

---

# **COMPARACIÓN ESTADÍSTICA ENTRE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE EXTRACTOS DE COMPOSTA PARA EL DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO EN LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE MANGANESO (Mn)**

<sup>1</sup>Denise Reyes-García, <sup>1</sup>Diana García-Aguirre, <sup>1</sup>Susana Saval-Bohórquez, <sup>2</sup>Tonantzin Ramírez-Pérez

<sup>1</sup>Laboratorio de Ingeniería Ambiental, Instituto de Ingeniería, UNAM

<sup>2</sup>Unidad de Metrología, Facultad de Química, UNAM

Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán, Ciudad de México, C.P. 04510

+52 5556233600 Ext 8715, [DReyesG@iingen.unam.mx](mailto:DReyesG@iingen.unam.mx), [DGarciaA@iingen.unam.mx](mailto:DGarciaA@iingen.unam.mx), [SSavalB@iingen.unam.mx](mailto:SSavalB@iingen.unam.mx), [tramirezp@quimica.unam.mx](mailto:tramirezp@quimica.unam.mx)

## **RESUMEN**

El presente trabajo está enfocado en la comparación estadística entre curvas de calibración, preparadas con la matriz de extractos provenientes de la técnica de fraccionamiento de metales pesados, para establecer los métodos adecuados para el propósito en la determinación de manganeso en extractos de composta por la técnica de espectrometría de absorción atómica. La metodología establecida se realiza, analizando estándares de diferentes concentraciones, blancos de muestra, muestras adicionadas y material de referencia certificado. Se evaluó la homocedasticidad de cada curva, la similitud entre pendientes, la ordenada al origen y la estimación de incertidumbre por series de Taylor y Monte Carlo.

## **PALABRAS CLAVE**

Absorción atómica, homocedasticidad, incertidumbre química, fraccionamiento de metales.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El trabajo experimental para el desarrollo e implementación de los métodos de cuantificación se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA) por la técnica de espectrometría de absorción atómica (EAA) en flama para la determinación de Manganeso en extractos de composta resultado de realizar la especiación de metales. El trabajo fue desarrollado bajo la certificación ISO 9001:2015 del LIA, quien tiene como servicios sustanciales los procesos de determinaciones analíticas y diseño y desarrollo de métodos.

Si bien lo más recomendable para realizar cada determinación es preparar una curva de calibración por cada tipo de matriz, en ocasiones la carga de trabajo es tan alta que es imposible validar los métodos para cada matriz, especialmente en un laboratorio de servicio a la investigación en donde el cambio de matriz es frecuente. Una opción a la que se ha recurrido es analizar, por ejemplo, las matrices acuosas con curvas de HNO<sub>3</sub> 2% que es equivalente a la acidez recomendada para la preservación de las muestras para su transporte, aludiendo a la comparación estadística de los extractos evaluada previamente [1].

La importancia de implementar y desarrollar un método adecuado para el propósito [2] reside en la confiabilidad que demuestran los resultados para la toma de decisiones y el prestigio del laboratorio, por lo

tanto, el rendimiento del método y la incertidumbre deben tener niveles de confianza conocidos y aceptables; para esto se utilizan parámetros estadísticos que demuestren el compromiso con la confiabilidad de los resultados.

## **2. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **2.1. Descripción de la muestra**

Las muestras fueron extractos de compostaje para la biodegradación de polietileno de baja densidad elaborado con aditivos pro-oxidantes: estearato de manganeso (MnST). Las cinco clasificaciones de extractos son:

E1: Extracto de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>)

E2: Extracto de acetato de sodio (NaAc)

E3: Extracto de hidrocloreto de hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH.HCl)

E4: Extracto de peróxido de hidrógeno más acetato de amonio en ácido nítrico (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+HNO<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>Ac)

E5: Extracto de ácido nítrico y ácido clorhídrico con agua (HNO<sub>3</sub>+HCl+H<sub>2</sub>O)

### **2.2. Controles**

Se preparó una curva de calibración por cada tipo de extracto y se analizó el blanco de reactivos por cada

lote establecido. La determinación de manganeso se realiza por EAA-Flama.

