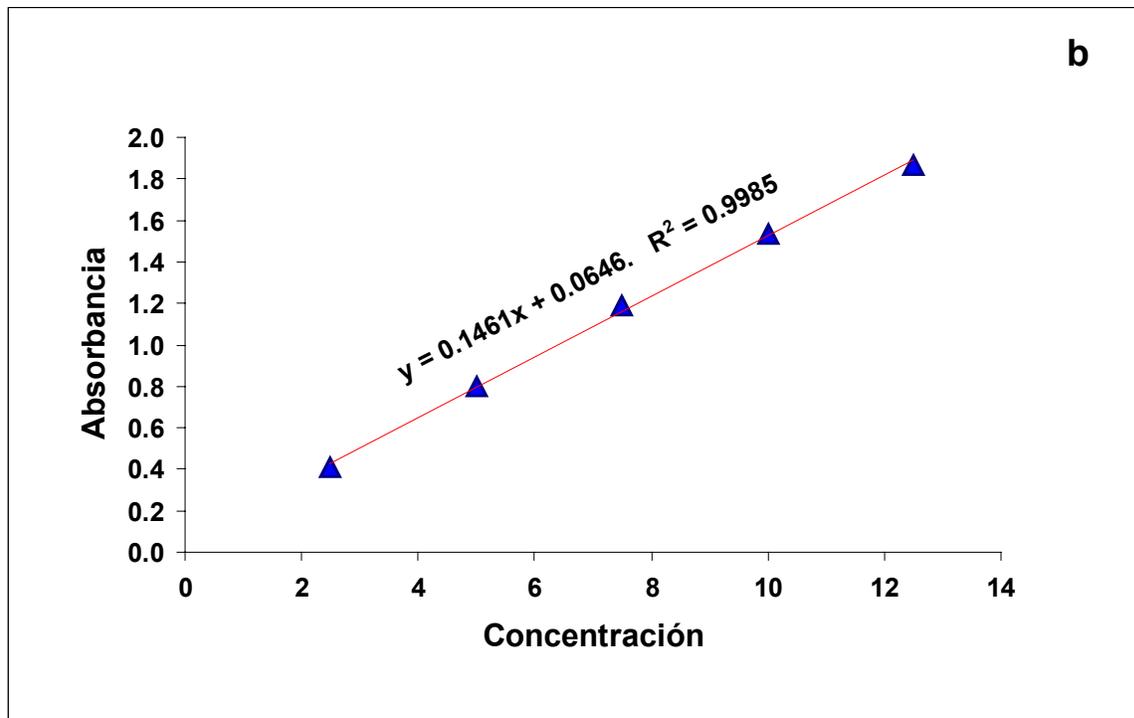
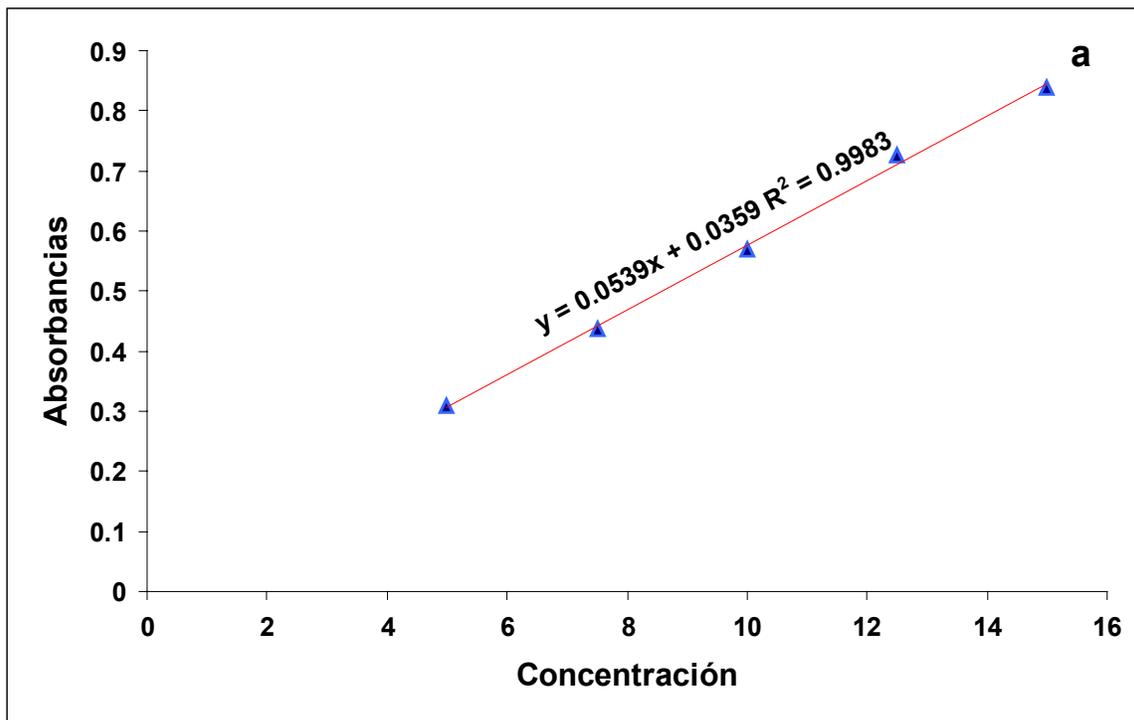


Figura V.4. Curvas de calibración normal de los complejos de Cu (II) (a) y de Fe(II) (b).

V.4.3. REPETIBILIDAD EN LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

Para determinar la repetibilidad de la curva de calibración normal se procedió a la elaboración de una carta de control de esta curva, tomando para esto los resultados de una curva de calibración de 5 puntos tomada como referencia, a partir de los resultados obtenidos en los 5 días indicados en el acápite anterior.

La carta de control es un tipo de gráfico en el que se representan los límites de tolerancia de los parámetros de la regresión realizada, de forma que al realizar una curva de calibración en un momento determinado y una vez obtenidos y representados en este gráfico los valores del intercepto y la pendiente se determine si esta curva cumple con lo requisitos de tolerancia exigidos en el gráfico de control.

Al correlacionar los parámetros b_0 y b_1 de una curva de calibración de referencia, utilizando las ecuaciones V.2 y V.3, que consideran además de estos parámetros el intervalo de confianza, se obtiene un gráfico con la forma de una elipse, tal y como se muestra en la figura V.5.

$$\Delta b_0 = t_{0,95,GL} * S_{b_0} \quad \text{Ec. V.2}$$

$$\Delta b_1 = t_{0,95,GL} * S_{b_1} \quad \text{Ec. V.3}$$

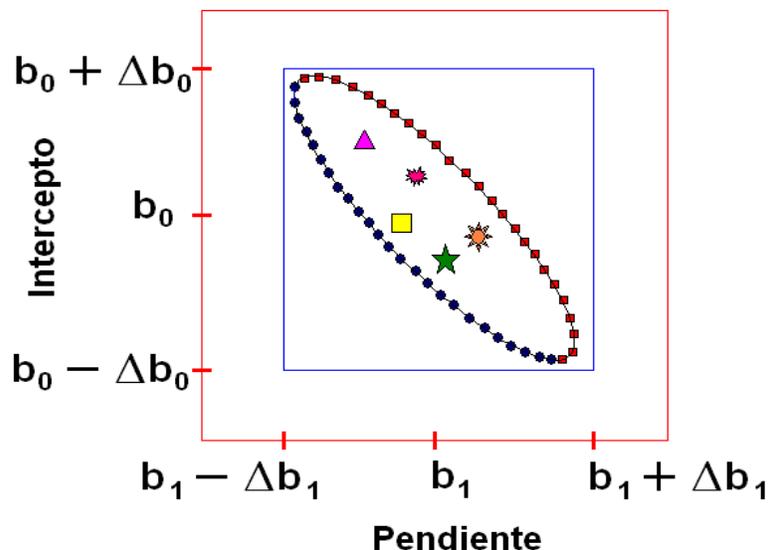


Figura V.5. Gráfico de control de curvas de calibración.

Se puede afirmar que los parámetros de regresión están correlacionados con el modelo de regresión si al introducir los valores del intercepto y la pendiente de las curvas de calibración estos caen en los límites establecidos por la elipse, en este caso se puede afirmar que el modelo de calibración mantiene sus parámetros y es repetible en el intervalo de tiempo considerado, en caso contrario, se recomienda realizar de nuevo la curva de calibración.

Para este estudio se consideraron los parámetros de regresión de las diferentes curvas de calibración obtenidas tanto para los estándares de cobre como para los del hierro en 5 días consecutivos. Estos parámetros se muestran en las tablas V.5 y V.6.

Tabla V.5: Parámetros de regresión de las curvas de calibración obtenidos para el complejo de Cu (II) por 5 días consecutivos.

Días					
Parámetros	1	2	3	4	5
b_1	0.0617	0.0535	0.0674	0.0535	0.0674
b_0	-0.0045	-0.0479	-0.0701	-0.0479	-0.0701
Sb_0	0.0277	0.0303	0.0329	0.0303	0.0329
Sb_1	0.0277	0.0029	0.0031	0.0029	0.0031

Tabla V.6: Parámetros de regresión de las curvas de calibración obtenidos para el complejo de Fe (II) por 5 días consecutivos.

Días					
Parámetros	1	2	3	4	5
b_1	0.5857	0.0641	0.0834	0.0656	0.0515
b_0	0.1449	0.1479	0.1445	0.1441	0.1491
Sb_0	0.0198	0.0218	0.0344	0.0297	0.0317
Sb_1	0.0024	0.0026	0.0041	0.0036	0.0038

Con los datos de las tablas V.5 y V.6 y utilizando las ecuaciones V.2 y V.3, se construyeron las cartas de control de las curvas de calibración tanto para el cobre como para el hierro, tal y como se muestra en las figuras V.6 a y V.6.b, respectivamente.

En estas figuras se puede observar que los puntos correspondientes a los valores de los parámetros de regresión de cada curva de calibración realizadas durante los 5 días del estudio, caen en el interior de la elipse lo que nos confirma que existe una buena repetibilidad de las curvas de calibración para los estándares de cobre y hierro en los días considerados.

Por lo tanto se puede trabajar con relativa tranquilidad con los parámetros de regresión de las curvas de calibración tanto para el cobre como para el hierro, durante un periodo de 5 días.

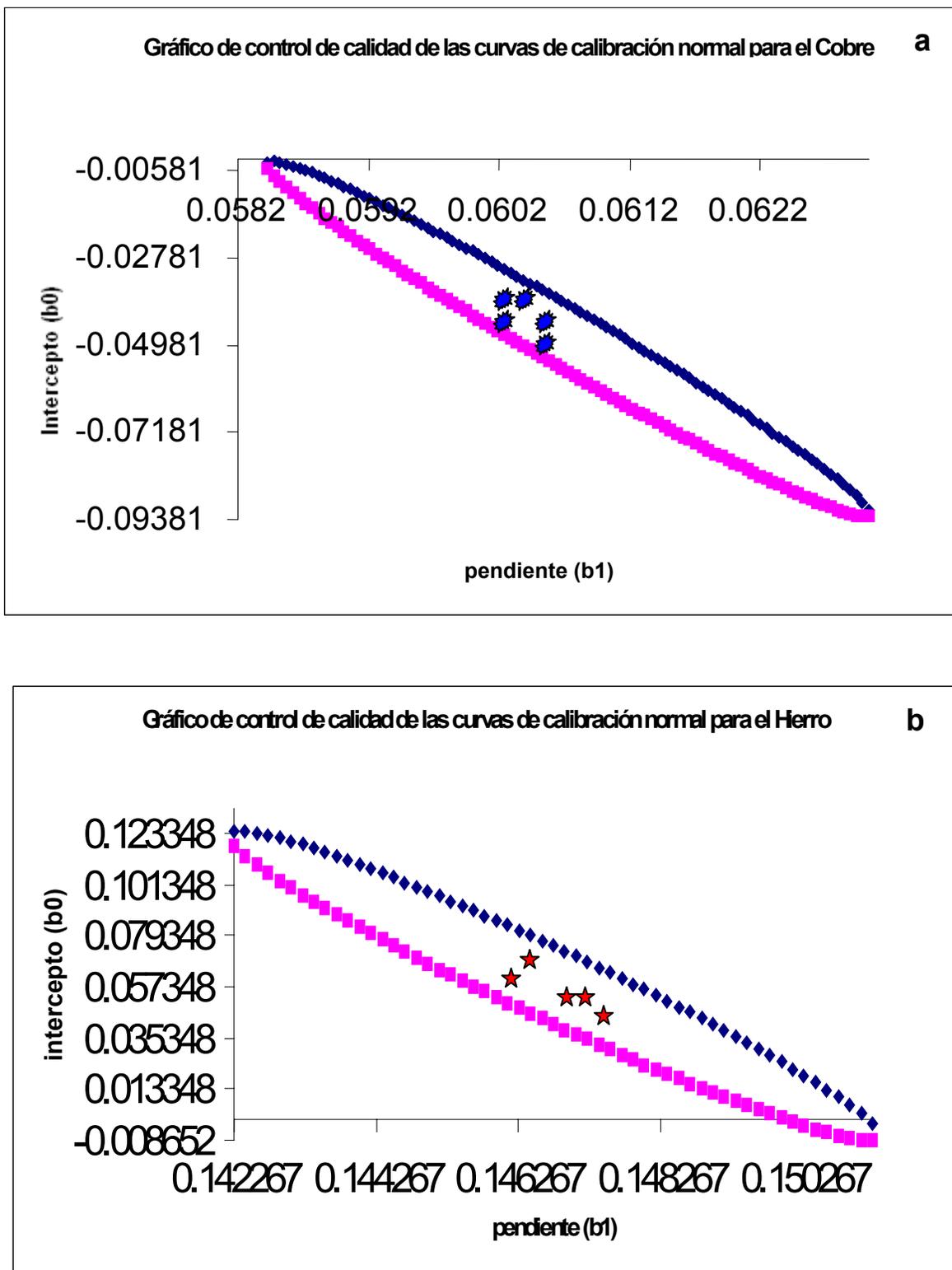


Figura V.6. Gráficos de control de las curvas de calibración normal del Cu (II) (a) y de Fe(II) (b)

V.4.4. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL COBRE Y HIERRO.

Otros parámetros del desempeño de un método son los límites de detección y cuantificación los cuales se pueden determinar a partir de una curva de calibración normal para lo cual se preparan soluciones diluidas, cercanas al blanco, obteniéndose los valores de los parámetros del ajuste de la curva de calibración derivándose de estos los valores de dichos límites.

Se considera al límite de detección (LD), como la mas pequeña señal provocada por la presencia de un analito observada a un nivel de confianza del 95%, por otra parte se considera que el límite de cuantificación (LC) es la cantidad mínima posible que puede ser cuantificada a un nivel de confianza del 95%, por otra parte la señal de detección (SD) es considerada como la señal generada por el equipo, relacionada con una determinada concentración del analito. Algunos de estos términos pueden ser observados en la figura V.7.

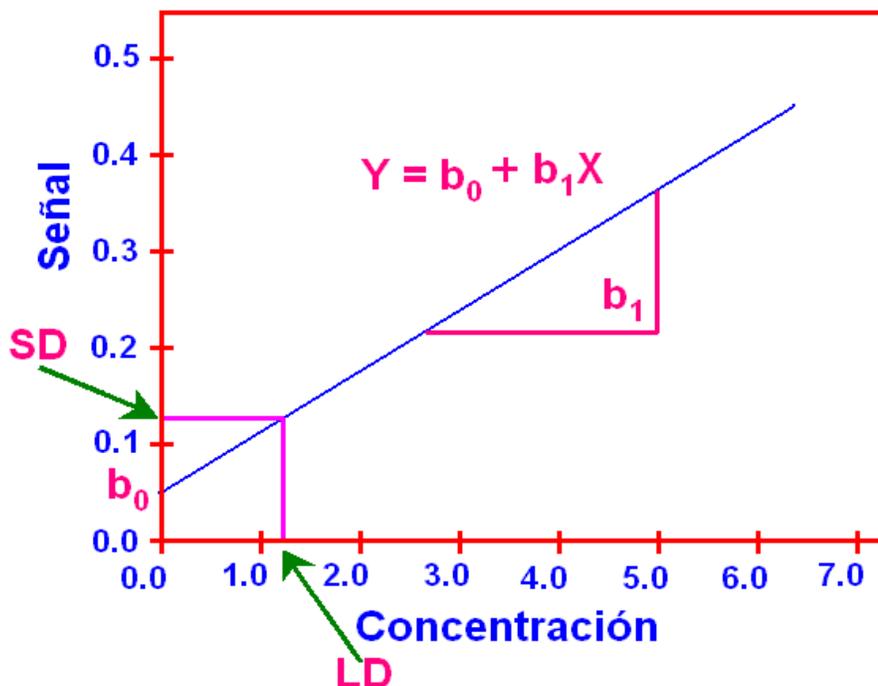


Figura V.7. Representación gráfica de SD y LD en una curva de calibración normal.

Los valores de SD, LD y LC pueden ser calculados a partir de las siguientes ecuaciones:

$$SD = 3.29 * S_{b_0} \quad \text{Ec. V.4}$$

Si consideramos que b_0 , es 0 entonces el LD puede ser calculado como:

$$LD = \frac{3.29 * S_{b_0}}{b_1} \quad \text{Ec. V.5}$$

Por otra parte el LC se calcula de la siguiente forma:

$$LC = \frac{10 * S_{b_0} - b_0}{b_1} \quad \text{Ec. V.6}$$

Para calcular los límites de detección y cuantificación tanto para el Cobre (II) como para el hierro (II) se elaboraron sendas curvas de calibración normal, con intervalos diferentes de concentración de los elementos considerados, dado la diferencia de comportamiento de ambos. Los valores de absorbancia y las concentraciones estudiadas se muestran en la tablas V.7 y V.8, para el cobre y hierro respectivamente.

Tabla V.7. Datos de la curva de calibración normal usada para el cálculo de los límites de detección y cuantificación para el Cobre (II).

ppm de Cu	Absorbancia
0.25	0.019
0.50	0.038
0.75	0.058
1.00	0.088
1.25	0.110
1.50	0.125
1.75	0.145
2.00	0.165

Tabla V.8. Datos de la curva de calibración normal usada para el cálculo de los límites de detección y cuantificación para el Hierro (II).

ppm de Fe	Absorbancia
0.25	0.060
0.50	0.102
0.75	0.145
1.00	0.187
1.25	0.222

Una vez obtenidos los valores de absorbancia a las concentraciones de cobre y hierro, se procedió a realizar un análisis de regresión lineal obteniéndose los valores de pendiente e intercepto obtenidos para los dos casos se muestran en la tabla V.9.

Tabla V.9. Parámetros de regresión de los ajustes de curvas de calibración normal obtenidos para el Cobre (II) y Hierro (II).

Elemento	b1	b0	Sb0
Cobre	0.084683	-0.001809	0.003059
Hierro	0.163600	0.020633	0.002701

Sustituyendo los valores de Sb_0 , b_0 y b_1 en las ecuaciones V.4, V.5 y V.6 se obtuvieron los valores de límites de detección y de cuantificación para el cobre y hierro. Los valores de estos límites se muestran en la tabla V.10 .

Tabla V.10. Límites de detección y cuantificación obtenidos para el Cobre (II) y Hierro (II).

	Cu	Fe
LD	0.1402 mg /L	0.0543 mg/L
LC	0.3826 mg/L	0.0394 mg/L

En esta tabla se puede observar que el hierro posee menores límites de detección y cuantificación respecto a los obtenidos por el cobre, lo que indica que se podrá que para los efectos del método ensayado trabajar a menores rangos de concentraciones de hierro que de cobre.

V.4.6. EFECTO MATRIZ EN LA DETERMINACIÓN DE COBRE (II) Y HIERRO (II) EN AGUARDIENTE.

La interferencia de los componentes de la matriz en la determinaciones analíticas constituyen una de las principales causas que afectan la exactitud de los métodos de Análisis. En la mayoría de los compuestos que se analizan comúnmente en un laboratorio se conocen todos los componentes de la matriz, por lo que en estos casos los patrones se preparan con todos estos componentes que están presentes en la matriz con el fin de minimizar los errores sistemáticos.

Cuando no es posible preparar los patrones de los componentes de la matriz el método de adición patrón es una buena técnica para minimizar los posibles efectos de la matriz en los análisis realizados, que se expresan fundamentalmente como exaltación o inhibición de la sensibilidad de la señal.

Este método básicamente consiste en tomar varios volúmenes fijos de una muestra y añadirle a cada uno de ellos concentraciones crecientes de un patrón de concentración conocida, de forma que se obtenga una curva de calibración (ver figura V. 8.), que tome en consideración el posible efecto de la matriz sobre la sensibilidad de la señal.

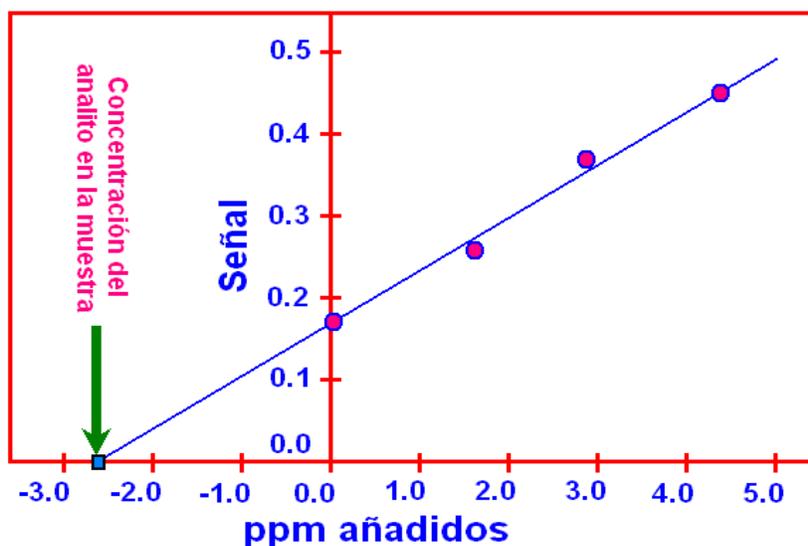


Figura V.8. Curva de adición patrón.

De la relación que existe entre el intercepto y la pendiente de la curva se puede calcular la concentración del analito presente en la muestra, mediante la siguiente ecuación:

$$C_x = -\left[\frac{b_0}{b_1}\right] \quad \text{Ec. V.7}$$

Por otra parte graficamos en un mismo grafico la curva de adición patrón (CAP) y la curva de calibración normal (CCN), podemos determinar en base a la relación de sus pendientes si la matriz en la que se encuentra en analito interfiere en las sensibilidad de la señal y por lo tanto en la determinación del analito de interés.

Cuando se grafican las curvas de adición patrón y la de calibración normal, se pueden observar tres casos, ausencia de efecto matriz, presencia de efecto intensificador y presencia de efecto inhibitor o depresor, estos tres efectos se muestran en la figura V.9.

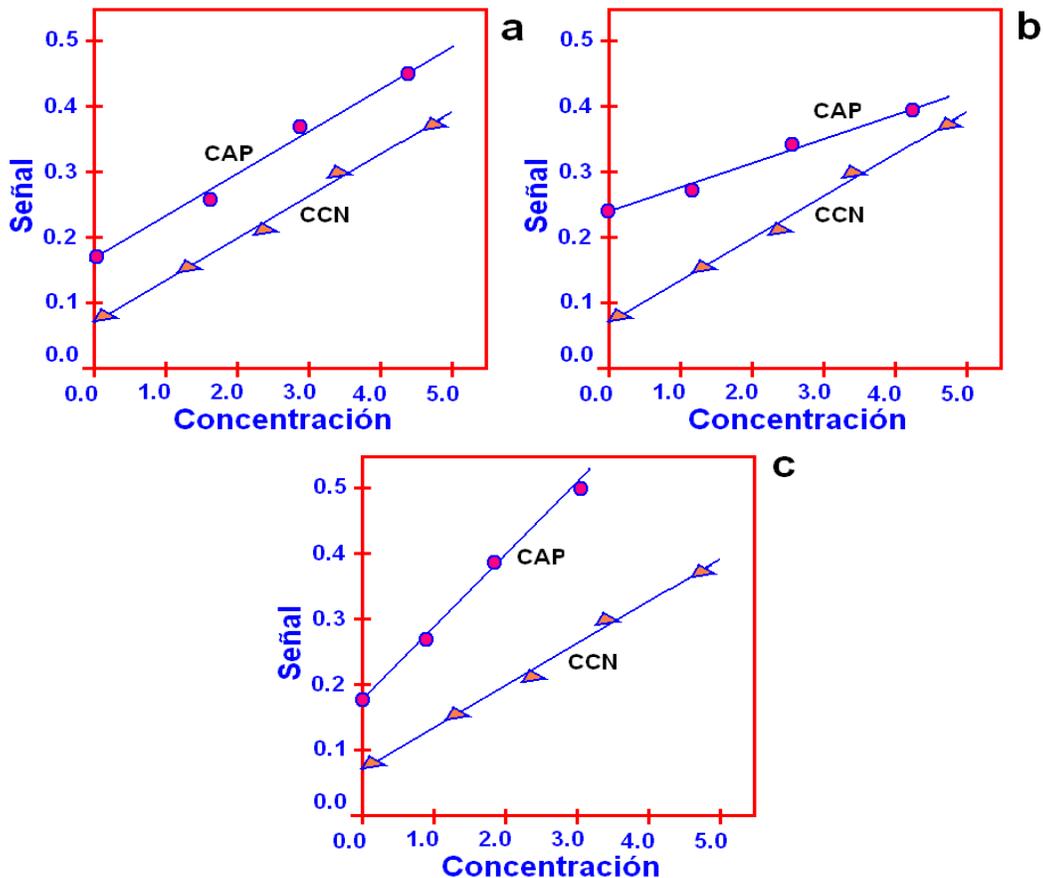


Figura V.9. Tipos de efecto matriz, sin efecto (a), depresor o inhibitor (b) e intensificador (c).

Para el estudio del efecto matriz se elaboraron 2 curvas de calibración una de calibración normal y la otra de adición patrón a intervalos de concentración definidos tanto para el Cobre como para el Hierro. Los valores de concentración utilizados se muestran en las tablas V.11 y V.12.

Tabla V.11. Concentraciones y absorbancias obtenidas para curvas de calibración normal y de adición elaboradas con Cobre (II).

Curva de calibración normal		Curva de adición patrón	
Concentración	Absorbancia	Concentración	Absorbancia
5 ppm	0.309	0 ppm	0.019
7.5 ppm	0.436	5 ppm	0.289
10 ppm	0.569	7.5 ppm	0.404
12.5 ppm	0.725	10 ppm	0.540
15 ppm	0.839	12.5 ppm	0.652
		15 ppm	0.761

Tabla V.12. Concentraciones y absorbancias obtenidas para curvas de calibración normal y de adición elaboradas con Hierro (II).

Curva de calibración normal		Curva de adición patrón	
Concentración	Absorbancia	Concentración	Absorbancia
2.5 ppm	0.409	0 ppm	0.009
5.0 ppm	0.801	2.5 ppm	.0.415
7.5 ppm	1.189	5.0 ppm	0.801
10.0 ppm	1.536	7.5 ppm	1.187
12.5 ppm	1.867	10.0 ppm	1.542
		12.5 ppm	1.827

Una vez obtenidas los valores de absorbancias se procedió a la obtención de los parámetros de la regresión de las curvas, dichos valores se muestran en la tabla V.13.

Tabla V.13. Parámetros de las curvas de adición patrón y calibración normal.

Elemento	Curva de calibración normal			Curva de adición patrón		
	b0	b1	r ²	b0	b1	r ²
Cobre	0.0359	0.0539	0.9975	0.03109	0.0496	0.9983
Hierro	0.0646	0.1461	0.9985	0.0449	0.1469	0.9967

Una vez obtenidos estos valores se procedió a la elaboración de los gráficos en los que se representaba las graficas de calibración normal y de adición patrón tanto para el cobre como para el hierro, estos gráficos se muestran en la figura V.10.