Los extractos contenían niveles altos de sodio y materia orgánica por lo que fue necesario contar con controles que disminuyeran el impacto de las interferencias químicas y espectrales que se pudieran tener.

Los controles establecidos para la determinación son: Blanco de reactivos (BR), blanco de muestra (BM, extracto de composta libre de polietileno), Estándar de Verificación continua (EVC, BM adicionado con el elemento Mn), una muestra duplicada (Muestra analizada en dos ocasiones al inicio y al final de la corrida) y curva de calibración (6 niveles por triplicado).

### 2.3. Técnica analítica

Para el método de determinación de Mn en extractos de composta se empleó la técnica de espectroscopia de absorción atómica Flama, que se fundamenta en la ley de Lambert-Beer, principalmente la medida de la absorbancia, siendo ésta proporcional a la concentración de la muestra (c), a la absorbancia (b) y al coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) como se observa en la ecuación de Lambert-Beer (1).

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b \quad (1)$$

Se utilizó un espectrofotómetro marca Thermo Solar ICE 3000, para la cuantificación del elemento en estudio se realizaron curvas de calibración empleando patrones de referencia.

Para la implementación del método analítico se tuvieron en cuenta herramientas estadísticas como: intervalo lineal, límite de detección, límite de cuantificación, desviación estándar, prueba t-Student y prueba F de Fisher.

Los parámetros que se utilizaron para la determinación del analito de interés fueron los recomendados en el manual del programa SOLAAR del equipo, los cuales se desglosan en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de operación del equipo de absorción atómica por flama.

Lámpara de cátodo hueco	Mn
Longitud de onda (nm)	279.5
Tipo de flama	Aire/acetileno
Flujo del combustible del gas combustible (Lmin <sup>-1</sup> )	1.2
Bandpass (nm)	0.2

### 2.4. Desarrollo

Se tuvieron en cuenta las recomendaciones de la norma NMX-AA-115-SCFI-2015 Análisis de agua-

criterios generales para el control de la calidad de resultados analíticos, ante la falta de una norma específica para el tipo de muestras de interés en este trabajo.

La experimentación se realizó en condiciones de repetibilidad y por triplicado. Las soluciones fueron preparadas por gravimetría a partir de un material de referencia certificado (*High Purity Standards*, HNO<sub>3</sub> 2% p/p) de 1000 µgmL<sup>-1</sup> ± 5 µgmL<sup>-1</sup> de Mn, en un intervalo de trabajo que se estableció entre 0.3 mg/L y 4 mg/L, considerando la linealidad reportada en software SOLAAR del EAA.

Límite de detección (LD): La evaluación del valor obtenido con la ecuación 3 se realizó mediante el análisis de 30 repeticiones del blanco de muestra, calculando el promedio, desviación estándar se corroboró que, en este caso, todos los datos fueron aceptados.

Límite de cuantificación (LC): La evaluación del valor obtenido con la ecuación 4 se realiza añadiendo a la muestra blanco una concentración conocida del analito de interés cercana al valor obtenido con la ecuación 4; se analizaron 30 veces y se calculó el promedio, desviación estándar se corroboró que, en este caso, todos los datos fueran aceptados.

Curvas de calibración: Las concentraciones se prepararon considerando el valor asignado en el certificado del Material de referencia. Los ensayos se repitieron en tres días diferentes por cada extracto sin recibir tratamiento de muestra adicional y realizando una curva de calibración diferente cada día.

Comparación estadística de las curvas de calibración: la evaluación de este parámetro se realizó al comparar las curvas de calibración estándar (HNO<sub>3</sub> 2%) con las curvas preparadas con la adición de estándares al extracto de composta correspondiente.

### 2.5 Cálculos

El cálculo de los parámetros rango lineal, límite de detección del método, límite de cuantificación se realizó como se describe a continuación.