En la figura se pueden observar dos tipos de comportamiento, en el caso específico del Cobre (figura V.10 a) se puede observar que las curvas se entrecruzan entre (ver datos de b0 y b1 en la tabla V.11) por lo que existe un efecto depresor o inhibidor muy marcado, esto indica que no es posible utilizar una curva de calibración normal dado que podemos expresar una concentración mucho mas baja de lo que es realidad, lo que nos produciría un error sistemático por defecto, ante esto, es recomendable que para este elemento utilicemos una curva de adición patrón en lugar de una de calibración normal.

Por otra parte en el caso del Hierro (figura V.10 b) se observa que las dos curvas se superponen entre si siendo prácticamente las mismas (ver datos de b0 y b1 en tabla V.12), lo que nos induce a pensar no existe efecto de matriz, esto es que los componentes de la matriz del aguardiente no interfieren en el análisis de este elemento por medio de una curva de calibración normal. Sin embargo dado que el Cobre presenta un efecto matriz y para continuar el estudio en las mismas condiciones dado que podemos usar una u otra curva, optamos por continuar el análisis de este elemento usando una curva de adición patrón.

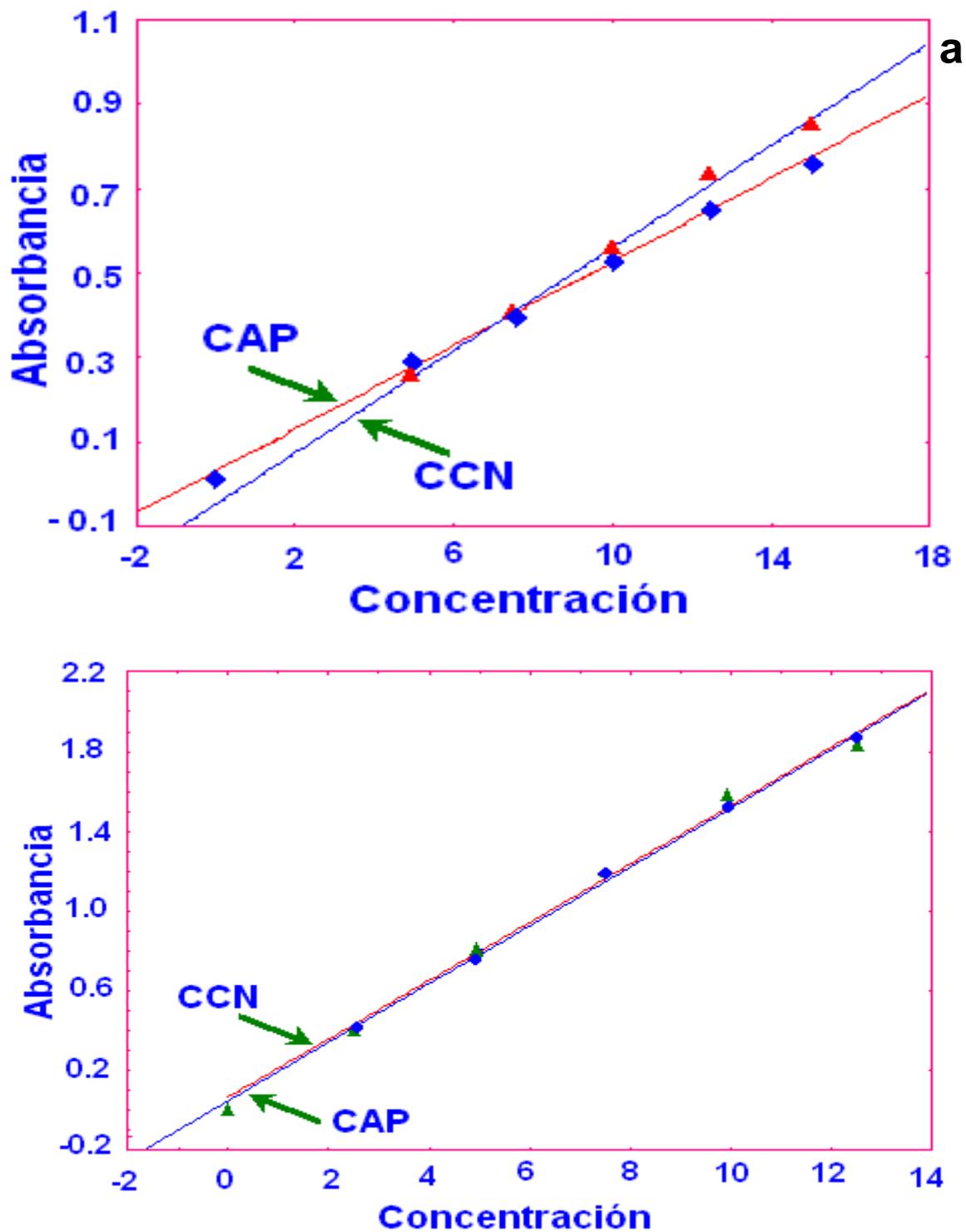


Figura V.10. Curvas de calibración normal (CCN) y de adición patrón (CAP), obtenidas para el Cobre (a) y para el Hierro (b).

V.4.7. PORCENTAJE DE RECOBRO.

Los métodos analíticos no siempre cuantifican todo el analito de interés presente en la muestra, de manera que debe evaluarse el porcentaje de recobro con el que opera el método como una vía de evaluar su exactitud.

La exactitud de un método analítico es definida como la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y un valor de referencia, esta se suele expresar como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les han adicionado cantidades conocidas del analito de interés.

Existen diferentes formas de evaluar este porcentaje de recobro, una de las formas consiste en evaluar la eficiencia de la medición cuando una cantidad conocida de un analito es adicionando a diferente niveles, con lo que se enriquece la muestra, obteniendo una curva de calibración de adición patrón y comparando el valor de la pendiente de esta curva con el valor de la pendiente obtenida para una curva de calibración normal elaborada con estándares del analito de interés (ver figura V.11).

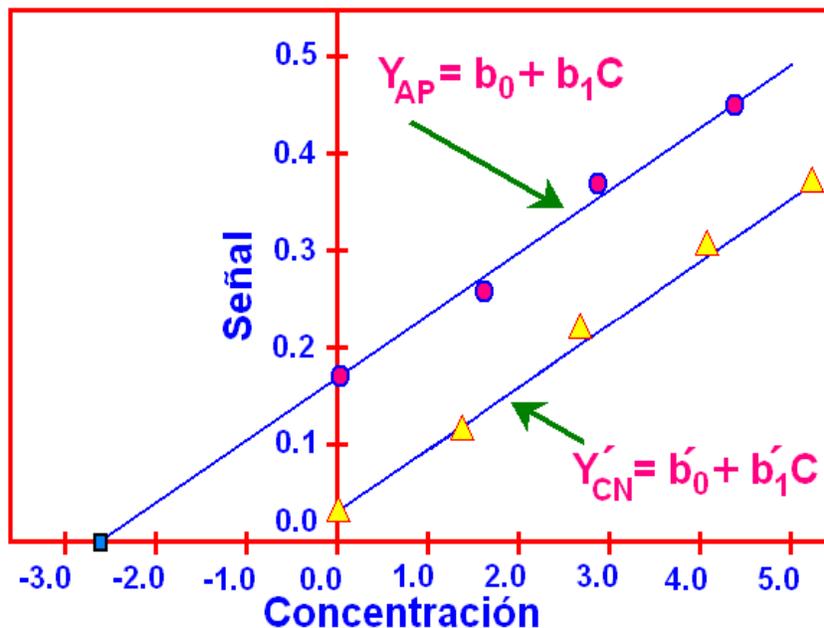


Figura V.11. Curvas de calibración normal (CCN) y de adición patrón (CAP), y sus modelos de regresión.

Por consiguiente para evaluar el %R en la determinación se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$\%R = \left[\frac{b_{1(AP)}}{b'_{1(CN)}} \right] * 100 \quad \text{Ec. V.8}$$

Donde $b_{1(AP)}$ es la pendiente de la curva de adición patrón y $b'_{1(CN)}$ es la pendiente de la curva de calibración normal elaborada con estándares de concentración conocida

Para confirmar la exactitud del método espectrofotométrico ensayado para determinar la concentración de Cobre(II) y Hierro (II), se calculó el porcentaje de recuperación comparando las pendientes obtenidas a partir de sendas curvas de adición patrón (CAP) y de calibración normal (CCN), calculando el porcentaje de recobro mediante la ecuación V.8.

Los datos que se utilizaron en este estudio se muestran en las tablas V.11 y V.12 para el cobre y hierro, respectivamente. Los valores de porcentaje de recobro obtenido se muestran en la tabla V.14.

Tabla V.14. Porcentaje de recobro para el Cu(II) y Fe(II).

Elemento	CAP	CCN	%R
	b1	b'1	
Cobre	0.0495	0.0539	94.6 ± 4.4
Hierro	0.1469	0.1461	100.6 ± 3.7

La evaluación de la incertidumbre ($U_{\%R}$) del %R se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$U_{\%R} = \%R * \sqrt{\left[\frac{U_{b_{1(AP)}}}{b_{1(AP)}} \right]^2 + \left[\frac{U_{b'_{1(CN)}}}{b'_{1(CN)}} \right]^2} \quad \text{Ec. V.9}$$

Donde $U_{b1(AP)}$ es la incertidumbre de la pendiente de la curva de adición patrón, $b_{1(AP)}$ es la pendiente de la curva de adición patrón.

Y $U_{b'1(CN)}$ es la incertidumbre de la pendiente de la curva de calibración normal, $b'_{1(CN)}$ es la pendiente de la curva de calibración normal.

Estos valores indican que tanto para el cobre como para el hierro los porcentajes de recuperación se encuentran entre los valores esperados, demostrando que el método espectrofotométrico ensayado presenta una muy buena exactitud.

Por otra parte el porcentaje menor de recuperación del cobre comparado con el del hierro, nos demuestra que efectivamente existe un efecto de la matriz del aguardiente que inhibe de alguna manera la posibilidad de recuperar en un 100% al analito de interés.

Sin embargo en lo que se refiere al porcentaje de recuperación del hierro que es prácticamente de 100% nos confirma tal y como se había indicado en acápite anterior la ausencia de efecto matriz cercano, mostrando una exactitud casi perfecta.

V.5. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS MUESTRAS A ANALIZAR.

Una vez determinados los parámetros de interés en el ensayo del método espectrofotométrico para la determinación de Cobre (II) y Hierro (II) en muestras de aguardientes de cantinas de la ciudad de León, se procedió a obtener información de la cantidad total de cantinas, bares, estancos, expendios, ventas, pulperías y distribuidores de aguardiente que existen en la ciudad de León, para esto se utilizó la información proporcionada por las instituciones SILAIS-León, Policía Nacional y Alcaldía de León.

Una vez obtenido el censo de estas instituciones se procedió a compararlos seleccionando para los fines de este estudio la información proporcionada por el SILAIS-León, dado que divide a la ciudad de León en tres territorios (ver figura V.12):

1. Territorio Perla Maria Norori
2. Territorio Subtiava
3. Territorio Mántica Berríos

Resultando mejor realizar el muestreo de aguardiente con este tipo de organización que la proporcionada por las instituciones: Policía Nacional y Alcaldía de León, en las que no existe una distribución organizada, resultando mucho mas difícil organizar el muestreo.

Dado que se decidió trabajar con la información proporcionada por el SILAIS – León, se procedió a codificar los territorios proporcionándoles la siguiente codificación.

1. Territorio Perla Maria Norori (PMN Número)
2. Territorio Subtiava (CS Número)
3. Territorio Mántica Berríos (CM Número)

Siendo el número el orden de la lista que nos fue proporcionado por el SILAIS-León, de un total de 231 establecimientos donde se expende aguardiente.

La cantidad total de cantinas por cada territorio se muestra en la tabla V.15.

Tabla V.15. Distribución de cantinas por territorio del SILAIS-León.

Territorio	Cantinas
Mántica Berríos	92
Perla María Norori	71
Subtiva	68
Total	231

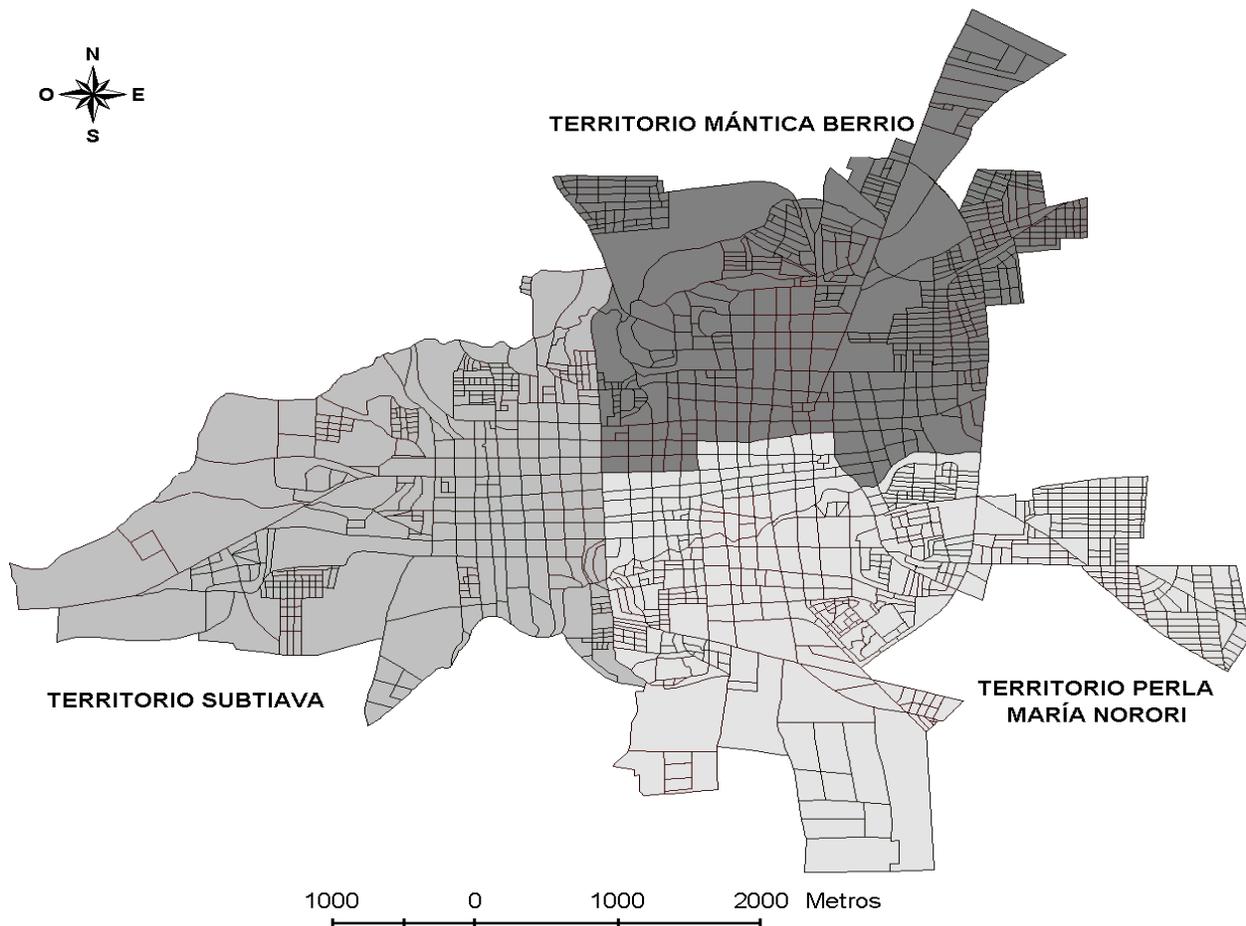


Figura V.12. Mapa de los territorios en los que divide el SILAIS-León a la ciudad de León.