Rango Lineal: Se obtiene por el método de mínimos cuadrados los valores de la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación, teniendo en cuenta la proporcionalidad entre la concentración del analito y la señal producida por el equipo se delimita la curva a un valor de  $R^2 > 0.95$ .

Ecuación lineal utilizada para la curva:

$$\text{Absorbancia} = \text{pendiente (concentración)} + \text{ordenada} \quad (2)$$

Para la determinación de los límites de cuantificación y detección se objetivo la señal de 30 repeticiones del Blanco de Reactivos de cada extracto. Utilizando las fórmulas siguientes:

$$LD = 3.3(\text{error típico}) + \text{ordenada origen} \quad (3)$$

$$LQ = 10(\text{error típico}) + \text{ordenada origen} \quad (4)$$

Se realizó una comparación de las varianzas correspondientes a la pendiente y la ordenada a través del ensayo de homogeneidad de Bartlett para comprobar la suposición de que las muestras provienen de la misma población, es decir, que es indistinto analizar las muestras con una curva de calibración de HNO<sub>3</sub> al 2% o con una curva preparada con su matriz específica. Dado que esta prueba las analiza en conjunto se complementó con un análisis de F de Fisher, con el que se tiene un resultado más detallado sobre las varianzas.

$$\chi_0^2 = \frac{1}{C} \left( (N-h) \ln S_C^2 - \sum_{s^2=1}^h (n_j - 1) \ln S_i^2 \right) \quad (5)$$

Donde:

$$S_C^2 = \frac{1}{N-h} \sum_{j=1}^h (n_j - 1) s_j^2 \quad (6)$$

$$C = 1 + \frac{1}{3(h-1)} \sum_{j=1}^h \left( \frac{1}{n_j} - \frac{1}{N-h} \right) \quad (7)$$

Nivel de significancia  $\alpha=0.05$

n: número de datos por cada serie.

h: número de series de datos

N: número total de datos

h-1: grados de libertad

Valor crítico de  $\chi^2$  :11.0705

C: 1.31556

Si la  $\chi_0^2$  es menor que el valor crítico de  $\chi^2$  entonces es válido realizar las determinaciones de muestras desconocidas con una curva de HNO<sub>3</sub> 2%, de lo contrario, será necesario realizar una curva de calibración con la matriz correspondiente al extracto en evaluación.

Se realizó una evaluación de la homocedasticidad de las pendientes  $\mu$  (HNO<sub>3</sub> 2%) y  $\mu$  (Extracto) a través del cálculo de F (ecuación 8) [3, 4].

$$F_{cal} = \frac{S_{\mu(HNO_3\ 2\%)}^2}{S_{\mu(Extracto)}^2} > 1 \quad (8)$$

Donde m es la pendiente de la curva correspondiente. El valor crítico de F se obtiene al 95% de confianza ( $F_{crit, 95\%, v1, v2}$  donde  $v1=n-2$ ,  $v2=n-2$ ).

Se realiza la prueba de t correspondiente para conocer si existe diferencia entre las pendientes con la ecuación 7 cuando las varianzas son homocedásticas y con las ecuaciones 9 y 10 para las heterocedásticas [3, 4].

$$t_{cal} = \frac{|\mu(HNO_3,2\%) - \mu(Extracto)|}{\sqrt{S_{\mu(HNO_3,2\%)}^2 + S_{\mu(Extracto)}^2}} \quad (9)$$

El valor tabulado se obtiene al 95% de confianza (grados de libertad  $n(HNO_3\ 2\%) + n(Extracto)-2$ ). Por tanto, si  $t_{cal} < t_{tab}$  entonces,  $\mu(HNO_3\ 2\%) = \mu(Extracto)$  y si  $t_{cal} > t_{tab}$  entonces  $\mu(HNO_3\ 2\%) \neq \mu(Extracto)$ .

$$t_{cal} = \frac{t_1 \cdot S_{\mu(HNO_3,2\%)}^2 + t_2 \cdot S_{\mu(Extracto)}^2}{S_{\mu(HNO_3,2\%)}^2 + S_{\mu(Extracto)}^2} \quad (10)$$

Donde:  $t_1 = t_{tab\ 95\%}^{n_1-2}$ ;  $t_2 = t_{tab\ 95\%}^{n_2-2}$  por lo tanto, si  $p < 0.05$  se acepta la hipótesis nula  $\mu(HNO_3\ 2\%) = \mu(Extracto)$  y si  $p > 0.05$   $\mu(HNO_3\ 2\%) \neq \mu(Extracto)$  se acepta la hipótesis alterna.<sup>4</sup>

### 3. RESULTADOS

En las tablas 2 a la 6 se presentan los resultados obtenidos en cada una de las etapas de análisis, tanto de la parte experimental como estadística.

#### 3.1. Resultados de la linealidad en el método de manganeso

Los resultados obtenidos para las curvas de manganeso se desglosan en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación de curvas preparadas con Blanco de reactivos y con HNO<sub>3</sub> 2% para la determinación de manganeso. Intervalo de la curva: 0.3 mg/L - 4 mg/L

Mn	Pendiente Promedio ( $\mu$ )	Varianza $\mu$	Ordenada Promedio (b)	Varianza b
HNO <sub>3</sub> 2 %	0.199	0.000308	0.033	$9.1 \times 10^{-5}$
E1	0.215	0.000041	0.121	0.0247
E2	0.175	0.000200	0.155	0.00229
E3	0.155	0.000049	0.104	$2.7 \times 10^{-6}$
E4	0.157	0.002350	0.072	0.0028
E5	0.164	0.000106	0.072	$8.3 \times 10^{-7}$

En la Tabla 3 se muestran los resultados de las comparaciones de las varianzas de cada curva con respecto a la de HNO<sub>3</sub> 2 %.

Prueba F para varianzas de dos muestras

Ho:  $S^2(\text{HNO}_3 \text{ 2\%}) = S^2(\text{extracto})$

Ha:  $S^2(\text{HNO}_3 \text{ 2\%}) \neq S^2(\text{extracto})$

Tabla 3. Resultados de la prueba de F para las pendientes tomando como referencia la curva de  $\text{HNO}_3 \text{ 2\%}$ .

Variable: pendiente	F	P(F<=f) una cola	Valor crítico para F (una cola)	Hipótesis aceptada
E1	7.45	0.118	19	Ho
E2	1.53	0.394	19	Ho
E3	6.35	0.135	19	Ho
E4	0.13	0.118	0.052	Ha
E5	2.90	0.255	19	Ho

Tabla 4. Resultados de la prueba de F para las ordenadas tomando como referencia la curva de  $\text{HNO}_3 \text{ 2\%}$ .

Variable: ordenada	F	P(F<=f) una cola	Valor crítico para F (una cola)	Hipótesis aceptada
E1	0.0036	0.00367	0.05263	Ho
E2	0.0396	0.03818	0.05263	Ho
E3	33.187	0.02925	19	Ha
E4	0.0323	0.03151	0.05218	Ho
E5	109.34	0.00906	19	Ha

En la Tabla 5 se presenta la prueba de t para conocer las diferencias.

Tabla 5. Prueba de t para conocer si las pendientes son diferentes o iguales, extractos vs  $\text{HNO}_3 \text{ 2\%}$ .

Extracto	$t_{cal}$	p	Hipótesis aceptada
E1	-1.5080	0.2060	Ha
E2	1.8657	0.1355	Ha
E3	4.0381	0.0156	Ho
E4	1.6037	0.1840	Ha
E5	2.9970	0.0400	Ho

En la Tabla 6 se presentan los resultados de t para las ordenadas al origen, frente a la ordenada obtenida con la curva de  $\text{HNO}_3 \text{ 2\%}$ .

Tabla 6. t para las ordenadas de cada extracto vs  $\text{HNO}_3 \text{ 2\%}$

Extracto	$t_{cal}$	p	Hipótesis aceptada
E1	-0.9684	0.3876	Ha
E2	-4.3577	0.01208	Ho
E3	-12.7827	0.00606	Ho

Extracto	$t_{cal}$	p	Hipótesis aceptada
E4	-1.2268	0.2744	Ha
E5	-7.0597	0.0194	Ho

En la Tabla 7 se resumen los resultados de límite de detección y de límite cuantificación obtenidos.

Tabla 7. Límite de detección y cuantificación de Mn

Extracto	Extracto	LD ( $\text{mgL}^{-1}$ )	LC ( $\text{mgL}^{-1}$ )
$\text{MgCl}_2$	E1	0.007	0.022
NaAC	E2	0.015	0.044
$\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$	E3	0.176	0.532
$\text{H}_2\text{O}_2+\text{HNO}_3+\text{NH}_4\text{Ac}$	E4	0.031	0.095
$\text{HNO}_3:\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$	E5	0.017	0.050

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en una simulación por Monte Carlo (MC) considerando un tamaño de muestra de 1000000 de repeticiones.

Tabla 8. Resultados por Monte Carlo.

Extracto	Ordenada promedio	DE ordenada	Mediana ordenada
E1	0.02	0.11	0.008
E2	0.040	0.120	0.026
E3	0.035	0.110	0.022
E4	0.038	0.11	0.024
E5	0.028	0.1	0.016
$\text{HNO}_3 \text{ 2\%}$	0.02	0.11	0.0082

En la Figura 1 se muestra un ejemplo de los análisis realizados por Monte Carlo con el software *Uncertainty Machine* del NIST [5] para conocer el comportamiento de la distribución de salida de la ordenada, pendiente y resultados de muestras.

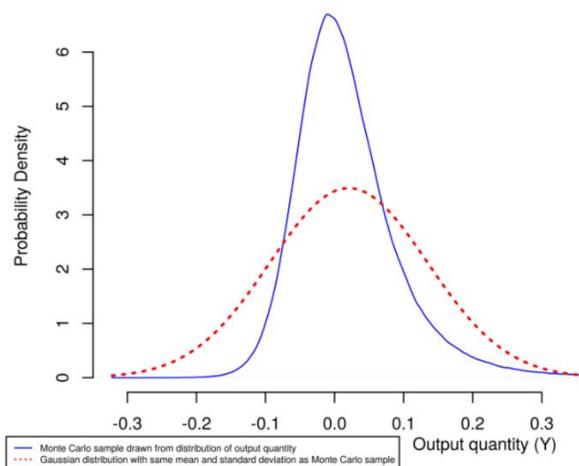
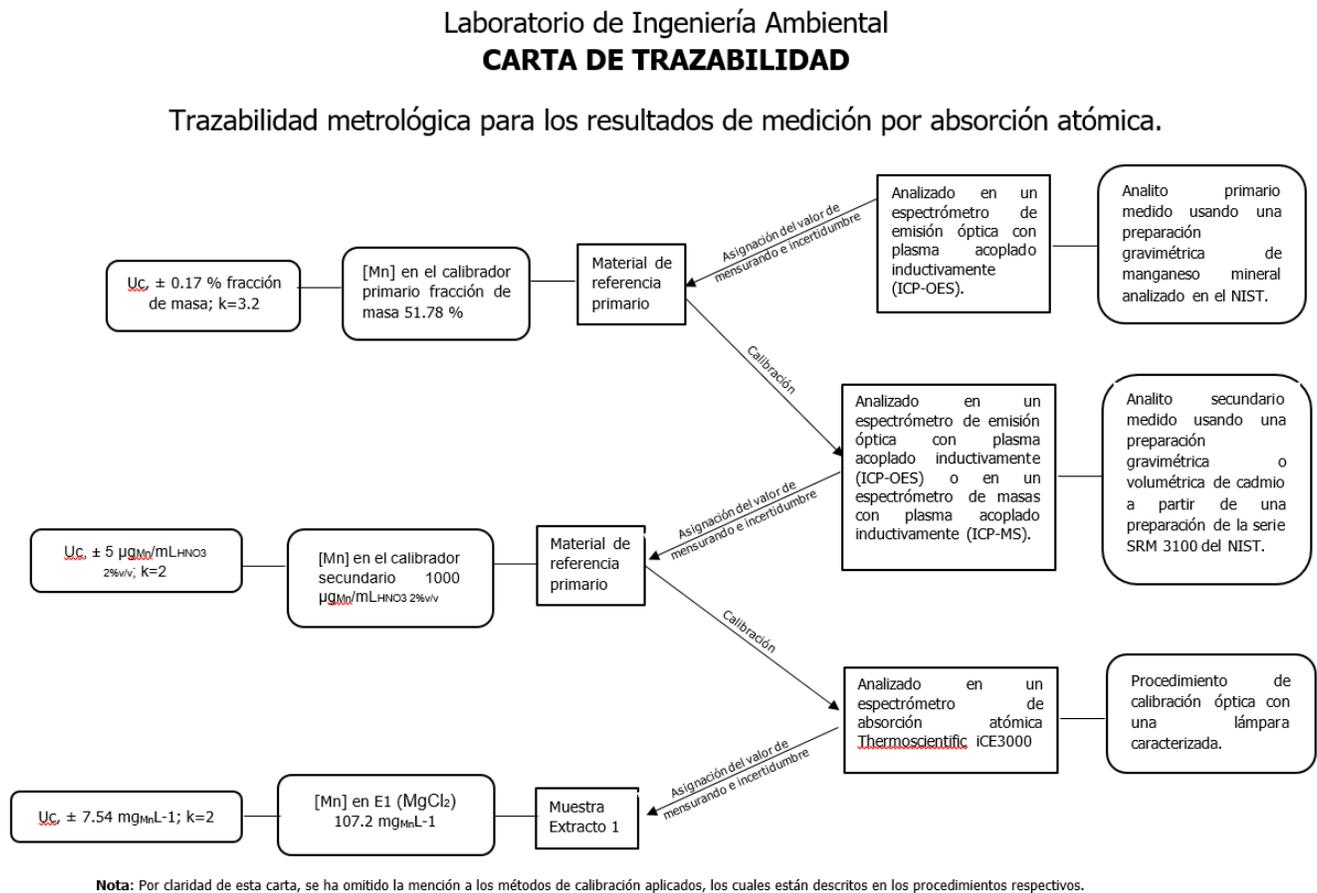


Figura 1. Distribución de salida por propagación de incertidumbre por series de Taylor (línea punteada roja) vs Monte Carlo (línea continua azul), para la ordenada

al origen del extracto de  $MgCl_2$ . Obtenida con el software *Uncertainty Machine* del NIST.

presenta como ejemplo la carta de trazabilidad obtenida para una de las muestras.

Se obtienen los valores de pendiente y ordenada al origen con los valores de absorbancia. En la figura 2 se



**Figura 2.** Ejemplo de la carta de trazabilidad para los valores de concentración obtenidos con la curva de calibración del extracto de  $MgCl_2$ .

#### 4. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados que se muestran en la Tabla 3, se observa que, la matriz genera una varianza de la pendiente estadísticamente diferente para el extracto 4, E4 ( $H_2O_2:HNO_3:NH_4Ac$ ).

Para el caso de la ordenada, los extractos 3 y 5 ( $NH_2OH.HCl$  y  $HNO_3:HCl:H_2O$ ) tienen una varianza de la ordenada estadísticamente diferentes a los extractos 1, 2 y 4.

Por otro lado, en la Tabla 5, se analizó con una prueba t para conocer la similitud entre las pendientes de cada extracto con respecto a la de  $HNO_3$  2%. Que, como se observa, solo los extractos 3 y 5 serían comparables con el ácido nítrico, mientras que el resto de los extractos no lo son.

Con respecto a los resultados de la Tabla 6, lo que podemos determinar es que, para los extractos 2, 3 y 5 se obtiene un LD estadísticamente igual a la curva de  $HNO_3$  2%, mientras que los extractos 1 y 4 muestran una diferencia significativa, que se corrobora con la Tabla 7.

Es importante aclarar que los extractos 3 y 5 se hicieron con la ecuación para heterocedásticos y los extractos 1, 2 y 4 como homocedásticos.

Se hizo un análisis estadístico sobre el comportamiento del analito en esta matriz y también la comparación entre métodos de estimación de incertidumbre, lo cual, fue relevante para el tipo de fenómeno que se estudió dado que se pudo observar que tiene una distribución de salida diferente a la normal, lo cual da una probabilidad de cobertura distinta entre series de Taylor y Monte Carlo. En este caso, es importante acotar que

---

se realizó por simulaciones con la finalidad de determinar si con gran número de muestras se podría tener conmutabilidad y LD estadísticamente iguales para todos los extractos, dado que, experimentalmente eso no sería posible.

Finalmente, los resultados de la ordenada analizados por Monte Carlo, están en el mismo orden de magnitud, aludiendo a un LD estadísticamente igual al HNO<sub>3</sub> 2%, esto, como se puede ver en la Figura 1, genera distribuciones de salida significativamente diferentes.

## 5. CONCLUSIONES

Las muestras problema obtenidas por la extracción con los extractos 3 y 5 (NH<sub>2</sub>OH.HCl y HNO<sub>3</sub>:HCl:H<sub>2</sub>O) tienen ordenadas y pendientes estadísticamente iguales a la de la curva de HNO<sub>3</sub> 2%, por lo que sí es recomendable que se analicen con la curva de rutina para disminuir tiempos de análisis.

Las muestras problema obtenidas por la extracción con los extractos 1, 2 y 4 (MgCl<sub>2</sub>, NaAc y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:HNO<sub>3</sub>:NH<sub>4</sub>Ac) deben ser analizadas con una curva preparada con su propia matriz, debido a que las pendientes y la ordenada al origen son diferentes a las de la curva de rutina, HNO<sub>3</sub> 2%.

Adicionalmente, la varianza de la curva del E4 resulta en un aumento en la incertidumbre al valor final que se reporta y la curva del E2 tiene una ordenada que demuestra un contenido de interferencia química basal que debe ser considerada al momento de obtener los resultados finales de concentración.

Con el análisis de Monte Carlo se evidencia que en fenómenos como el que hemos descrito, la distribución de salida es diferente a una normal y que hay una limitante si se estima la incertidumbre solo con series de Taylor y por tanto, la necesidad de hacer estimaciones de incertidumbre complementarias, por ejemplo, con Monte Carlo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Daniel de los Cobos Vasconcelos, el Ing. Roberto Sotero Briones Méndez y la Q.F.B. Emilia Soledad Lucario.

El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM, que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015. No. De Certificado CMX C SGC 209 2020, válido en el período del 12 de noviembre de 2020 al 11 de noviembre de 2023.

En este tiempo en el que, como humanidad hemos estado a prueba, reconocemos el trabajo colaborativo de cada una de las personas que con su saber y disposición nos han permitido seguir adelante.

## REFERENCIAS

1. Roé, A. (2015). Degradación de películas de polietileno oxo-biodegradables sometidas a Termo-oxidación y composteo. [Tesis para optar por el grado de Doctor en Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México].
2. NMX-AA-115-SCFI-2015 Análisis de agua-criterios generales para el control de la calidad de resultados analíticos.
3. Spiegel, M. R. (2020). Schaum's Estadística. [VitalSource Bookshelf]. Retrieved from. <https://bookshelf.vitalsource.com/#/books/9781456281878>
4. González, M. M. T., & Pérez, D. V. A. (2009). Estadística aplicada una visión instrumental. ProQuest Ebook Central <https://ebookcentral.proquest.com>
5. Software Uncertainty Machine NIST, <https://uncertainty.nist.gov/>