Dada las características de la organización territorial a la que nos enfrentábamos se procedió a seleccionar una estrategia de muestreo aleatorio simple utilizando para esto la ecuación III.20, encontrando que el valor de la población a analizar en todos los territorios es de 24 para un $\beta = 0.20$:

$$n = \left(\frac{1.96 * 0.5}{0.2} \right)^2 = 24$$

Una vez determinado el universo a muestrear, se procedió a la determinación de la cantidad de establecimientos a ser muestreados por cada territorio, para esto se utilizó la siguiente ecuación:[4]

$$n_h = \left(\frac{N_h}{N} \right) * n \quad \text{Ec. V.10}$$

Donde n_h es la cantidad de establecimientos para cada uno de los sectores (Perla Maria Norori, Mántica Berríos y Subtiava), N_h es el numero cantinas por sector, N numero total de cantinas y n es el numero de muestras totales.

La cantidad de cantinas a ser muestreadas por cada sector se muestra en la tabal V.16.

Tabla V.16. Cantidad de cantinas a ser muestreadas por territorio del SILAIS-León.

Territorio	Cantinas	Tamaño de la muestra
Mántica Berríos	92	10
Perla María Norori	71	7
Subtiva	68	7
Total	231	24

En la figura V.13, se muestra la distribución porcentual de cantinas por territorio (V.13 a) y la distribución porcentual de muestras por cada territorio (V.13 b).

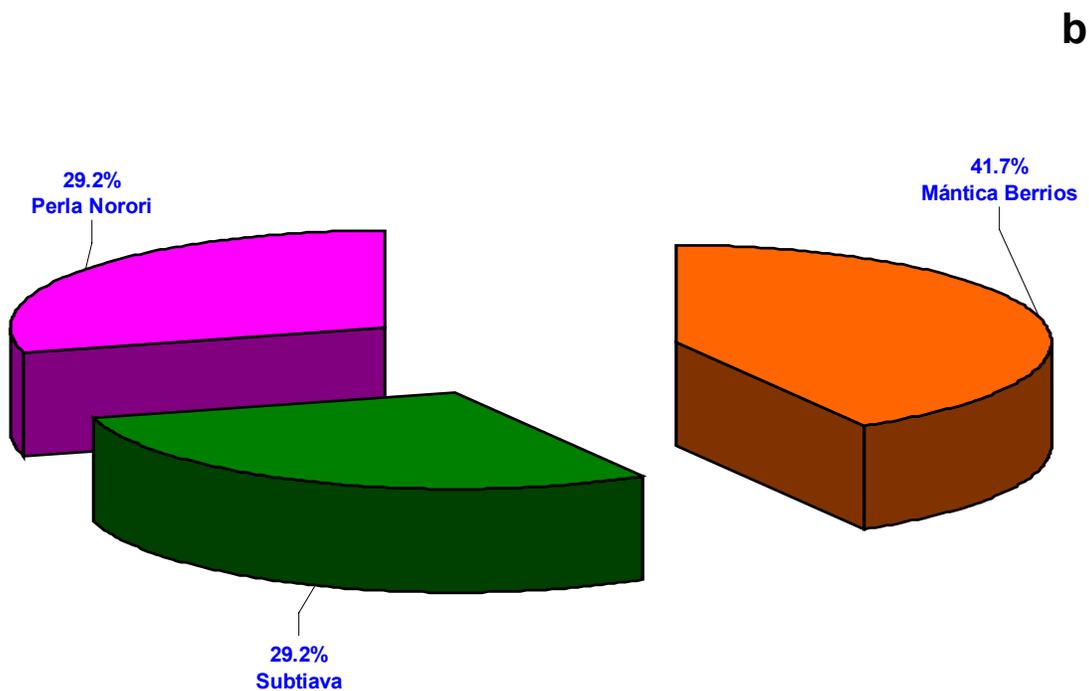
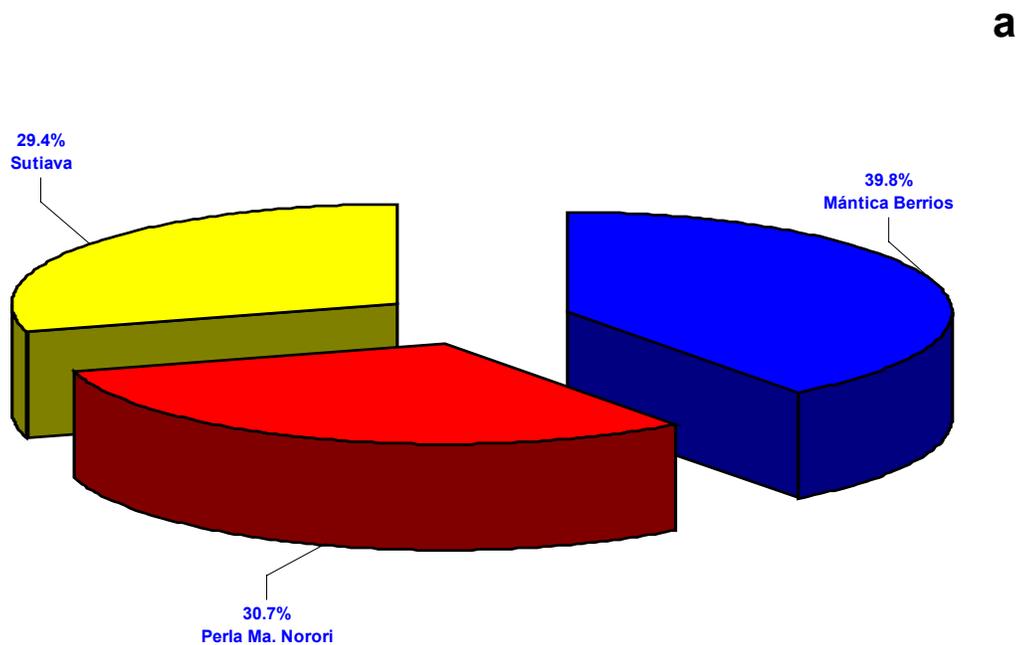


Figura V.13. Distribución porcentual de cantinas por territorio (a) y por cantidad de muestras por cada territorio (b).

En esta figura se puede observar que el territorio con mayor cantidad de cantinas es el Mántica Berríos, seguido de el Perla María Norori y finalmente el territorio de Subtiava. Cabe destacar que posiblemente esta no sea la cantidad real de este tipo de establecimientos en cada territorio y es posible que muchos estén funcionando como es así realmente de forma clandestina y sin ningún permiso sanitario o control alguno.

También se observa que por la cantidad de estos establecimientos la distribución de muestras a tomar se concentró principalmente en el territorio Mántica Berríos, distribuyéndose el resto en proporciones iguales en los restantes territorios.

V.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COBRE (II) Y HIERRO (II) EN MUESTRAS DE AGUARDIENTE.

Una vez clarificado la cantidad de cantinas a ser muestreadas en cada territorio, se procedió a la determinación de la cantidad de Cu(II) y Fe(II) en aguardiente. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas V.17 y V.18.

Tabla V.17. Contenido de Cobre (II) en las muestras de aguardiente analizado.

Código	Conc. / ppm	Incertidumbre / ±	Intercepto	Pendiente	r²
Licorera	0.440	0.0180	-0.0016	0.047	0.9900
M007	5.94	0.0055	0.0280	0.059	0.9990
M008	7.34	0.0270	0.0280	0.048	0.9900
M014	4.29	0.0120	0.0140	0.040	0.9982
M028	1.88	0.0210	0.0089	0.059	0.9970
M030	8.49	0.0098	0.0340	0.050	0.9991
M042	7.69	0.0085	0.0340	0.056	0.9990
M044	3.48	0.0033	0.0160	0.058	0.9999
M046	1.89	0.0320	0.0085	0.056	0.9930
M048	0.24	0.0370	-0.0011	0.057	0.9900
M053	1.79	0.0350	-0.0081	0.056	0.9916
P095	5.07	0.0079	0.0240	0.060	0.9996
P097	4.92	0.0049	0.0180	0.045	0.9997
P105	5.53	0.0073	0.0260	0.059	0.9996
P123	6.39	0.0130	0.0260	0.051	0.9985
P131	1.52	0.0260	-0.0048	0.039	0.9903
P142	6.78	0.0220	0.0230	0.042	0.9941
P149	5.50	0.0100	0.0250	0.057	0.9993
S165	5.48	0.0043	0.0260	0.058	0.9998
S168	3.24	0.0042	0.0150	0.057	0.9999
S176	5.89	0.0089	0.0280	0.059	0.9995
S178	2.58	0.0110	0.0120	0.060	0.9993
S185	2.45	0.0190	0.0120	0.060	0.9980
S187	3.22	0.0044	0.0150	0.057	0.9999
S217	2.20	0.0190	0.0094	0.053	0.9973

Tabla V.18. Contenido de Hierro (II) en las muestras de aguardiente analizado.

Código	Conc. / ppm	Incertidumbre / ±	Intercepto	Pendiente	r²
Licorera	0.72	0.0150	0.0091	0.16	0.9996
M007	3.20	0.0370	0.0410	0.16	0.9978
M008	1.081	0.0170	0.0140	0.16	0.9995
M014	0.97	0.0110	0.0130	0.16	0.9998
M028	1.65	0.0170	0.0220	0.16	0.9996
M030	3.089	0.0140	0.0400	0.16	0.9997
M042	2.54	0.0350	0.0330	0.16	0.9981
M044	1.11	0.0055	0.0140	0.16	0.9999
M046	1.70	0.0200	0.0220	0.16	0.9994
M048	1.26	0.0170	0.0160	0.16	0.9996
M053	1.35	0.0095	0.0170	0.16	0.9998
P095	1.26	0.0170	0.0160	0.15	0.9995
P097	1.041	0.0160	0.0140	0.16	0.9996
P105	1.12	0.0190	0.0150	0.16	0.9994
P123	0.57	0.0140	0.0170	0.16	0.9996
P131	0.72	0.0150	0.0091	0.16	0.9996
P142	1.17	0.0210	0.0150	0.16	0.9993
P149	1.70	0.0160	0.0220	0.16	0.9996
S165	0.75	0.0096	0.0093	0.15	0.9998
S168	1.6	0.0240	0.0210	0.16	0.9991
S176	1.19	0.0180	0.0160	0.16	0.9995
S178	2.056	0.0220	0.0260	0.16	0.9992
S185	0.58	0.0210	0.0073	0.16	0.9992
S187	1.49	0.0460	0.0180	0.15	0.9963
S217	1.36	0.0071	0.0170	0.15	0.9999

A la par de la determinación del contenido de Cu(II) y Fe(II), en muestras de aguardiente de cantinas de la ciudad de León, se determinó así mismo la concentración en una muestra de la Compañía Licorera de Nicaragua.

En la figuras V.14, se muestra la distribución del contenido de Cobre y Hierro en las muestras analizadas según la proporción de estas en los territorios de la ciudad de León.

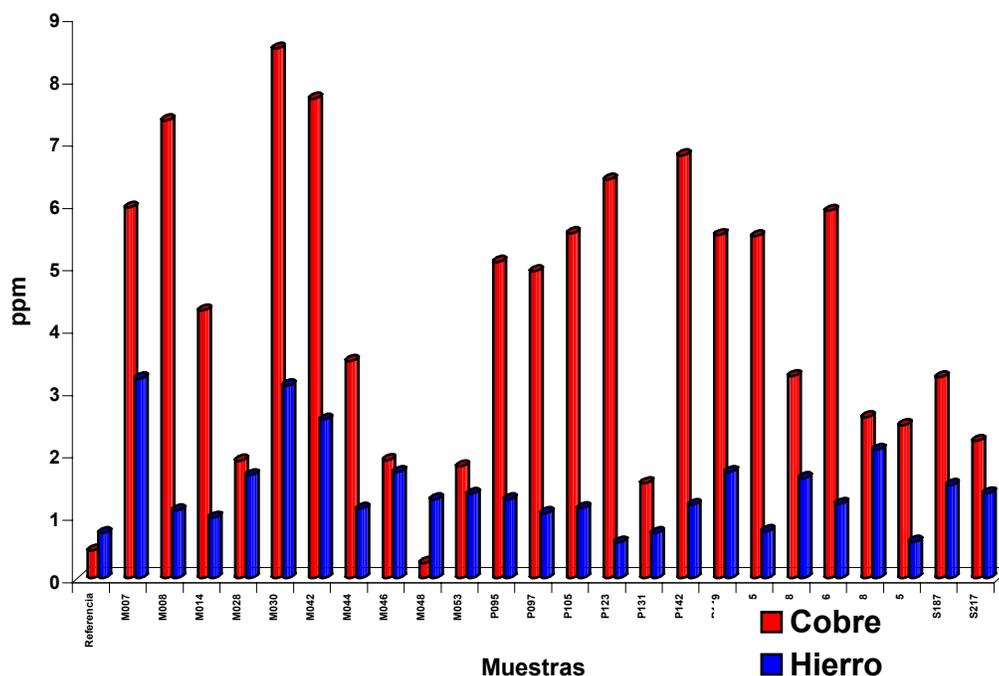


Figura V.14. Contenido de Cobre (II) y de Hierro (II) en las muestras analizadas.

En esta figura se puede observar que el contenido de Cobre(II) presente en las muestras analizadas salvo en dos casos es mucho mayor que el contenido de Hierro (II), específicamente en las muestras de: Licorera y Mántica Berríos 048.

La Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense NTON 03 036 00, que establece las Especificaciones de Bebidas Alcohólicas: Aguardiente, indica en sus paginas 6 y 7 las especificaciones del aguardiente, estableciendo en su página 7 que éste debe de contener un máximo de:

- a. Cobre 1.0 mg / 100 mL
- b. Hierro 2.0 mg / 100 ml

Si consideramos lo establecido en esta Norma respecto al Cobre y Hierro, podremos indicar que ninguna de las cantinas analizadas violenta lo establecido en esta norma, aunque sin embargo nos llama la atención que el contenido de Cobre sea mucho mayor respecto a la muestra adquirida directamente en la Compañía Licorera de Nicaragua.

Esto nos induce a pensar que probablemente el aumento del contenido de Cobre sea debido a fuentes de exposición a lo largo de la cadena de distribución y expendio del aguardiente desde el distribuido principal hasta el consuetudinario consumidor, esto podría deberse a los recipientes en los que se guarda el aguardiente que de alguna manera transfieren el cobre al interior del aguardiente.

Otra probabilidad y posiblemente a sea la mas indicada es que este aumento sea debido a algún tipo de adulterante que los dueños de cantinas utilizan para incrementar sus ganancias y que es necesario determinar en otro estudio posterior.

VI. CONCLUSIONES.

El desarrollo del presente estudio monográfico nos permitió establecer las siguientes conclusiones:

En el proceso de obtención de los diagramas de distribución de los complejos formados entre el Cobre(II) y Hierro(II) con 2,2'-Bipiridina en medio acuoso, se determinó que el complejo de mayor estabilidad es el $M(\text{By})_3$.

La longitud de onda de máxima absorción de los complejos estudiados, fue de 328.5 nm para el $\text{Cu}(\text{By})_3$ y 522.5 nm para $\text{Fe}(\text{By})_3$.

El error fotométrico determinado para las longitudes de onda de trabajo de los complejos formados fue en ambos casos menor del 1%, siendo $< 0.1\%$ para el complejo del cobre y $< 4\%$ para el complejo del hierro.

Se calcularon algunos parámetros del desempeño del método, estableciéndose que la linealidad del método fue excelente con r^2 de 0.9983 y 0.9985 para el cobre y hierro respectivamente, los límites de detección y cuantificación fueron del orden de: 0.1402 mg/L y 0.0543 mg/L y de 0.3826 mg/L y 0.0394 mg/L para el cobre y hierro respectivamente, el porcentaje de recobro fue de 94.6 \pm 4.4 y 100.6 \pm 3.7% para el cobre y hierro respectivamente, la repetibilidad de la curva de calibración en 5 días fue excelente y el efecto de matriz en ambos casos fue determinado..

El diseño estadístico seleccionado nos permitió establecer un universo de 24 muestras, de las cuales 7 correspondían al territorio Perla Maria Norori, 7 al territorio Subtiava y 10 al territorio Mántica Berríos.

Los resultados de la análisis de las muestras nos permite establecer que en la mayoría de las cantinas muestreadas el contenido de cobre es llamativamente mayor respecto al encontrado en la muestra de la licorera, lo que nos indica la existencia de posibles adulteraciones en el aguardiente expendido.

VII: RECOMENDACIONES.

Una vez finalizado el presente estudio y una vez realizados los análisis correspondientes creemos nuestro deber indicar las siguientes recomendaciones:

Realizar un estudio del pH óptimo de máxima formación de los complejos en medio hidroalcohólico en un rango de pH de 3 a 8, tanto para Cobre como para el Hierro.

Realizar un estudio de optimización del método de forma que se optimice la obtención de los complejos, usando otros reductores (hidroxilamina), temperatura, tiempo de agitación, tiempo de espera, etc.

Estudiar el efecto de interferentes que puedan afectar la señal de respuesta de los complejos estudiados.

Realizar un estudio de validación del método.

Desarrollar en la medida de lo posible un estudio de la robustez del método, realizando para esto un ejercicio interlaboratorio con al menos 5 laboratorios.

Aplicar este método al estudio de otros tipos de bebidas alcohólicas como, tequila, whisky, etc.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

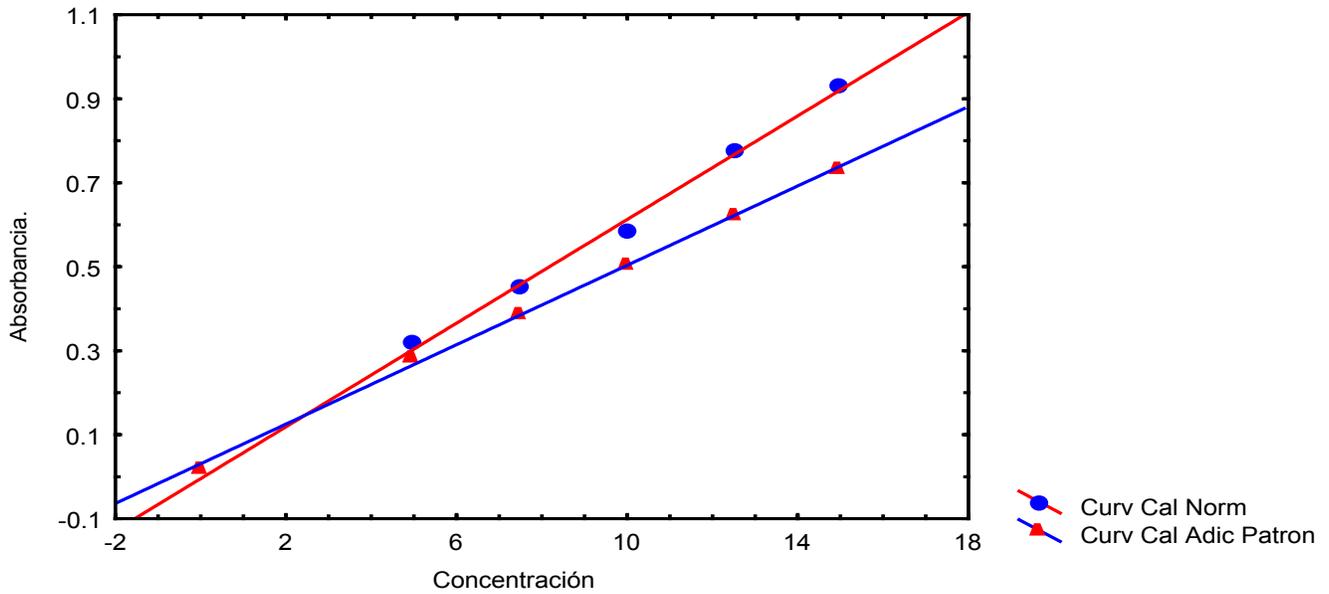
1. Millar J. C.; Millar J.N. Estadística para Química Analítica. 2de Edición, Editorial Addison-Wesley o Iberoamérica S. A. 1993.
2. Douglas A. Skoog y James Leary. Análisis Instrumental. 4ta Edición, Editorial McGraw-Hill, México 1994.
3. Jorge Chacón. Curso teórico-práctico en aspectos técnicos del control de calidad interno del Laboratorio de Análisis. CIRA / UNAN-Managua 1999.
4. Richard C. Weimer. Estadística. Primera Edición, Compañía Editorial Continental, S.A de C.V México 1996.
5. Richard L. Scheaffer, William Mendenhall, Lyman Ott. Elementos de Muestreo. Grupo Editorial Iberoamérica, México 1987.
6. William Mendenhall, Denis D. Wackerly. Estadística Matemática con aplicación. 2da Edición Grupo Editorial Iberoamérica S.A de C.V 1994.
7. John E. Freund. Estadística Elemental Moderna. Editorial Pueblo y Educación, Ciudad de la Habana.
8. Br. Noelia Moreno Chévez, Br. Maria Auxiliadora Ramírez, Validación del Método de Azul de Indofenol Aplicado a la Determinación de Nitrógeno Amoniacal en Aguas. Tesis previo a optar el Título de Licenciado en Química. León, Nicaragua 1999.
9. Comisión Nacional de Normalización Técnica y Calidad, Ministerio de Fomento, Industria y Comercio. Norma Técnica de Especificaciones de Bebidas Alcohólica-Aguardiente NTON 03 036-00.
10. A. Ringbom, Formación de complejos en Química Analítica, Editorial. Alambra, Madrid 1979.
11. Harris W., Análisis Químico Cuantitativo, Editorial Iberoamericana, México 1992.
12. www.inchem.org/documents/ehc/ehc200.html.
13. www.qhh.online.org/MK2/web/etapa2_body.html
14. www.jaguarstudio.com.mx/procobre/aplica/vida.html.
15. <http://plata.uda.cl/minas/apuntes/geología/Mineral/103mincobre.htm>.

16. [www./enntech.com/espanol/tabla-periodica/fe.htm](http://www.enntech.com/espanol/tabla-periodica/fe.htm).
 17. www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002659.htm.
 18. <http://personales.ya.com/casanchi/did/er.htm>.
 19. <http://xenon.pquim.unam.mx./lbeer.html>.
 20. Morrison R. Y Boyd R. Química Orgánica Segunda Edición, Español Fondo Educativo Interamericano, México 1985, página 457-466.
 21. Jorge Isaac Cisne Altamirano. Validación y Evaluación de la Incertidumbre en la Determinación de Fe²⁺ en Aguas Naturales. Monografía, León Nicaragua, 2001.
 22. Alfonso García Barbancho. Estadística Elemental Moderna. Décima Edición. Editorial Ariel, S.A. (Barcelona) 1986.
-
-

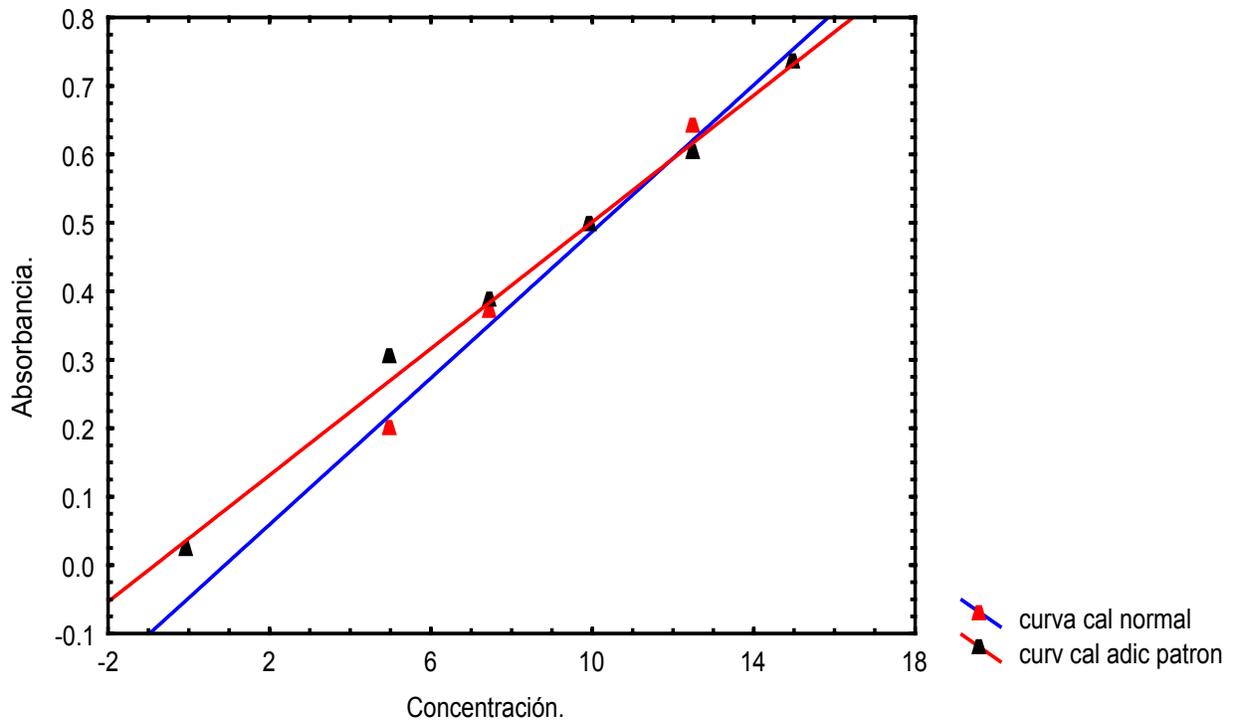
IX. ANEXOS

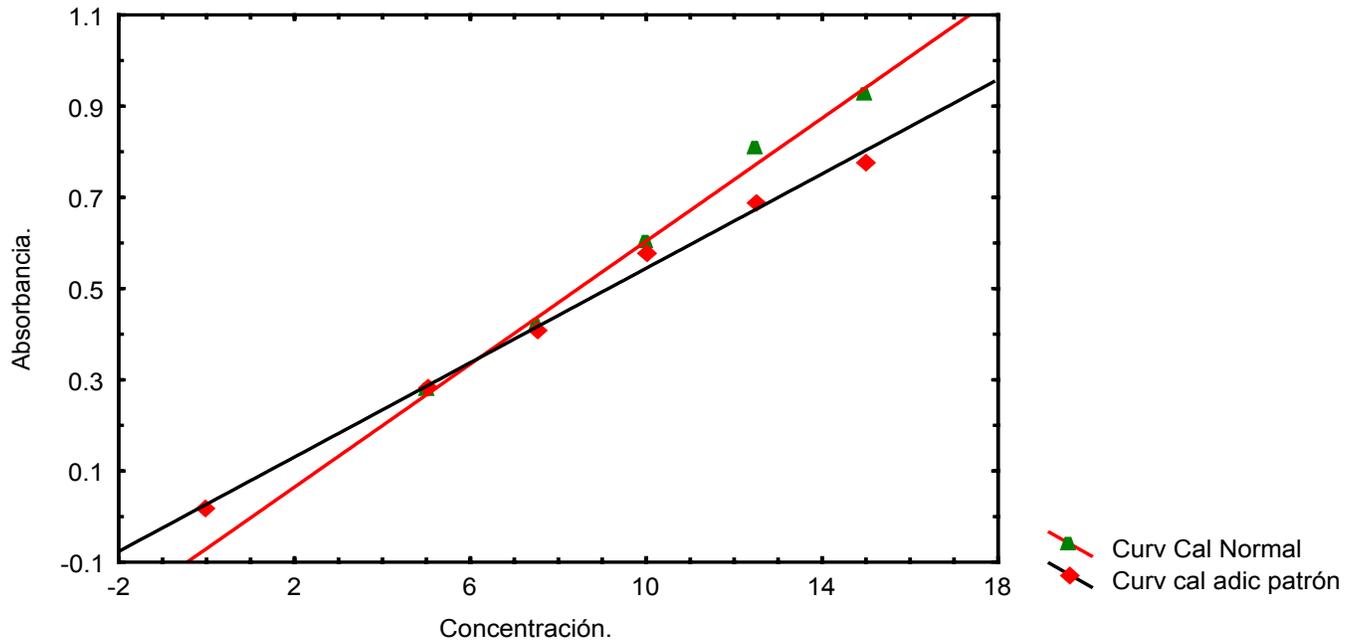
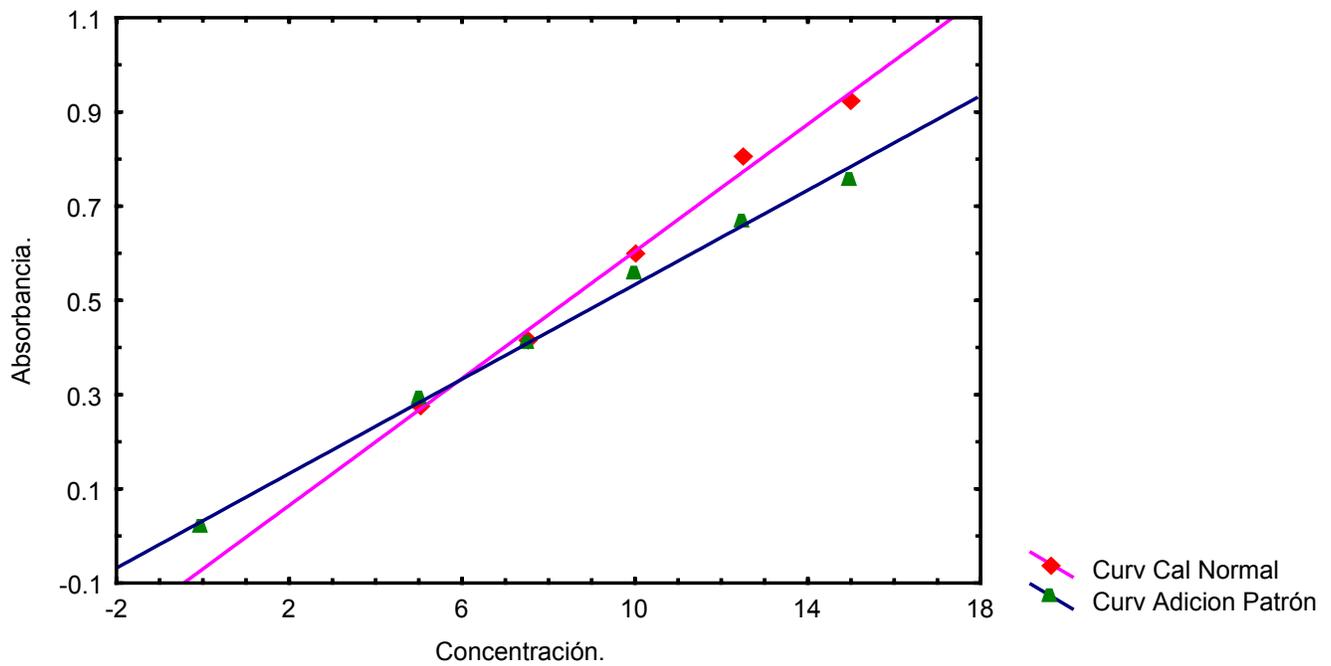
Combinación de las CCAP Y CCN del Cu.

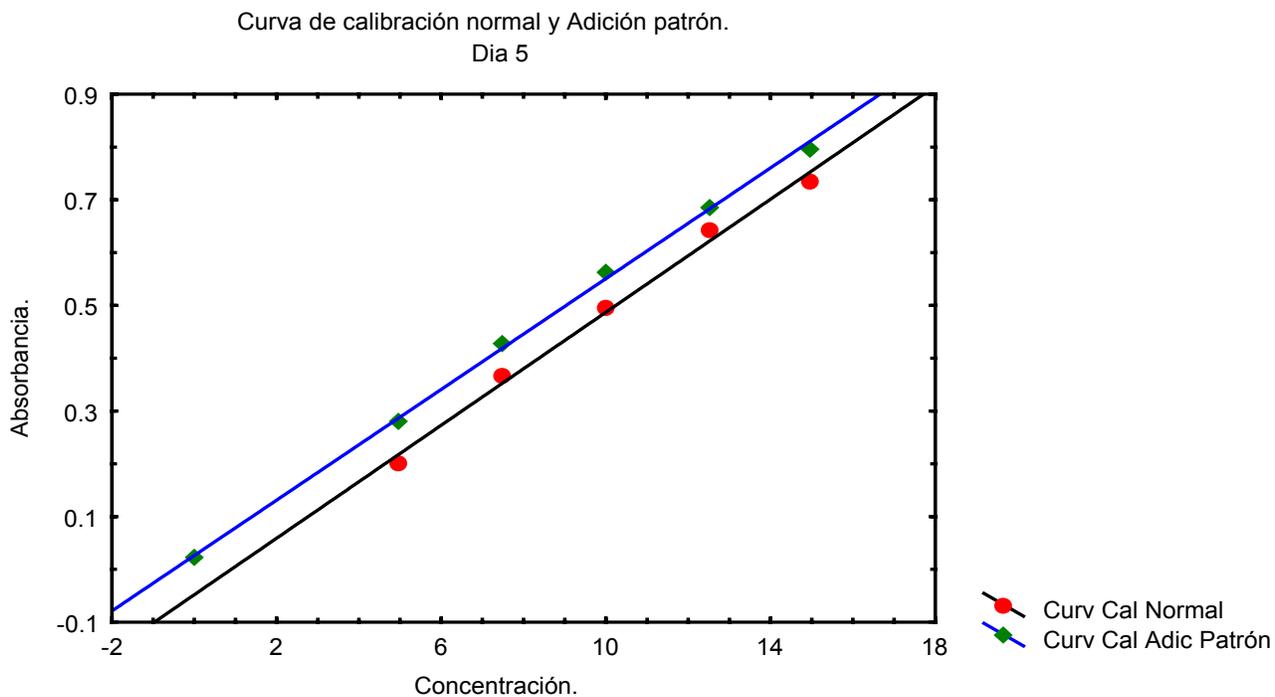
Curva de calibración por adición patrón y curva calibración por adición patrón
Día 1



Curva de calibración normal y adición patrón
Día 2



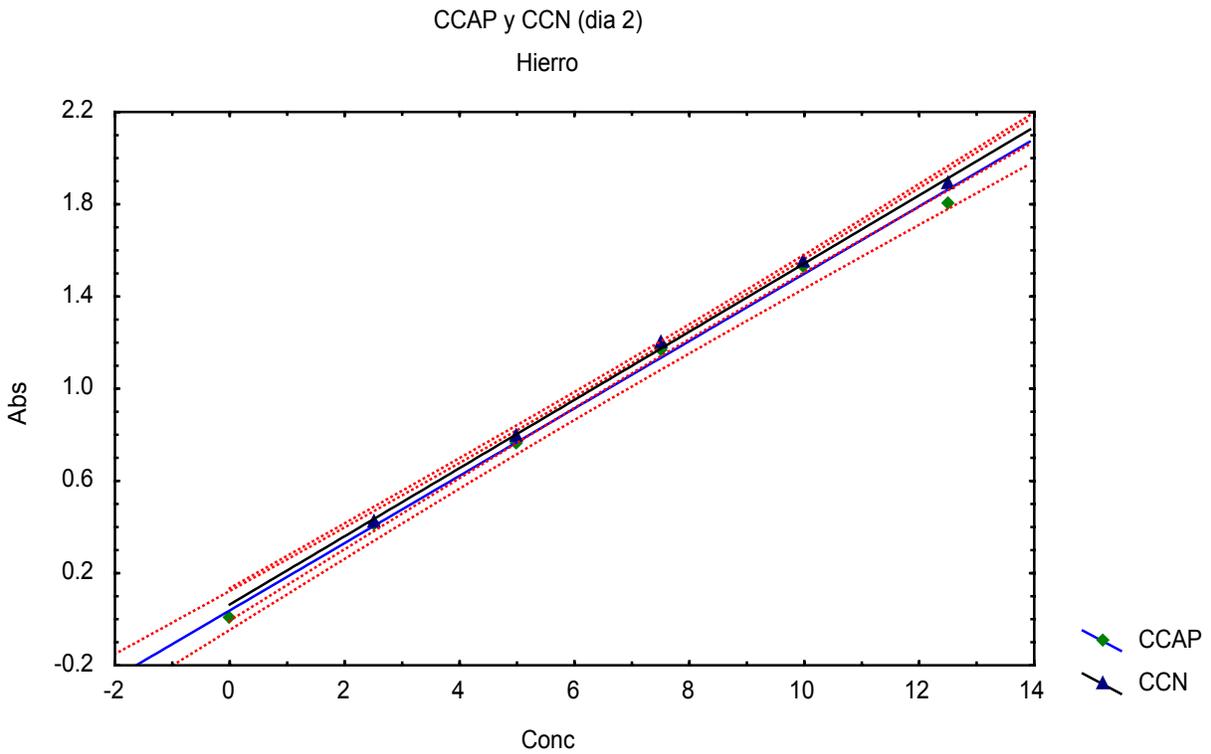
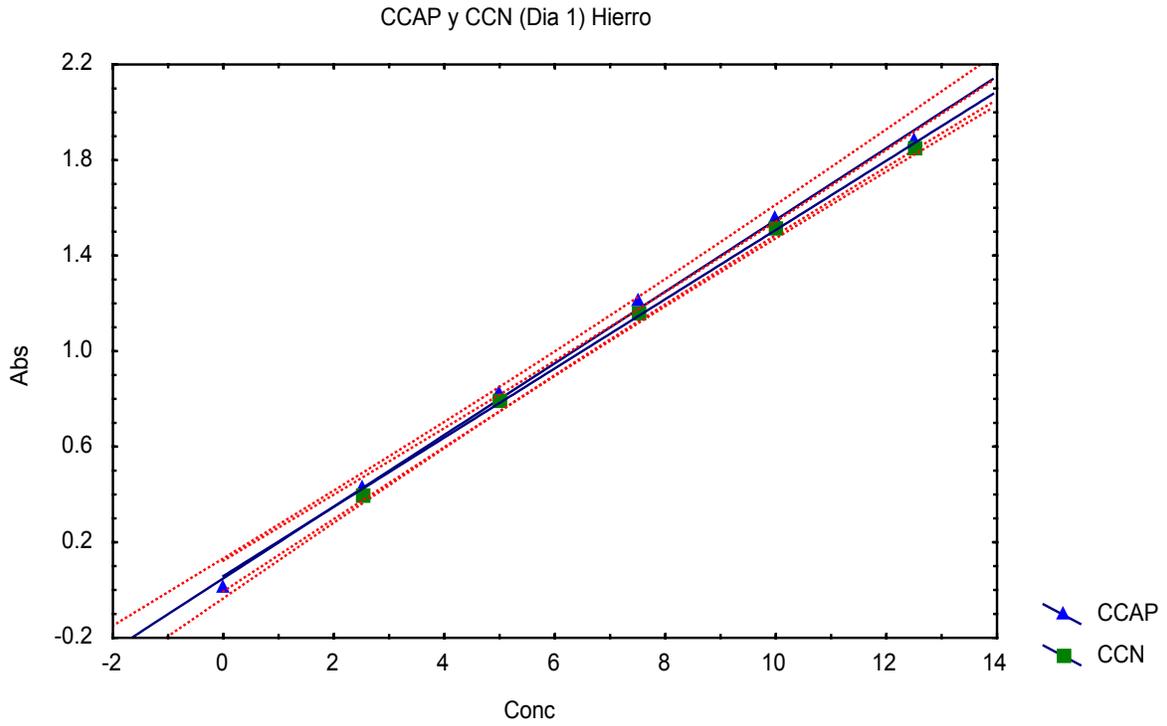
Curva de calibración normal y adición patrón.
Dia 3Curva de calibración normal y adición patrón.
Dia 4

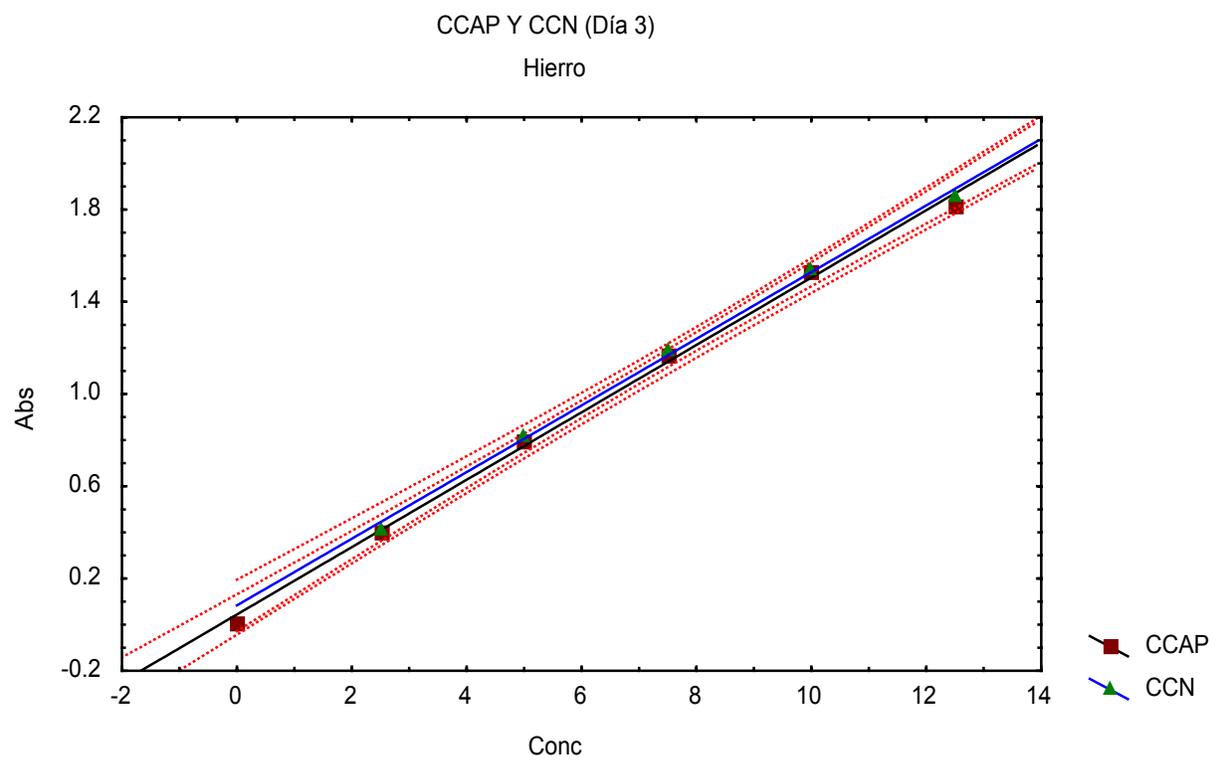


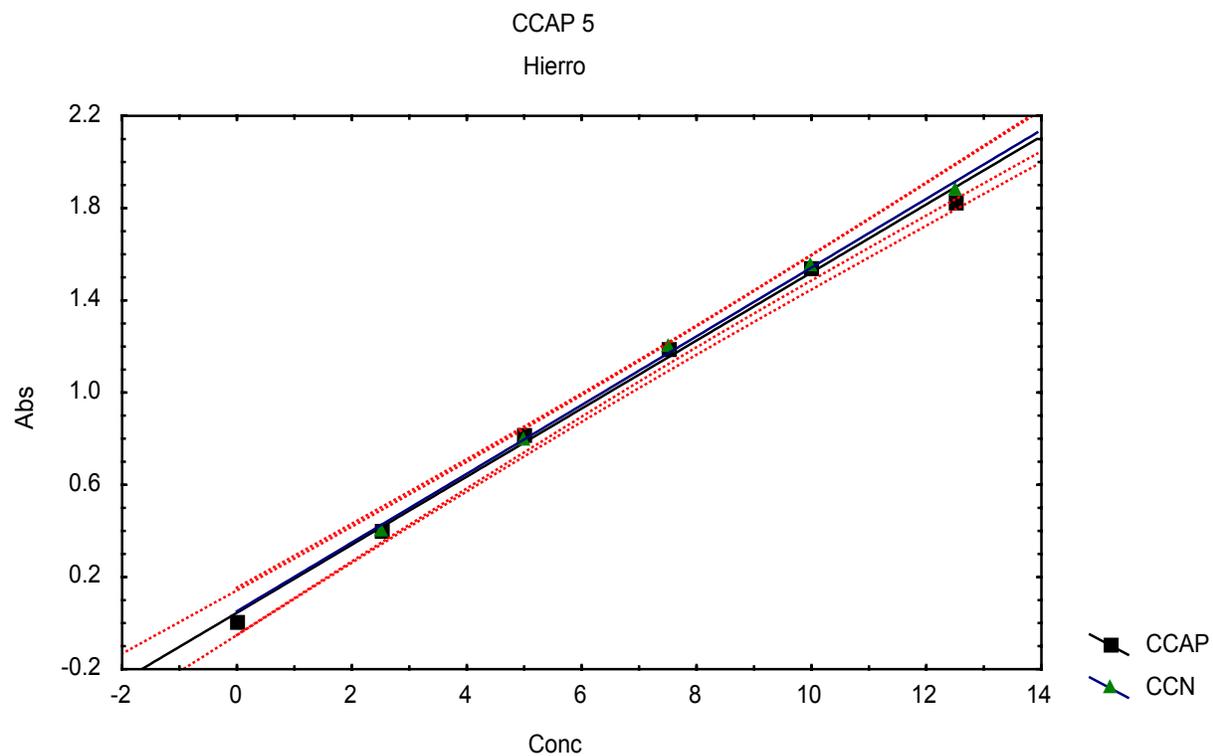
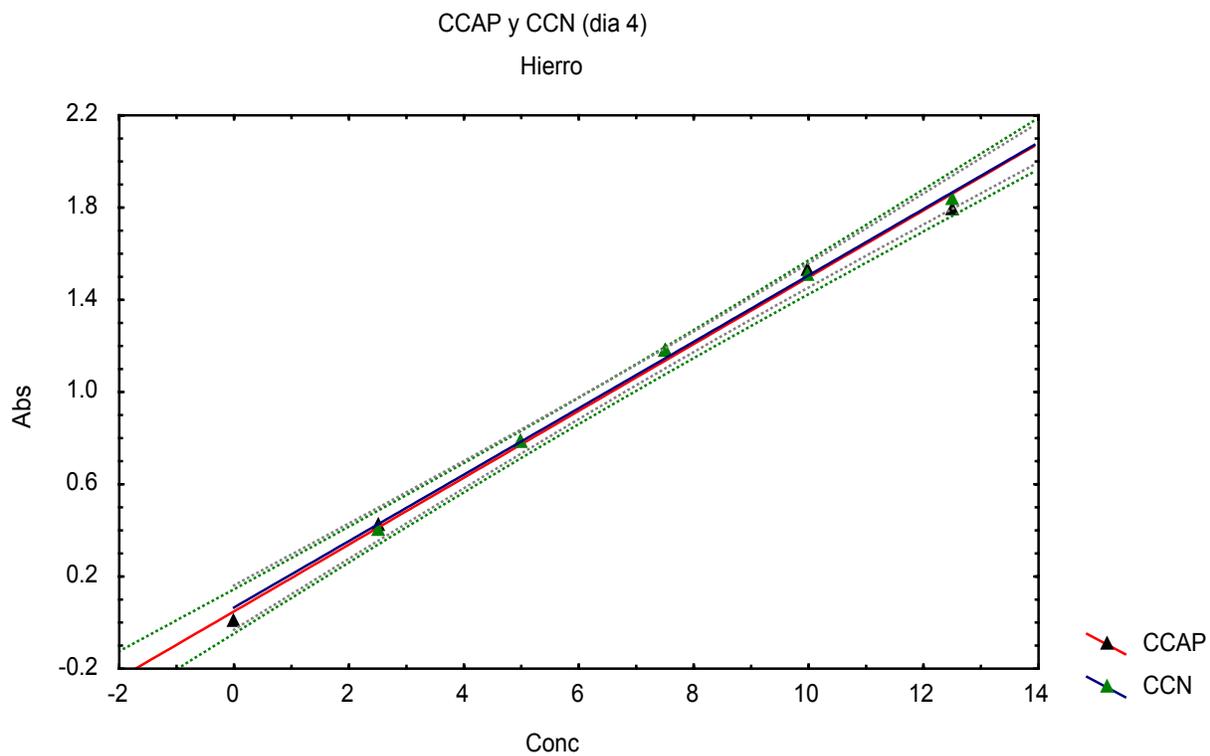
Porcentaje de recuperación para el análisis de cobre, por cinco días consecutivos

Días	1	2	3	4	5	Promedio
%R con su incertidumbre	73.7 ± 3.4	80.5 ± 5.4	74.7 ± 4.5	145.3 ± 4.2	98.6 ± 4.6	94.6 ± 4.4

Combinación de las CCAP Y CCN del Fe.



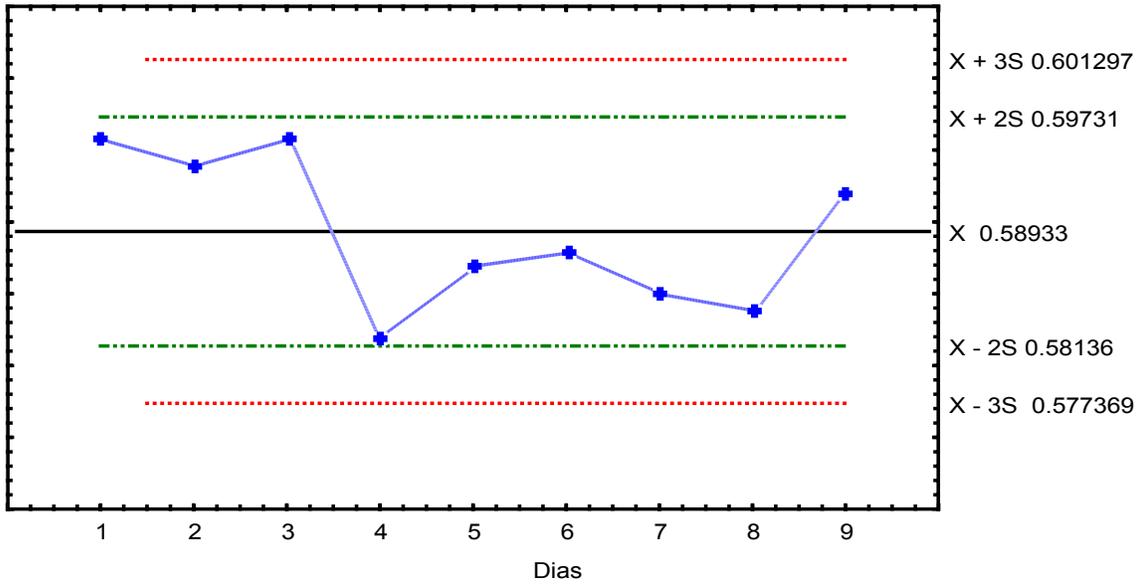




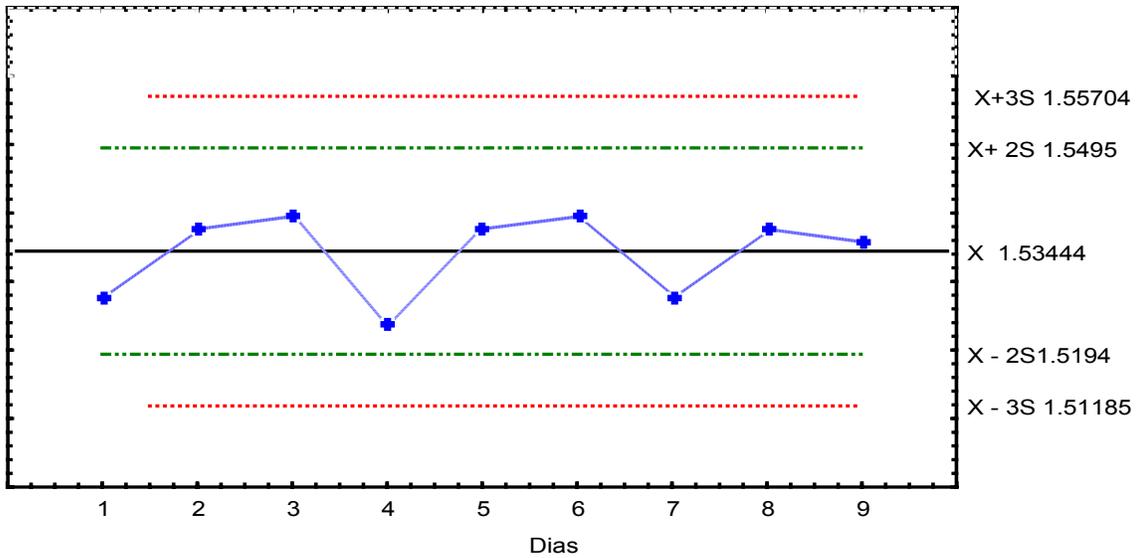
Porcentaje de recuperación para el análisis de hierro, por cinco días consecutivos

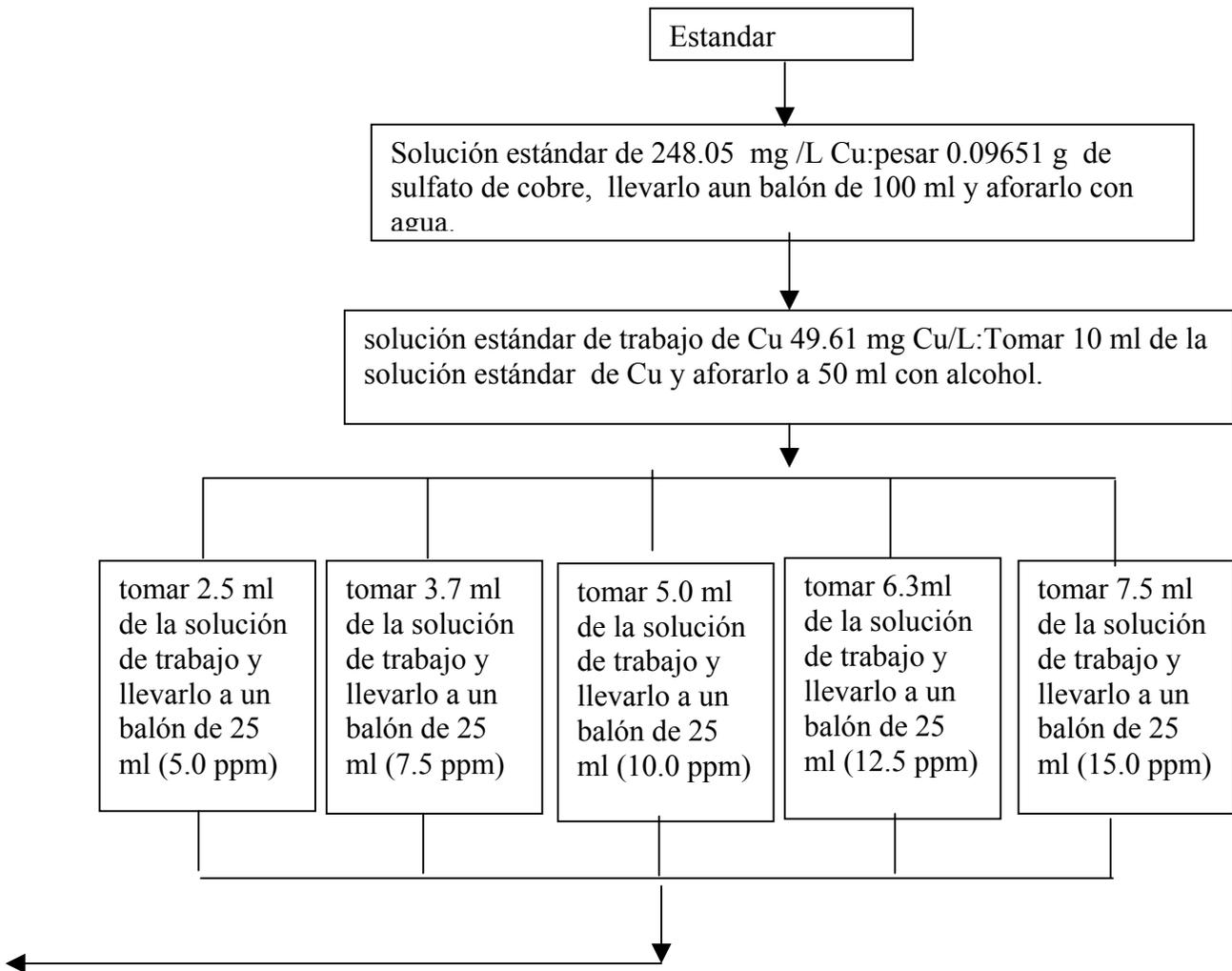
Días	1	2	3	4	5	Promedio
%R con su incertidumbre	103.5 ± 3.2	98.8 ± 3.2	101.1 ± 4.0	100.6 ± 3.9	99.0 ± 3.9	100.6 ± 3.7

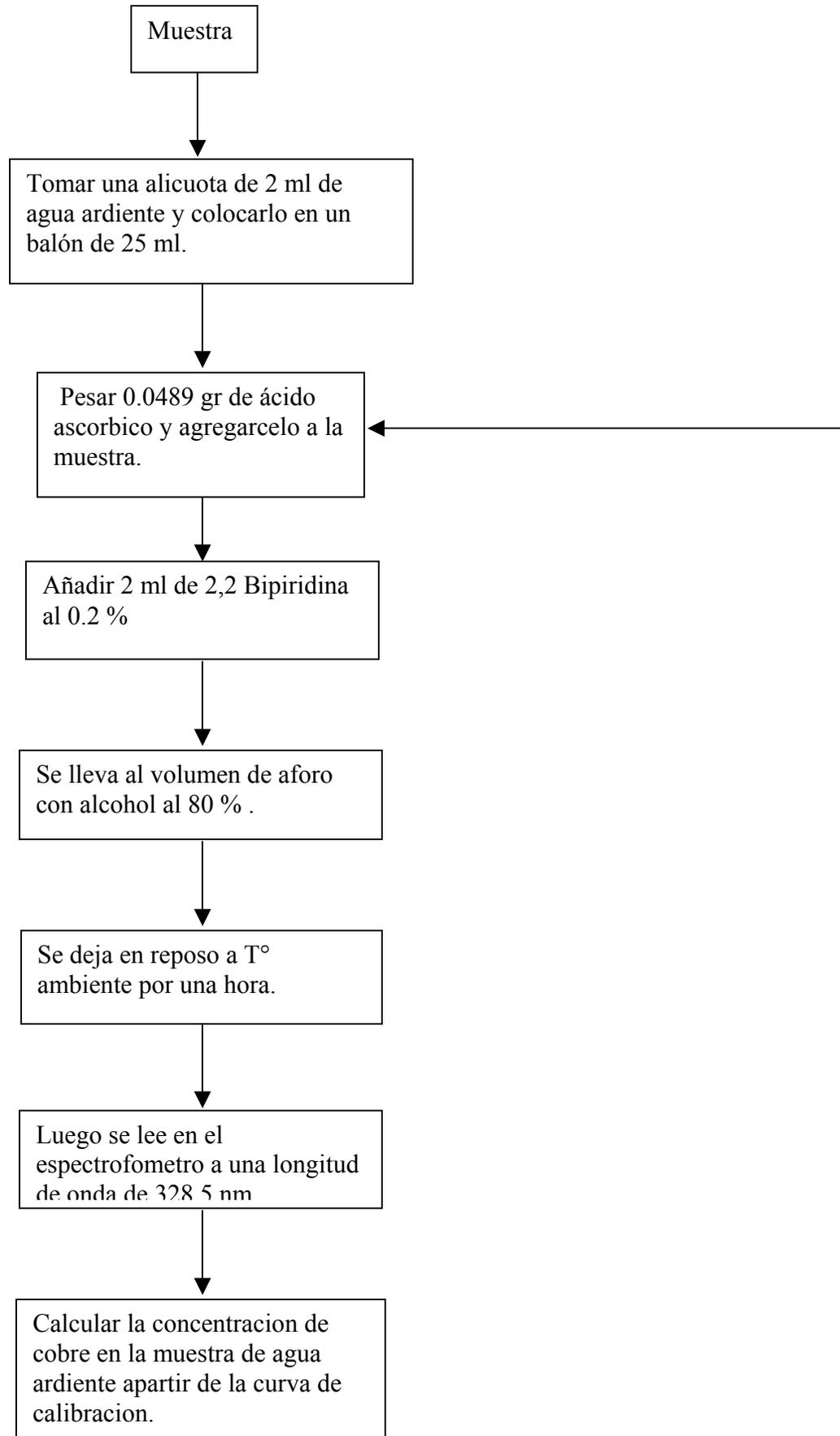
Carta de control del estandar de Cobre II (10 ppm)

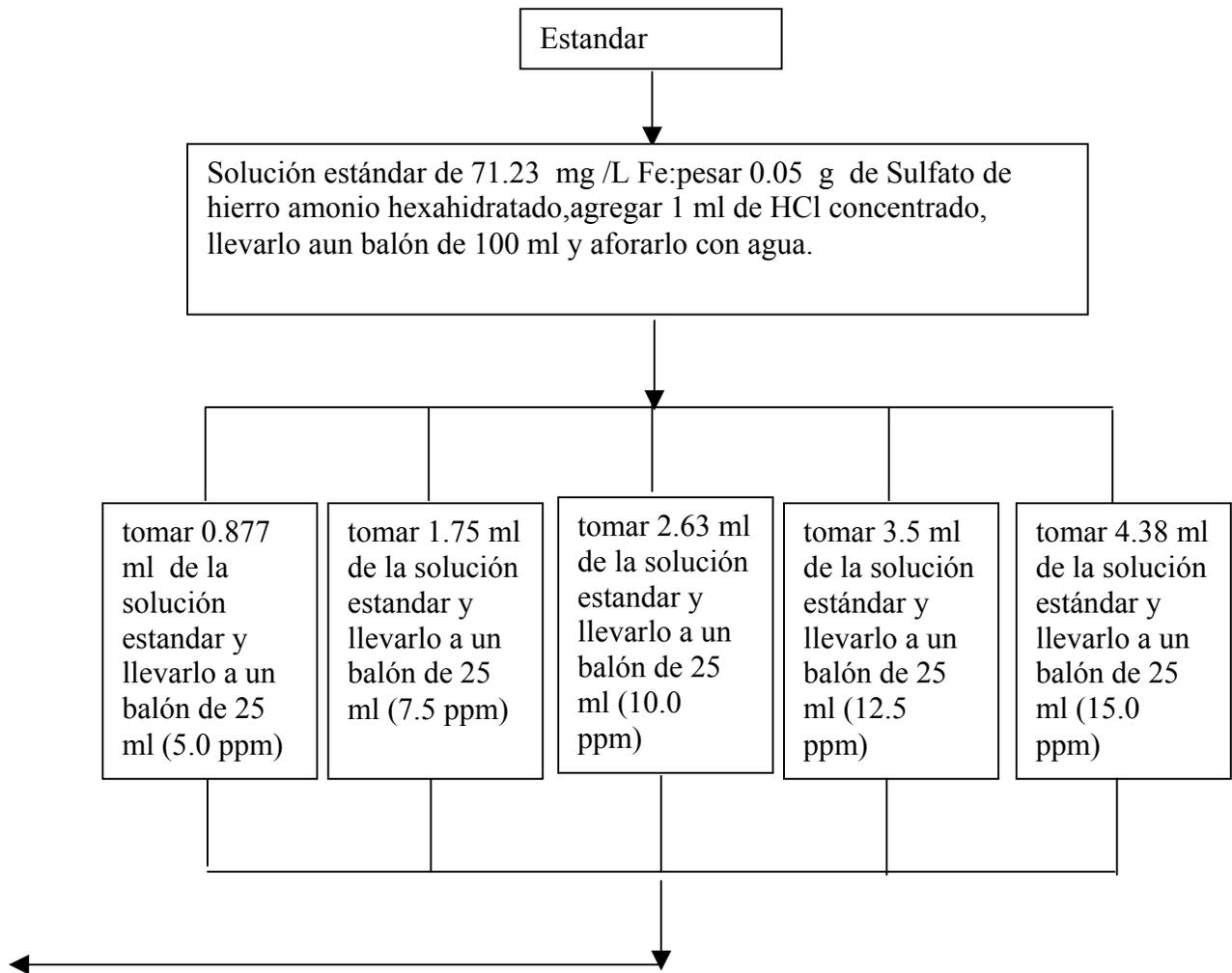


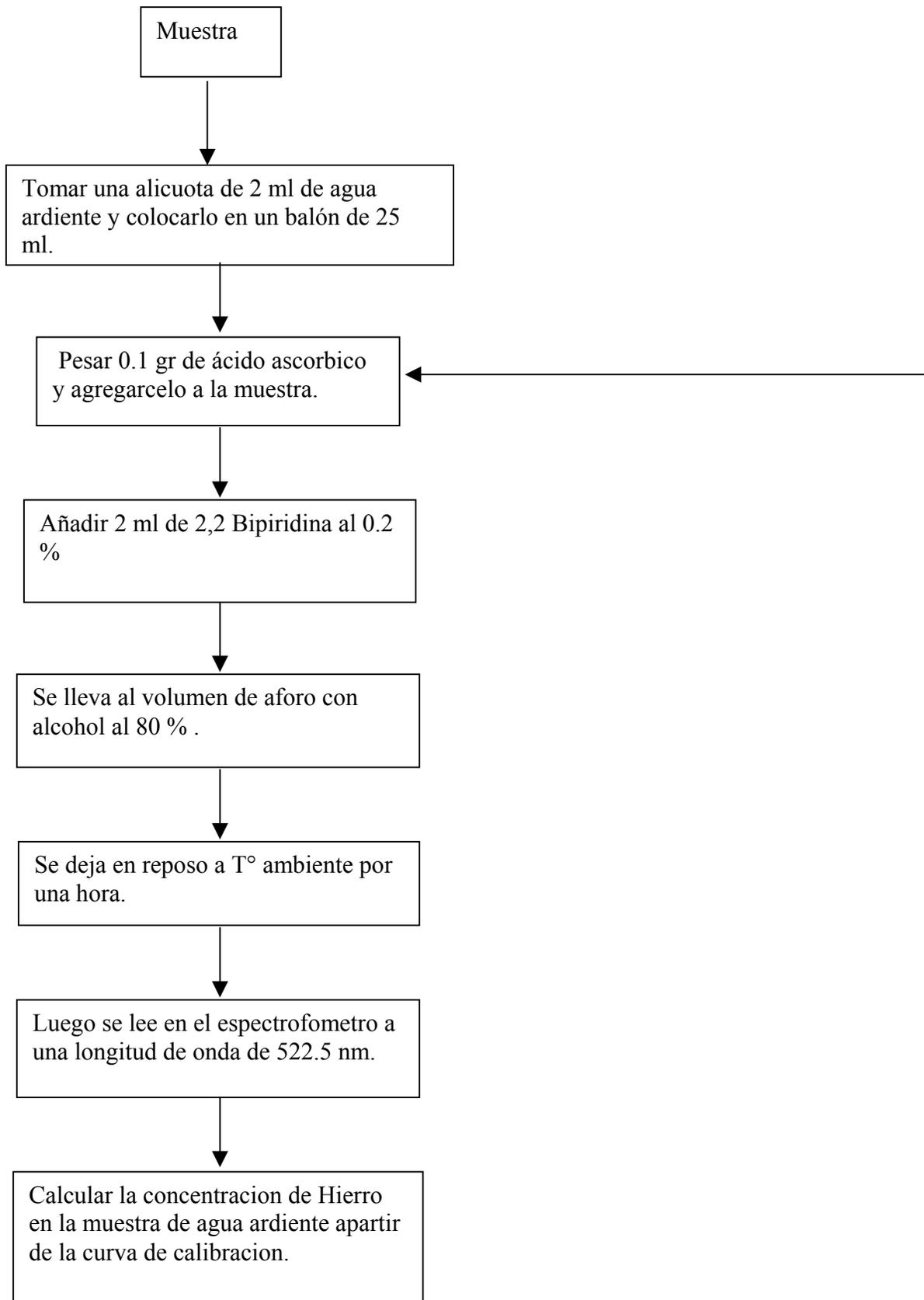
Carta de control del estandar de Hierro II (10 ppm)



FLUJOGRAMA DEL ANÁLISIS DE COBRE



FLUJOGRAMA DEL ANÁLISIS DE HIERRO





A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD