



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

**“VALIDACIÓN DE ACEITES Y GRASAS EN
AGUAS RESIDUALES”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

PRESENTA

Ana Gabriela Mendoza López

CD. OBREGÓN, SONORA

DICIEMBRE DE 2004

VALIDACIÓN DE GRASAS Y ACEITES EN AGUAS RESIDUALES

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Aguas de la dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora, durante el período de Julio a Septiembre del 2004 y fue asesorado por M.C. Raúl Holguín Soto.

ÍNDICE

	Páginas
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
 I. INTRODUCCIÓN.....	 1
1.1 Justificación.....	2
1.2 Planteamiento del problema.....	3
1.3 Objetivo.....	3
1.4 Limitaciones del estudio.....	3
 II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	 5
2.1 Método normalizado para la determinación de grasas y aceites....	5
2.2 Validación de métodos analíticos.....	7
2.3 Principio de la validación.....	9
2.4 Etapas de la validación.....	9
2.4.1 Verificación.....	9
2.4.2 Material de referencia.....	10
2.5 Protocolo para la validación de grasas y aceites.....	11
2.6 Incertidumbre en la determinación de grasas y aceites.....	15
2.6.1 Estrategia propuesta por la ISO (aproximación “bottom-up”).	15
2.6.1.1 Especificación.....	16
2.6.1.2 Identificación.....	17
2.6.1.3 Cuantificación.....	17
2.6.1.4 Combinación.....	18
2.6.2 Fuentes de incertidumbre en el método de Soxhlet.....	21

III. MÉTODO Y MATERIALES.....	23
3.1 Verificación del equipo de medición.....	23
3.2 Evaluación del material de referencia.....	24
3.3 Procedimiento para el método de Soxhlet.....	25
3.4 Material.....	28
3.5 Reactivos.....	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIÓN.....	45
GLOSARIO.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1 Parámetros del agua residual de entrada.....	34
2 Parámetros del agua residual de salida.....	35
3 Grasas y aceites de los blancos.....	35
4 Contenido de grasas y aceites de las muestras de agua residual....	37
5 Datos finales de las grasas y aceites de las muestras de agua residual menos el blanco de reactivo.....	37
6 Grasas y aceites del agua residual más aceite de referencia.....	38
7 Contenido final de grasas y aceites de las muestras con aceite de referencia.....	39
8 Comparación de los resultados de las muestras con y sin aceite de referencia.....	40
9 Porcentaje de recuperación de grasas y aceites.....	41
10 Prueba de t de Student.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Etapas a seguir para el cálculo de la incertidumbre según el método de ISO.....	16
2 Incertidumbre de los resultados utilizando la incertidumbre de la verificación de la trazabilidad.....	19
3 Componentes de incertidumbre de la estrategia basada en utilizar la información generada durante la verificación de la trazabilidad.....	20
4 Balanza analítica SARTORIUS.....	30
5 Patrón de pesas RICE LAKE.....	31
6 Verificación de pesas de 50 gramos.....	32
7 Verificación de pesas de 20 gramos.....	32
8 Aceite de referencia.....	33
9 Peso promedio de una gota de aceite de referencia.....	34

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis de Aguas de la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora en Ciudad Obregón, Sonora. Durante el tiempo comprendido de Julio a Septiembre del año 2004, con el objetivo de validar el método de Soxhlet para aceites y grasas en aguas residuales bajo los parámetros de la norma NMX-AA-005-SCFI-2000.

Para la validación de este método se utilizó el equipo de Soxhlet, balanza analítica y termómetros calibrados, equipo millipore, cartuchos para extracción, estufa. El principal reactivo utilizado fue el hexano como disolvente de grasas y la solución de tierra diatomeas utilizadas como un receptor donde de las grasas y aceites. La muestra a analizar fue de agua residual, además, se empleó aceite de oliva extra virgen como material de referencia.

En la extracción de las grasas y aceites se usaron las mismas cantidades de muestras y de reactivos. Durante la preparación de las muestras, a cinco de ellas se les adicionó una gota del material de referencia, el cual fue medido previamente

para conocer su peso, y como resultado se obtuvo que un agota del aceite de referencia pesa en promedio 21.6 mg, y las cinco muestras restantes solamente se manejaron con agua residual. Con esta metodología se determinó la precisión y exactitud del método, al igual que el porcentaje de recuperación.

Los resultados de la extracción muestran que se recupera del 97.6655 al 98.202 por ciento, con ello se demuestra la validez del método de Soxhlet, ya que el porcentaje de error entre las muestras no debe ser mayor al cinco por ciento. La exactitud quedó demostrada con la prueba estadística de t de Student, debido a que el método si detecta las cantidades adicionadas de aceite de referencia, con un intervalo de confianza del 99.5 por ciento.

Para la correcta validación se tomaron en cuenta las distintas incertidumbres que se presentaron durante la metodología usada. Reduciendo al máximo cada una de ellas para evitar alteraciones en los resultados. Para ello se empleó una formulación, la cual involucra las incertidumbres generadas por el procedimiento, la trazabilidad de los resultados y el pretratamiento.

Y como resultado se obtuvo un valor de incertidumbre igual a dos. Lo cual indica que el método se encuentra dentro del límite permitido de incertidumbre. Y por lo tanto se tiene que los resultados arrojados por este método son trazables, confiables y reproducibles.

I. INTRODUCCIÓN

La validación de métodos analíticos es uno de los puntos clave en el aseguramiento de la calidad en los laboratorios de análisis. La validación de métodos permite al cliente confiar en los resultados y asegurar su reproducibilidad con resultados de otros laboratorios.

Para ello es necesario proporcionar un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados, además, contar con un conocimiento profundo de las características de comportamiento del método a estudiar.

La validación de métodos analíticos también se aplica en otras áreas relacionadas a la calidad de los resultados obtenidos como son: estabilidad, limpieza de equipos, materia prima, entre otras.

Se puede hacer mención que dentro de las normas ISO (Organización de Estandarización Internacional) la validación de los métodos analíticos, es ya un

requisito que forma parte de ella y que deben cumplir los laboratorios que deseen ser acreditados por dicha norma.

Es por ello que la validación del método de Soxhlet es importante, ya que es un método frecuentemente utilizado en los laboratorios de análisis de aguas para la determinación de grasas y aceites, debido a que la norma NOM-001-ECOL-1996 y NOM-002-ECOL-1996 lo piden como requisito para sus descargas, por lo tanto los resultados deben ser totalmente confiables y seguros.

1.1 Justificación

Se sabe que un método analítico es una secuencia de actividades, recursos de materiales y parámetros que llevan un orden y se tienen que cumplir, con la finalidad de llevar a cabo el análisis de un componente específico de una muestra determinada. Y el componente específico a medir en un análisis es llamado analito.

Por consiguiente, se tiene que un método analítico es el encargado de medir y determinar un componente específico en una muestra, éste debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido.

La importancia de la validación en métodos analíticos radica en proporcionar la seguridad, confianza y reproducibilidad de los resultados. Siendo ésta muy importante para mantener una alta calidad en el control de laboratorio. Ya que en la actualidad, la validación de los métodos analíticos está siendo implementada como requisito básico en los laboratorios que deseen tener una mayor calidad y prestigio en sus resultados. Además, es un procedimiento importante que se debe cumplir dentro de las normas ISO para asegurar la veracidad de los resultados, para de esta manera contar con métodos analíticos que estén certificados bajo normas internacionales.

En este caso lo que se pretende validar es el método de Soxhlet para grasas y aceites en aguas residuales. Debido a que este método es el recomendado por la norma NMX-AA-005-SCFI-2000, es por ello que su validación representaría un aseguramiento en la calidad de sus resultados.

Con la validación de este método se obtendrán diversos beneficios, tanto para la institución que poseen este método, que en este caso es el Instituto Tecnológico de Sonora, donde los análisis se llevan a cabo en el Laboratorio de Análisis de Aguas, así como para los clientes o usuarios del método. Ya que al contar con los documentos necesarios que comprueban la validación del método, esto proporciona seguridad, confianza y sobre todo calidad en los resultados de los análisis, además de proporcionar prestigio al Laboratorio.

1.2 Planteamiento del problema

Para la acreditación con la norma ISO 17025 y dar cumplimiento en el punto 5.4, es necesario validar el método de Soxhlet para la determinación de grasas y aceites en aguas residuales, cumpliendo con los criterios establecidos por la norma NMX-AA-005-SCFI-2000, para que este análisis sea reconocido por la CNA y auditado por una Entidad mexicana de acreditación).

1.3 Objetivo

Validar el método de Soxhlet para grasas y aceites en aguas residuales bajo los parámetros de la norma NMX-AA-005-SCFI-2000, para proporcionar la seguridad, confianza y reproducibilidad de los resultados.

1.4 Limitaciones del estudio

Para la realización de la investigación no se presentó ninguna limitación, ya que se contó con todo el equipo y material que indica la norma NMX-AA-005-SCFI-2000

como son: equipo de extracción Soxhlet, bomba de vacío, estufa eléctrica capaz de mantener 103°C, estufa eléctrica capaz de mantener 80°C, balanza analítica con precisión de 0,1 mg, y equipo de filtración a vacío. En cuanto a los materiales: Cartuchos de extracción de celulosa para Soxhlet, papel filtro con tamaño de poro fino, embudo Büchner y desecador.

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Método normalizado para la determinación de grasas y aceites del agua residual

El agua es uno de los recursos naturales más abundante y fundamentales de la naturaleza, es por ello que su calidad es de vital importancia.

Las aguas residuales constituyen un importante foco de contaminación de los sistemas acuáticos. Se trata de aguas con un alto contenido en elementos contaminantes, que a su vez van a contaminar aquellos sistemas en los que son depositadas. Siendo necesarios los sistemas de depuración antes de evacuarlas, como medida importante para la conservación de dichos sistemas. (<http://html.rincondelvago.com/aguas-residuales.html>).

Las aguas residuales son aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, agrícolas, pecuarias, domésticos y similares, así como la mezcla de ellas (NMX-AA-005-SCFI-2000).

Uno de los contaminantes habituales en las aguas residuales son las grasas y aceites. Estos son todas aquellas sustancias de naturaleza lipídica, altamente estables, proceden de desperdicios alimentarios en su mayoría, que al ser inmiscibles con el agua, van a permanecer en la superficie dando lugar a la aparición de natas y espumas (<http://html.rincondelvago.com/aguas-residuales.html>).

Con la determinación de grasas y aceites, y según los resultados arrojados es un parámetro indicativo del grado de contaminación del agua por usos industriales y humanos.

Otra definición más de grasas y aceites que se puede citar es la que aparece en la norma NMX-AA-005-SCFI-2000, la cual las define de la siguiente manera: “Los compuestos orgánicos constituidos principalmente por ácidos grasos de origen animal y vegetal, así como de hidrocarburos del petróleo que son extraídos de la muestra utilizando hexano como disolvente”.

En dicha norma se especifica que el método de Soxhlet es el oficial para la determinación de grasas y aceites en aguas de tipo residual.

Este método se basa en la adsorción de grasas y aceites en tierra de diatomeas, los cuales son extraídos en un Soxhlet empleando hexano como disolvente. Una vez terminada la extracción se evapora el hexano y se pesa el residuo que ha quedado en el recipiente; siendo este valor el contenido de grasas y aceites (NMX-AA-005-SCFI-2000).

Este método permite una estimación del contenido de grasas y aceites en aguas naturales, residuales y residuales tratadas al determinar gravimétricamente las sustancias que son extraídas con hexano de una muestra acuosa acidificada (NMX-AA-005-SCFI-2000).

En la determinación de grasas y aceites no se mide una sustancia específica sino un grupo de sustancias con unas mismas características fisicoquímicas (solubilidad). Entonces la determinación de grasas y aceites incluye ácidos grasos, jabones, grasas, ceras, hidrocarburos, aceites y cualquier otra sustancia susceptible de ser extraída con hexano (NMX-AA-005-SCFI-2000).

2.2 Validación de métodos analíticos

Para obtener resultados confiables en la determinación de grasas y aceites de aguas residuales, es necesario contar con un método que se encuentre validado bajo ciertas normas de calidad, con la finalidad de obtener datos confiables y reproducibles.

De acuerdo con ISO validación se define como: *"Confirmación mediante examen y provisión de evidencias objetivas que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico determinado"* (ISO 8402).

La norma ISO / IEC 17025 incorporó requisitos técnicos más exigentes al sistema de la calidad de los laboratorios de ensayo que aspiran o están acreditados por dicha norma. En esta se expresa la necesidad de cumplir requisitos técnicos como validación, control interno de la calidad y la determinación de la incertidumbre de los ensayos.

La validación de métodos analíticos, puede ser el primero de los requisitos a implementar, con una extensión limitada a los estudios de la precisión del método, considerando que la mayoría de los laboratorios en fase de acreditación, utilizan métodos descritos en normas nacionales o internacionales. Por lo que las principales variaciones de sus resultados se relacionan, con las características propias de cada laboratorio vinculadas a la precisión. Los indicadores de la validación, relacionados con la evaluación de la precisión, miden la variabilidad de los resultados que se expresa como desviación estándar, con aplicación en el control interno y en la

determinación de la incertidumbre de los métodos cuantitativos (Sardiñas y Hernández, 2002).

La precisión es un parámetro a comprobar durante la validación de los métodos cuantitativos, se puede expresar como repetibilidad y precisión en condiciones intermedias, no incluimos la reproducibilidad por referirnos solo a la validación que realiza un laboratorio individual (USP- 24, 2000).

La precisión se expresa como desviación estándar (s) y se puede utilizar de 2 formas: La primera como coeficiente de variación (CV), con mayor aplicación en la comparación de resultados de diferentes métodos que pueden inclusive presentar unidades de medidas diferentes, de esta manera queda caracterizada la precisión de cada método analítico (Díaz y Col.,1998).

La segunda aplicación de la s es como expresión del rango crítico (r_c), donde $r_c =$ factor tabulado $\times s$, este presenta la ventaja sobre el CV por su uso práctico en el control interno, siendo más sencillo el análisis de las réplicas de la muestra, pues no necesita cálculos estadísticos (Díaz y Col.,1998).

La guía ISO 3534-1, define incertidumbre como “una estimación unida al resultado de un ensayo que caracteriza el intervalo de valores dentro de los cuales se afirma que está el valor verdadero” (ISO, 1993).

Esta definición tiene poca aplicación práctica ya que el “valor verdadero” no puede conocerse. Esto ha hecho que el Vocabulario de Metrología Internacional, VIM, evite el término “valor verdadero” en su nueva definición y defina la incertidumbre como “un parámetro, asociado al resultado de una medida, que caracteriza el intervalo de valores que puede ser razonablemente atribuidos al mensurando”. En esta definición el mensurando indica: “La propiedad sujeta a medida” (BIPM 1993).

El concepto de incertidumbre refleja, pues, duda acerca de la veracidad del resultado obtenido una vez que se han evaluado todas las posibles fuentes de error y que se han aplicado las correcciones oportunas. Por tanto, la incertidumbre nos da una idea de la calidad del resultado ya que nos muestra un intervalo alrededor del valor estimado dentro del cual se encuentra el valor considerado verdadero (BIPM 1993).

2.3 Principio de la validación

Según OAA establece que la validación de un procedimiento consiste en tres pasos.

1. Establecimientos de las condiciones por cumplir (*por ejemplo*: límite de detección < 1 mg/l, intervalo lineal mayor a 2 órdenes de magnitud, incertidumbre de los resultados <20% en todo el intervalo de trabajo, para el caso de la validación de un método analítico general. No puede establecerse como principio de validación para otros tipos de métodos de ensayo).
2. Determinación de los parámetros estadísticos del procedimiento.
3. Valoración de los resultados de la validación por comparación de los parámetros estadísticos obtenidos con las condiciones y decisión sobre la validez del procedimiento para el propósito establecido (OAA, 2003).

2.4 Etapas de la validación

Para lograr la validación de un método analítico es necesario cumplir con ciertas etapas que se deben seguir, estas etapas son: la verificación del equipo de medición, la elección de un material de referencia para la verificación del método analítico.

2.4.1 Verificación

Según VIM (Vocabulario de Metrología), verificación es la confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados.

La importancia de la verificación radica en que ciertos factores como los cambios de temperatura y estrés mecánico que sufren los equipos, hacen que sus funciones con el paso del tiempo se deterioren. Cuando esto sucede, los ensayos y las mediciones empiezan a perder confiabilidad.

Una correcta verificación del equipo a utilizar, permite obtener un servicio de alta calidad que reúne las especificaciones requeridas. Las razones para verificar los equipos son:

- Mantener el buen funcionamiento de los equipos
- Responder a los requisitos establecidos en las normas de calidad
- Garantizar la confiabilidad y trazabilidad de los resultados.

2.4.2 Material de referencia

El material de referencia hace posible la transferencia de los valores de las magnitudes asignadas o medidas (física, química, biológica o tecnológicamente), entre un lugar y otro. Son ampliamente utilizados para la calibración de los instrumentos de medición, para la evaluación o verificación de los métodos de ensayo ó análisis, para el aseguramiento de la calidad de las mediciones y en caso de ciertos materiales de referencia biológicos o tecnológicos facilitar que las propiedades sean expresadas convenientemente en unidades arbitrarias (ISO 34, 1996).

Todas las clases de materiales de referencia juegan un papel muy importante en todas las actividades de normalización nacional e internacional, en los ensayos de aptitud y en la acreditación de laboratorios (ISO 32, 1997).

Un **material de referencia** es un material o sustancia, en el cual, uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien establecidos para ser usados en la calibración de un aparato, la evaluación de un método de medición, o

para asignar un valor a un material. Puede ser una sustancia pura o mezclada, y puede estar en forma de gas, líquido o sólido (ISO 30, 1992).

2.5 Protocolo para la validación de grasas y aceites

Para la realización de estos análisis, se utilizó como muestra agua residual proveniente de una planta industrial ubicada en el Parque Industrial de Ciudad Obregón, Sonora. El muestreo se llevó a cabo el día 17 de agosto del año 2004. Para la realización de la toma de muestra se empleó una hielera, siete frascos de vidrio boca ancha con capacidad aproximada de un litro, una cubeta y cuerda.

Se recolectaron tres muestras de salida, tres muestras de entrada y un blanco de muestra, tomando de éstas una de entrada y una de salida como respaldo. En este paso es necesario tomar ciertos parámetros como son la temperatura, pH, ya que estos son las mediciones obligatorias que marca la norma NMX-AA-005-SCFI-2000.

Una vez realizadas las pertinentes mediciones las muestras se acidificaron con 1 ml de ácido sulfúrico concentrado o hasta obtener un pH menor de 2 como está indicado en la norma NMX-AA-005-SCFI-2000. Una vez acidificadas las muestras fueron puestas en refrigeración a una temperatura de 4°C, todo esto con la finalidad de conservar la muestra en óptimas condiciones.

Previo a la toma de muestra, la balanza que a utilizar para esta determinación es verificada de la siguiente manera:

1. Limpiar la balanza
2. Conectar y encender la balanza
3. Ajustar su burbuja a la mirilla
4. Tararla si es necesario
5. Verificarla con el patrón de pesas calibradas

Se limpia todo el material de vidrio a utilizar (pipetas, probetas, frascos de vidrio boca ancha de 100 ml, matraces bola de fondo plano, equipo de Soxhlet), se sumergen en solución con agua y jabón para eliminar suciedad y grasas por un tiempo de 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo el material se lava perfectamente con agua de la llave y se enjuaga con agua destilada y se pone a secar en la estufa a una temperatura de 104°C por 1 hora. El material ya seco se coloca a un desecador para que alcancen una temperatura ambiente.

Una vez que el material este frío es lavado con hexano para eliminar rastros de posibles grasas que hubieran quedado adheridos al material. Nuevamente éste es puesto en la estufa a la misma temperatura y tiempo antes indicado.

Por último, es enfriado en el desecador, y los matraces son puestos a peso constante.

Las muestras de entrada que se tomaron fueron descartadas debido a que la filtración de éstas es demasiado lenta, por lo que retrasa la realización de los análisis. Por lo tanto solamente se trabajó con las muestras de salida. Lo que no afecta a la investigación, ya que el agua residual proveniente de la salida es la que se descarga directamente al drenaje y es la que debe cumplir los parámetros indicados en la norma oficial mexicana NOM-002-ECOL-1996.

Con ayuda de la probeta se miden 50 ml de agua destilada y se agregan a los frascos de 100 ml marcándolos con una señal la cantidad medida.

Tomando directamente del recipiente donde se encuentra la muestra de salida, se traspasa el agua residual a 14 de los frascos hasta la marca. Esto se hace con la finalidad de evitar pérdidas de muestra, ya que pudieran quedar adherida a las paredes de la probeta ciertas cantidades de grasas y aceites del agua residual, lo que representaría una pérdida en la determinación de éstas.

Una vez llenos los frascos, a siete de ellos se les agrega una gota de aceite de referencia, donde el peso de dicha gota oscila alrededor de 21.6 mg. Cada frasco es marcado para identificar su contenido.

Para el desarrollo correcto del análisis es necesario hacer un blanco de agua de la llave y otro de agua destilada. Para el primero se toman 50 ml directamente de la llave y se coloca en uno de los frascos marcados, para el segundo caso se toman 50 ml de los garrafones de agua destilada.

Ya preparadas todas las muestras se procede a armar el equipo millipore de filtración, para ello se utiliza un papel filtro No. 42, el equipo se coloca en un matraz Kitazato y se le aplica vacío.

Se vierten 50 ml de tierra diatomeas en el equipo de filtración hasta obtener un colchón de tierra diatomea sobre el papel filtrante (la utilización de tierra diatomeas es con la finalidad de adsorber las partículas de grasa de la muestra), acto seguido, se filtra la muestra sobre el colchón de tierras diatomeas. Ya filtrada la muestra con ayuda de unas pinzas se retira el papel filtro, y los restos de muestra que hayan quedado en el embudo son puestos sobre el papel filtro para evitar pérdidas.

El filtro es doblado con unas pinzas y utilizando guantes de látex para no tocar directamente con la mano la muestra y contaminarla. Ya doblado el papel filtro se coloca dentro de un cartucho de extracción previamente marcado con la muestra correspondiente, y finalmente se coloca un tapón de algodón.

Cada vez que se filtre una muestra diferente, el equipo millipore se lava perfectamente. Ya filtradas todas las muestras y dentro de los cartuchos de extracción correctamente marcados, los cartuchos se ponen en la estufa por 1 hora a 85°C.

También es necesario hacer blanco de reactivo, este se hace colocando un filtro en el equipo millipore y se filtran 50 ml de tierra diatomeas, una vez filtrado se dobla el papel filtro con ayuda de unas pinzas y utilizando unos guantes de látex y es colocado en el cartucho de extracción y finalmente es tapado con un trozo de algodón. Por último el cartucho de extracción se pone a secar en la estufa por una hora a una temperatura de 85°C.

Durante este tiempo se arma el equipo de Soxhlet correctamente y se colocan los matraces que fueron puestos a peso constante. Se añaden 80 ml de hexano, que es el disolvente que indica la norma NMX-AA-005-SCFI-2000. Transcurrido la hora, los cartuchos se ponen en el equipo Soxhlet (evitar tocar directamente los cartuchos y los matraces, para ello utilizar guantes de látex y unas pinzas).

Ya armado el equipo de extracción, éste se enciende y se programa a una velocidad de 20 ciclos/hora durante un tiempo de 4 horas para controlar la temperatura de reflujo y extracción.

Transcurrido el tiempo de extracción, el hexano sobrante es retirado hasta que el matraz queda con la mínima cantidad del disolvente, y por último, se retiran los matraces del equipo Soxhlet y se colocan en la estufa a 104°C por 1 hora para evaporar el disolvente sobrante. Los matraces libre de hexano se colocan en el desecador hasta alcanzar temperatura ambiente.

Para finalizar, los matraces son pesados y se procede a realizar los cálculos matemáticos con la fórmula que da la norma NMX-AA-005-SCFI-2000 para determinar la concentración de grasas y aceites recuperables.

2.6 Incertidumbre en la determinación de grasas y aceites

La norma UNIT-ISO-IEC 17025, referente a los requerimientos generales que debe cumplir un laboratorio de calibración o ensayo para poder acreditar su competencia técnica, exige, en su punto 5.4.6 la estimación de la incertidumbre de la medición, a la vez que establece pautas para el rigor con el que se debería efectuar dicha estimación en función de la naturaleza del ensayo y los requerimientos del cliente (ISO/TAG4/WG3, 1992).

La **incertidumbre** es un “parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando”, según lo que establece textualmente la definición que figura en la norma COVENIN 2552:1999 (OIML V2:1993).

La norma ISO / IEC 17025 incorporó requisitos técnicos más exigentes al sistema de la calidad de los laboratorios de ensayo que aspiran o están acreditados por dicha norma. En esta se expresa la necesidad de cumplir requisitos técnicos como validación, control interno de la calidad y la determinación de la incertidumbre de los ensayos.

Además, se debe tener en cuenta los posibles vínculos entre los requisitos para su cumplimiento con el menor costo económico (Sardiñas y Hernández, 2002).

2.6.1 Estrategia propuesta por la ISO (aproximación “bottom-up”)

La estrategia para el cálculo de la incertidumbre propuesta por la ISO se aplicó inicialmente a las medidas físicas y, posteriormente, Eurachem la adaptó a las medidas químicas (Eurachem, 1995).

Esta aproximación se basa en identificar, cuantificar y combinar todas las fuentes de incertidumbre del procedimiento analítico.

La figura 1 muestra las cuatro etapas diferenciadas propuestas por la ISO para calcular la incertidumbre:

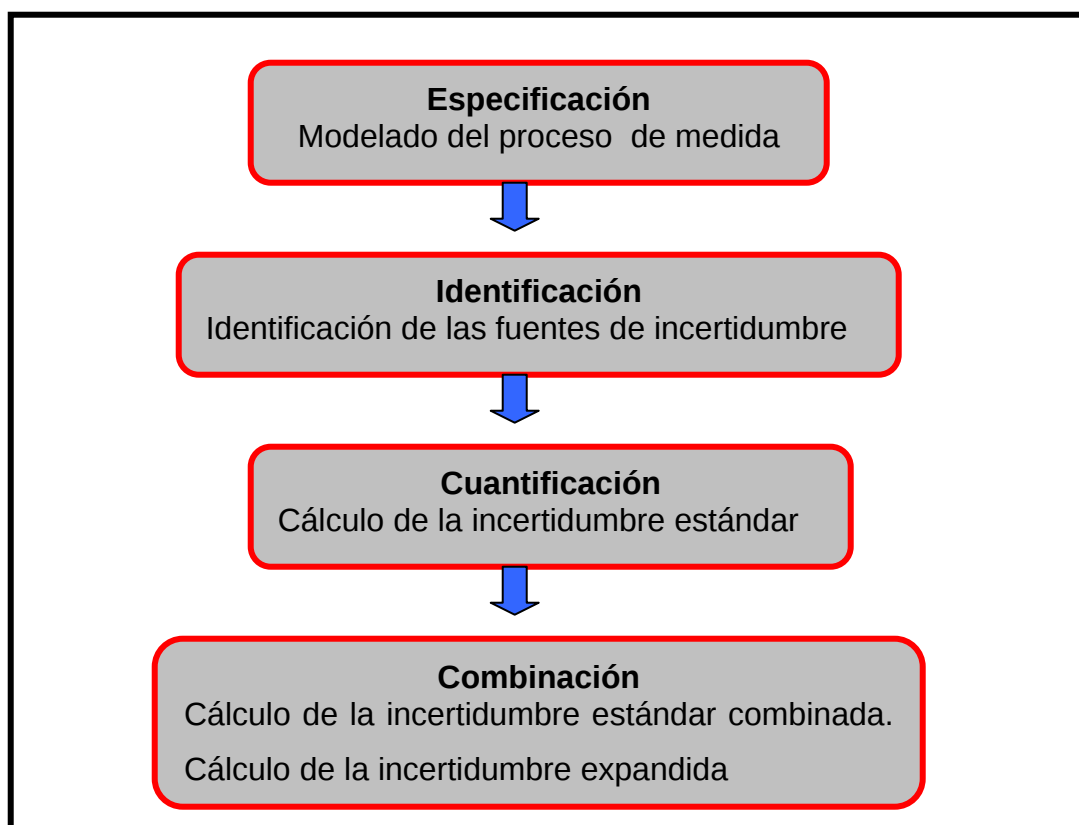


Figura 1. Etapas a seguir para el cálculo de la incertidumbre según el método de la ISO.

2.6.1.1 Especificación

En esta etapa debe modelarse el proceso de medida. Es decir, se establece cuál es la relación que hay entre el resultado analítico y los parámetros de los que depende. Por ejemplo, en el caso en el que se determine grasas y aceites por el método Soxhlet, esta relación vendría dada por:

$$G \text{ y } A \text{ (mg/l)} = (A - B) / V$$

donde:

A = es el peso final del matraz de extracción (mg);

B = es el peso inicial del matraz de extracción (mg), y

V = es el volumen de la muestra, en litros (Maroto 2001).

2.6.1.2 Identificación

Una vez modelado el proceso de medida, deben identificarse todas las fuentes de incertidumbre. Sin pretender ser exhaustivos, algunas de las fuentes de incertidumbre están asociadas a la heterogeneidad de la muestra, a la calibración de los instrumentos, a la pureza de los reactivos, a las condiciones ambientales y a los errores aleatorios cometidos por los analistas. En el caso de la determinación de grasas y aceites, la incertidumbre del volumen de hexano utilizado está asociada a la temperatura y al tiempo (Maroto 2001).

2.6.1.3 Cuantificación

En esta etapa deben cuantificarse todas las fuentes de incertidumbre identificadas en la etapa anterior. Hay dos formas de cuantificar las fuentes de incertidumbre:

- a) Experimentalmente, es decir, haciendo replicados en el laboratorio.
- b) Usando información disponible: certificados de calibración, tolerancias del material volumétrico, manuales de instrumentos, etc.

Es importante señalar que todas las componentes de incertidumbre deben expresarse como **incertidumbre estándar**. En el caso de que la incertidumbre se determine experimentalmente, la incertidumbre estándar se obtiene calculando la desviación estándar de los replicados. Si se utiliza información previa, la incertidumbre estándar se suele obtener dividiendo por $\sqrt{3}$ el intervalo proporcionado

por el fabricante (con lo que se asume que el intervalo de confianza sigue una distribución rectangular) (Maroto 2001).

2.6.1.4 Combinación

Una vez que se han calculado todas las fuentes de incertidumbre, éstas deben combinarse siguiendo la ley de propagación de errores. De esta forma, se obtiene una incertidumbre estándar combinada, u . El último paso, consiste en calcular la incertidumbre expandida, U . Para ello, debe multiplicarse la incertidumbre estándar por un factor de cobertura, k , ($U=k \cdot u$). Normalmente, k es igual a 2. De esta forma, se obtiene un intervalo donde existe aproximadamente un 95% de probabilidad de que se encuentre el valor verdadero (Maroto 2001).

Esta estrategia basada en utilizar la información obtenida en la validación del método calcula la incertidumbre utilizando la información generada en el proceso de verificación de la trazabilidad del método. Esta aproximación tiene la ventaja de que supone poco trabajo adicional, ya que no tiene sentido calcular la incertidumbre de un resultado obtenido al analizar una muestra de rutina si previamente no se ha verificado la trazabilidad del método analítico utilizado (Maroto 2001).

La figura 2 muestra que la trazabilidad del método debe verificarse con una muestra representativa. Es decir, debe ser una muestra que sea lo más parecida posible a las muestras de rutina que se analizarán con el método analítico. Sólo en el caso de que la muestra de referencia sea representativa, podremos asegurar la trazabilidad de los resultados obtenidos al analizar muestras de rutina (Riu, 2001).

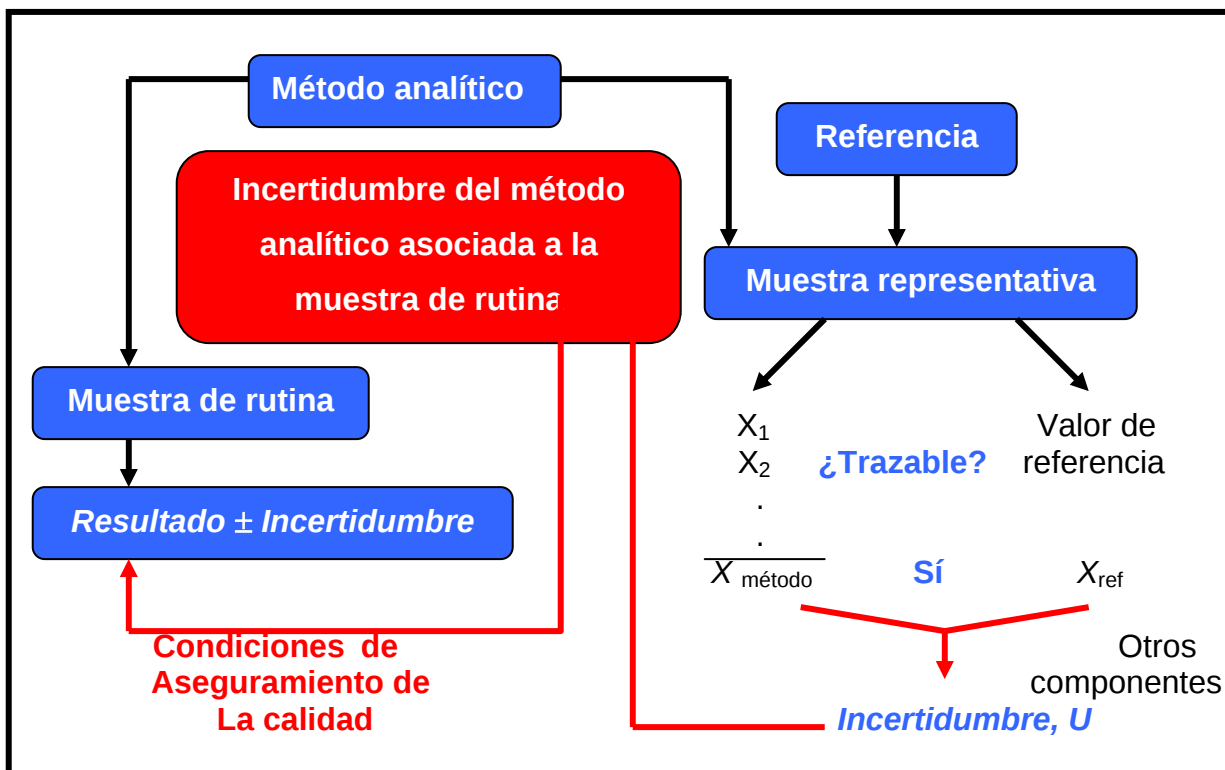


Figura 2. Incertidumbre de los resultados utilizando la información de la verificación de la trazabilidad.

Una vez que se ha verificado la trazabilidad, se puede calcular la incertidumbre de las muestras de rutina. Esta incertidumbre puede obtenerse a partir de la información obtenida al verificar la trazabilidad. Es importante resaltar que el laboratorio debe estar bajo **condiciones de aseguramiento de la calidad** para que, a lo largo del tiempo, el laboratorio pueda asegurar: 1) que sus resultados siguen siendo trazables; y 2) que sigue siendo válida la incertidumbre obtenida a partir de la información de la verificación de la trazabilidad (Riu, 2001).

La Figura 9 muestra la expresión para calcular la incertidumbre utilizando la información generada al verificar la trazabilidad. El primer término corresponde a la incertidumbre del procedimiento, **u procedimiento**, y considera la variabilidad experimental del método analítico. Se calcula a partir de la precisión intermedia del método analítico (Maroto, 1999).

El segundo término, ***u* trazabilidad**, corresponde a la incertidumbre asociada a afirmar que el método es trazable. Se calcula teniendo en cuenta la incertidumbre de la referencia y la precisión intermedia del método (Maroto, 1999).

El tercer término, ***u* pretratamiento**, considera la incertidumbre debida a la heterogeneidad de la muestra y a pretratamientos que no se hayan realizado al analizar la muestra utilizada para verificar la trazabilidad (Maroto, 1999).

Por último, el cuarto término, ***u* otros** términos, considera otros términos de incertidumbre como, por ejemplo, la incertidumbre asociada a la variabilidad de la matriz de las muestras de rutina. Tal y como muestra la figura 3, los dos primeros términos de la expresión se obtienen utilizando la información de la verificación de la trazabilidad mientras que los dos últimos deben calcularse posteriormente en el caso de que sea necesario (Maroto, 1999).

La incertidumbre final se obtiene combinando los cuatro términos de incertidumbre y multiplicando por el factor de cobertura, *k*. Al igual que en las otras aproximaciones, se suele utilizar un valor de *k*=2 ya que proporciona un intervalo que contiene al valor verdadero con aproximadamente el 95% de probabilidad (Maroto, 1999).

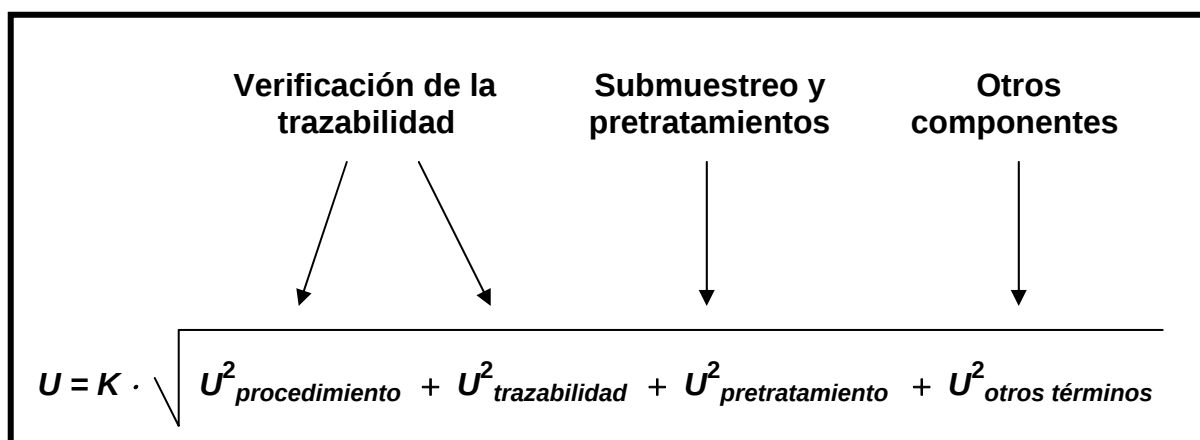


Figura 3. Componentes de incertidumbre de la estrategia basada en utilizar la información generada durante la verificación de la trazabilidad.

2.6.2 Fuentes de incertidumbre en el método de Soxhlet

La validación del método de Soxhlet para grasas y aceites comienza con identificar las incertidumbres que pueden ocasionar que la validación no sea correcta. Para esto es necesario tener control en el equipo, material, material de referencia, reactivos, personal, muestra, todo esto con la finalidad de eliminar la mayoría de las causas que provocan la incertidumbre. Ya que no se puede eliminar por completo.

Para eliminar la incertidumbre en el material se usa un reactivo (hexano) marca Merck, con el cual se elimina la presencia de suciedad adherida al material y se corre un blanco de reactivo (BR) el cual se prepara como se indica en la página 18, comparando los resultados para verificar la eliminación de la incertidumbre.

El personal que maneja este equipo debe portar bata y guantes, ya que jamás deberá hacer contacto directo con el equipo de Soxhlet, el papel filtro y los cartuchos de extracción. Preferentemente el mismo analista debe de realizar todas las operaciones necesarias para la validación del método. Ya que de ser varios analistas, cada uno provocaría una fuente de incertidumbre.

La manera adecuada para lograr una reducción en la incertidumbre en el momento de la preparación de las muestras, es que éstas son agitadas de tal manera no se genere un contacto con el agua residual y la tapadera del frasco donde se encuentra, esto con el propósito de evitar pérdidas de muestra, ya que partículas de grasas pueden quedar adheridas a la tapadera.

Además, es necesario tener sumo cuidado con el manejo de la temperatura, ya que esta debe encontrarse a un mínimo de 69°C, debido a que es la temperatura a la cual comienza la ebullición del solvente, el hexano. Con esta medida se evade una ebullición violenta del solvente y por lo tanto se evita pérdidas del mismo.

Otro factor a considerar durante la determinación de grasas y aceites es el tiempo, éste representa un papel muy importante, ya que el tiempo necesario para la correcta

y completa extracción de las grasas es de cuatro horas, indicado por la norma NMX-AA-005-SCFI-2000, de no cumplirse las cuatro horas estimadas representaría una incertidumbre muy alta, lo que nos daría resultados poco confiables.

Es importante tomar en cuenta la verificación y calibración del equipo, tal es el caso de la balanza analítica que se utilizó, donde esta fue verificada para obtener datos confiables y reproducibles y de esta manera eliminar esta posible fuente de incertidumbre.

En conjunto, todos estos factores son los que podrían causar o aumentar la incertidumbre, los cuales deben ser controlados y tener un perfecto conocimiento de éstos. De esta manea se logra una disminución considerable de la incertidumbre durante el proceso, arrojando resultados confiables.

III. METODOLOGÍA

3.1 Verificación del equipo de medición

En este caso el quipo de medición a utilizar es la balanza analítica SARTORIUS, y para la correcta verificación de la balanza analítica es necesario lo siguiente:

1. La balanza debe de verificarse en el lugar normal de su uso.
2. Debe de estar instalada en una mesa libre de vibraciones; encontrarse nivelada (revisar que el nivel de burbuja de la balanza este al centro de la mirilla).
3. Limpiarla y tener por lo menos media hora mínima de encendida.
4. No debe de haber corrientes de aire, ni que se estén realizando actividades que generen vibraciones fuertes.
5. La balanza debe de estar conectada a un regulador de voltaje, para protegerla de fluctuaciones. También es importante realizar algunas pesadas previas, para comprobar operación.
6. La temperatura del ambiente donde se localiza la balanza analítica debe de estar controlada en un rango de $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Una vez cumplidas con las indicaciones antes mencionadas, se procederá a realizar una serie de mediciones con un marco de pesas, las cuales deben estar certificadas, con trazabilidad al CENAM (Centro Nacional de Metrología).

La preparación del marco de pesas se lleva a cabo de la siguiente manera:

1. Las pesas deben de encontrarse limpias y secas, dentro de sus estuches.
2. Toda manipulación de las pesas debe de realizarse con pinzas o guantes, no debe de tomarse con las manos descubiertas ya que el contacto con la grasa de los dedos puede ocasionar alteraciones del peso nominal.
3. Las pesas se deben de lavar con extremo cuidado, evitando que se rayen o golpeen, utilizando una solución 1:1 de alcohol etílico y éter de petróleo. Para esto, se toman las pesas con pinzas y se agitan cada una dentro de la mezcla de solventes, cada pesa se deja secar en horno, a 50 °C, por 20 minutos, luego se colocan en un desecador para que se atemperen. No se deben de manipular pesas calientes en la balanza.
4. No permitir que las pesas sufran caídas, ya que las caídas deterioran la masa y afectan el valor para el cual fueron diseñados.
5. Las pesas deben de almacenarse en estuches y protegidas del polvo del medio.

3.2 Evaluación del material de referencia

Para la elección del material de referencia, se seleccionará el que más tenga semejanza con el tipo de sustancia que se deseen cuantificar, en este caso lo que se desea determinar son grasas y aceites, por lo tanto, el material de referencia debe ser de naturaleza lipídica, homogéneo y contar con un 100% grado de pureza.

En este caso el material de referencia a utilizar será aceite de oliva extra virgen. Una vez identificado el tipo de material de referencia se realizará una serie de mediciones

para cuantificarlo, ara así tener un parámetro de referencia. El procedimiento es el siguiente:

1. Con ayuda de una pipeta de 5 ml boca ancha se mide el aceite.
2. Se limpia con un papel absorbente el exceso de aceite que haya quedado alrededor de la pipeta, y en un vaso de precipitado se vierte aproximadamente los primeros dos mililitros de aceite hasta que éste salga un goteo uniforme.
3. En otro vaso de precipitado, el cual su peso es tarado en la balanza analítica (previamente verificada), en este vaso se vierte una gota del aceite de referencia y se anota su peso.
4. Realizar todos los pasos anteriores hasta obtener un mínimo de diez repeticiones, las cuales deben de contar con un rango de diferencia de ± 0.5 mg.

3.3 Procedimiento del método de Soxhlet

El procedimiento a utilizar es el siguiente, el cual se encuentra descrito en la norma NMX-AA-005-SCFI-2000:

1. Medir el pH de las muestras el cual debe ser menor de 2, si no tiene este valor acidifique con ácido clorhídrico 1:1 ó sulfúrico 1:1. (Se utilizó ácido sulfúrico concentrado).
2. Para muestras con un pH menor de 8 unidades generalmente es suficiente con adicionar 5 ml de ácido clorhídrico 1:1 ó 2 mL de ácido sulfúrico 1:1.
3. Preparar los matraces de extracción introduciéndolos a la estufa a una temperatura de 103°C - 105°C , enfriar en desecador y pesarlos, repetir el procedimiento hasta obtener el peso constante de cada uno de los matraces.
4. Preparar el material filtrante colocando un papel filtro en el embudo Büchner, conectado a un matraz Kitazato y agregar 100 ml de la suspensión de tierra de diatomeas-sílice sobre el filtro, aplicar vacío.

5. Transferir el total de la muestra acidificada al embudo Büchner preparado aplicando vacío hasta que cese el paso de agua. Medir el volumen de la muestra.
6. Con ayuda de unas pinzas, transferir el material filtrante a un cartucho de extracción. Limpiar las paredes internas del embudo y el frasco contenedor de la muestra, así como la parte interna de la tapa del frasco con trozos de papel filtro previamente impregnados de disolvente (hexano) tener cuidado en remover la película de grasa y los sólidos impregnados sobre las paredes; colocar los trozos de papel en el mismo cartucho.
7. Secar el cartucho en una estufa a 103 – 105°C por un período de 30 minutos. Transcurrido este período colocar en el equipo Soxhlet.
8. Adicionar 80 ml de hexano al matraz de extracción previamente puesto a peso constante y preparar el equipo Soxhlet. Evitar tocar con las manos el cartucho y el matraz de extracción, para ello utilizar pinzas ó guantes de látex.
9. Colocar el equipo de extracción sobre la parrilla de calentamiento, controlar la temperatura del reflujo y extraer a una velocidad de 20 ciclos/hora durante un período de 4 h.
10. Una vez terminada la extracción retirar el matraz del equipo Soxhlet, y evaporar el disolvente.
11. El matraz de extracción libre de disolvente se coloca en el desecador hasta que alcance la temperatura ambiente.
12. Pesar el matraz de extracción y determinar la concentración de grasas y aceites recuperables.
13. Analizar un blanco de reactivo bajo las mismas condiciones de la muestra.

Una vez realizado el procedimiento siguiendo la metodología antes mencionada, se procede a realizar los cálculos pertenecientes a la determinación de grasas y aceites del método de Soxhlet.

Éstos se llevan acabo de la siguiente manera:

1. Calcular las grasas y aceites recuperables (G y A) en la muestra usando la siguiente ecuación:

$$G \text{ y } A \text{ (mg/l)} = (A - B) / V$$

donde:

A = es el peso final del matraz de extracción (mg);

B = es el peso inicial del matraz de extracción (mg), y

V = es el volumen de la muestra, en litros.

2. Restar al resultado obtenido de la muestra el valor del blanco de reactivo.
3. Reportar los resultados del análisis en mg/l.

Para lograr la validación de este método, se realizaron unos cambios dentro del marco de la metodología, sin embargo, los cambios efectuados no representan una alteración o una variación en los resultados finales.

Los cambios que se realizaron son los siguientes:

1. En lugar de utilizar un embudo Büchner, éste fue remplazado por el equipo millipore, ya que al tratar de filtrar en el embudo Büchner, el tiempo de filtración fue demasiado largo e incluso incompleto, debido a que el filtro se saturaba provocando un taponamiento en éste evitando la filtración de la muestra.
2. En lugar de agregar 100 ml de tierra diatomeas, se agregó la mitad de este, es decir, 50 ml. Esto a razón de que el equipo millipore empleado para la filtración es de menor tamaño que el embudo Büchner, por lo tanto también se redujo la cantidad de tierra diatomea.

3. Una vez que se realizó la extracción de grasas y aceites, los cartuchos fueron colocados en la estufa para secarlos, sólo que la temperatura que se empleo fue de 85°C con tiempo de 1 hora.

3.4 Material

Los materiales que se utilizaron para la validación del método Soxhlet para la determinación de grasas y aceites en aguas residuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Análisis de Aguas del Instituto Tecnológico de Sonora. A continuación se presenta un listado del material y equipo utilizado:

- Equipo Soxhlet
- Matraces Soxhlet fondo plano de 125 ml
- Cartuchos de extracción marca Whatman
- Papel filtro No. 42 marca Whatman
- Equipo de filtración Millipore
- Matraz Kitazato de 1000 ml
- Bomba de vacío marca PRECISIÓN, modelo D-150
- Patrón de pesas calibradas marca RICE LAKE, clase E2, con un rango de 200.00 g a 1 mg. Fecha de calibración 23 de noviembre de 2003 por INSCO (Compañía de Instrumentación y Servicios)
- Balanza analítica marca SARTORIUS, modelo CP225D
- Horno marca FELISA, modelo FE-0292A
- Potenciómetro marca Multi, modelo 3401
- Termómetro calibrado marca ERTGO, con rango de -5 a 110°C. Fecha de calibración 10 de febrero de 2004, registro No. LMT-040068
- Refrigerador marca AMÉRICA
- Probeta de 50 ml
- Vasos de precipitado de 100 y 250 ml
- Pipetas graduadas de 10 ml boca ancha
- Perilla

- Desecador
- Frascos de vidrio de 100 y 1000 ml
- Pinzas para cartuchos
- Guantes de látex
- Algodón

3.5 Reactivos

- Aceite de oliva extra virgen marca Great Value
- Hexano marca MERCK, grado 98.5%
- Solución de tierra diatomeas al 10%
- Ácido sulfúrico concentrado marca MERCK
- Soluciones buffer para pH 4.01 lote 10706 y 7 lote 10708 marca WTW
- Soluciones Buffer para conductividad eléctrica, a 20°C - 1278 $\mu\text{s}/\text{cm}$ y a 25°C - 1413 $\mu\text{s}/\text{cm}$

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados de la verificación del equipo de medición

La balanza analítica de la marca SARTORIUS y modelo CP225D, como se muestra ilustrada en la figura 4, se encuentra ubicada en el Laboratorio de Análisis de Aguas dentro del Instituto Tecnológico de Sonora, la cual se verificó el día 11 de agosto del 2004.



Figura 4. Balanza analítica SARTORIUS.

Para la verificación de la balanza, se utilizó un patrón de pesas calibradas de la marca RICE LAKE, clase E2, con un rango de pesas de 200.00 gramos a 1 miligramo como se muestra en la figura 5. La fecha de calibración de las pesas fue realizada el día 23 de noviembre del año 2003 por INSCO (Compañía de Instrumentación y Servicios). el cual se encuentra avalado por el CENAM (Centro Nacional de Metrología).



Figura 5. Patrón de pesas RICE LAKE.

Con ayuda de unos guantes se toman primero las pesas de 50 gramos y se colocan en el centro del platillo de la balanza y se cierran sus ventanillas. Se anota el peso en gramos indicado en la pantalla. Esta operación se repite 10 veces. Y por último de toma la pesa de 20 gramos siguiendo el mismo procedimiento.

La figura 6 muestra los resultados obtenidos con las pesas de 50 gramos para la verificación de la balanza.

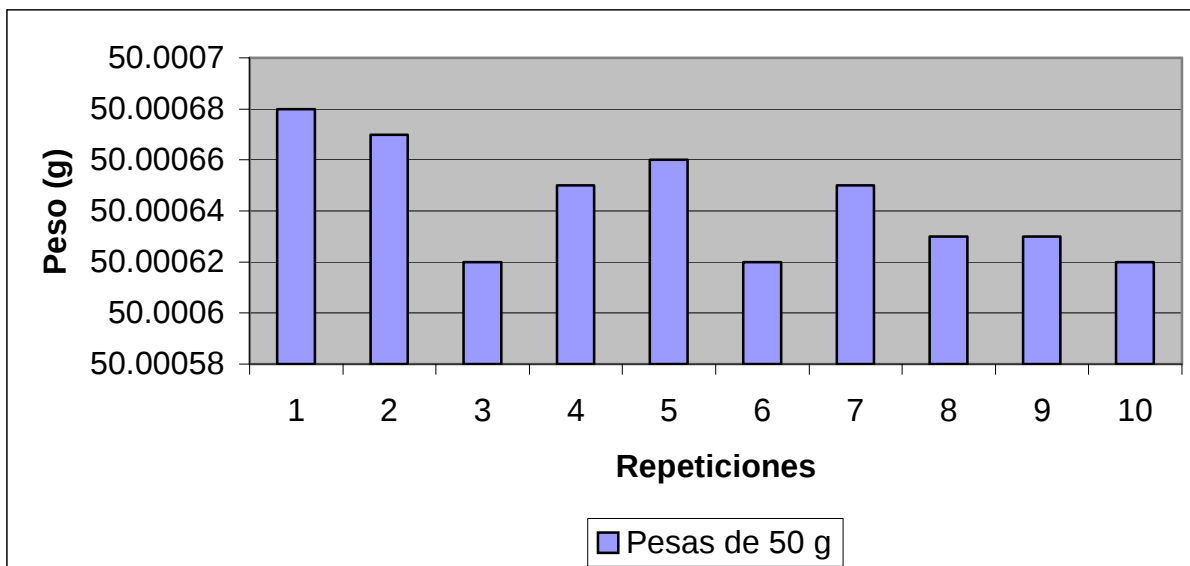


Figura 6. Verificación con pesas de 50 gramos.

En cuanto a su media, dio como resultado 50.00063 gramos, con una desviación estándar de 2.21157 y un coeficiente de varianza del 0.0442309%.

Los resultados correspondientes a la verificación de la balanza con las pesas de 20 gramos, son los que se presentan a continuación en la figura 7.

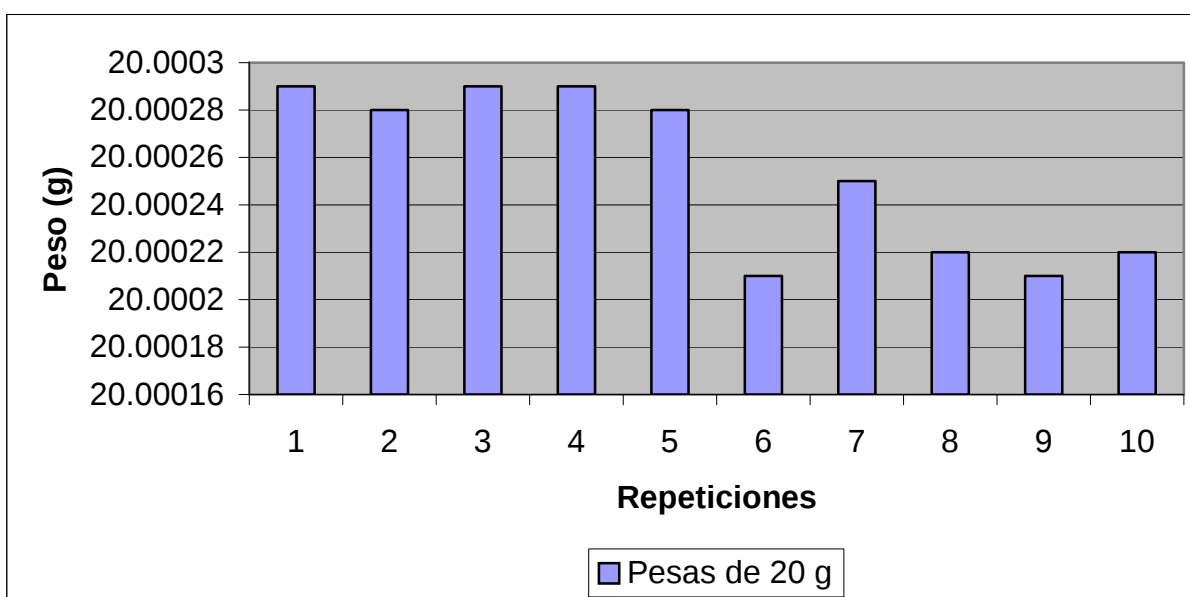


Figura 7. Verificación con pesas de 20 gramos.

Con los resultados obtenidos de los valores dados por las mediciones de las pesas de 20 gramos, se tiene un media de 20.000254 gramos, con un desviación estándar de 3.56535 y un coeficiente de variación del 0.0178265%.

4.2 Resultados del material de referencia

Para la validación del método de Soxhlet, se utilizó aceite extra virgen de oliva marca Great Value, como se muestra en la figura 8. Éste fue elegido por ser un líquido totalmente homogéneo, además, por reunir todas las propiedades necesarias para su cuantificación por dicho método.



Figura 8. Aceite de referencia

Una vez identificado el material de referencia utilizado, se procedió a investigar cual es el peso promedio de una gota de aceite, donde los pesos obtenidos se representan en la figura 9.

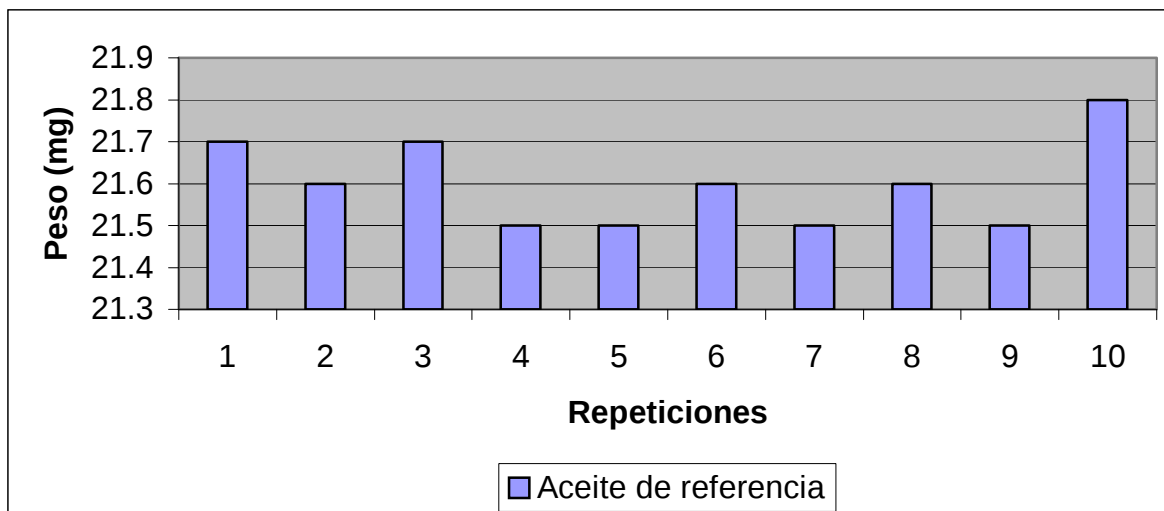


Figura 9. Peso promedio de una gota de aceite de referencia.

El resultado que se tuvo fue un promedio de 21.6 miligramos, una desviación estándar de 0.1054 y un porcentaje de variación de 0.48.

Para lograr estos resultados se realizaron numerosas repeticiones hasta obtener el mismo peso con un mínimo de diez repeticiones consecutivas, esto con la finalidad de que los resultados arrojados sean confiables y reproducibles.

4.5 Parámetros del agua residual

Los resultados de las mediciones del agua residual muestreada, son lo que se encuentran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Parámetros del agua residual de entrada.

Parámetro	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio
pH	6.08	6.08	6.07	6.08
Temperatura (°C)	32	32.5	32.6	32.37
Conductividad Eléctrica (μs/cm)	1786	1786	1785	1785.67

Tabla 2. Parámetros del agua residual de salida.

Parámetro	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio
pH	6.89	6.91	6.91	6.90
Temperatura (°C)	32.6	32.8	32.8	32.73
Conductividad Eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	1900	1903	1902	1901.67

4.6 Resultados de la determinación de grasas y aceites

Durante la determinación de grasas y aceites por el método de Soxhlet, al realizar las extracciones, también se analizaron distintos tipos de blancos. Los blancos que se utilizaron durante los análisis fueron de agua de la llave, agua destilada y un blanco de reactivo, donde los resultados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Grasas y aceites de los blancos.

BLANCOS	Grasas y aceites (mg/l)
Agua de la llave	6.71
Agua destilada	3.16
Blanco de reactivo	24.72

La finalidad de realizar un blanco de agua de la llave y agua destilada es para descartar la posibilidad que el agua contenga cantidades elevadas de grasas y aceites que interfieran en los resultados provocando una alteración en ellos.

Ya que como se hizo mención en el protocolo de validación, todo el material a utilizar es perfectamente lavado, y para ello se utiliza agua de la llave y agua destilada. Con esto se descarta la posibilidad de que se hayan adherido al material grasas durante el proceso de lavado. Esta es una manera de reducir el número de incertidumbres que puedan alterar los resultados durante la determinación de grasas y aceites.

Esto último es aplicado al blanco de reactivo, solo que la principal razón de analizarlo, es para comprobar la calidad del reactivo a utilizar, que en este caso es el hexano.

Este tipo de análisis permite ver si el reactivo se encuentra contaminado o no, ya que de encontrarse contaminado, esto alteraría por completo los resultados y por lo tanto no serían confiables.

Es importante aclarar que con el blanco de reactivo no solo se analiza el hexano, sino también la tierra diatomea, el cartucho de extracción y el condensador.

Una vez terminado el proceso de extracción de grasas y aceites, donde se analizaron cinco muestras del agua residual de salida, en las cuales todas tenían un volumen de 50 ml, se procedió a realizar los cálculos correspondientes para determinar la cantidad de grasas y aceites de la muestra.

Los resultados de los cálculos hechos a estas muestras se hayan indicados en la tabla 4.

Como ya se indicó anteriormente, la norma NMX-AA-005-SCFI-2000 proporciona la fórmula a utilizar, la cual dice de al peso final del matraz con el residuo se le resta el peso inicial del matraz a peso constante, luego el resultado se divide entre el volumen de muestra expresado en litros, y por último, se resta el blanco de reactivo para obtener el resultado final en mg/l.

Tabla 4. Contenido de grasas y aceites de las muestras de agua residual.

No	Grasas y aceites (mg/l)
1	161.2
2	165.8
3	158.8
4	162.4
5	161.8

Como se puede observar los resultados que aquí se presentan aún no es restado el blanco de reactivo, esto con el propósito de observar la cantidad total recuperada de la extracción.

A continuación se presenta la tabla 5 donde al resultado anterior es restado el blanco de reactivo. El blanco de reactivo consiste es poner a reflujo solamente el cartucho de extracción con el papel filtro y la tierra diatomeas únicamente, es decir, sin filtrar la muestra de agua residual.

Tabla 5. Datos finales de las grasas y aceites de las muestras de agua residual menos el blanco de reactivo.

No	Grasas y aceites (mg/l)
1	136.48
2	141.08
3	134.08
4	137.68
5	137.08

Se tiene que el blanco de reactivo contiene un 24.72 mg/l de grasas y aceites, esto es un patrón donde indica que se pudo haber presentado distintos tipos de incertidumbres durante el procedimiento. Se puede pensar que se haya filtrado tierra diatomeas, que el hexano utilizado este contaminado, los condensadores o el equipo de Soxhlet hayan estado sucios. A esto es a lo que se le atribuye el resultado del

blanco de reactivo, y al restarlo al resultado antes obtenido, se obtiene el resultado final y con ello se demuestra que el resultado expresado es el peso real de aceites y grasas que contiene la muestra analizada.

Lo mismo se aplicó en el caso de las muestras con 50 ml de agua residual a las cuales se les adicionó una gota de aceite de referencia, dando por resultados los expresados en la tabla 6.

Tabla 6. Grasas y aceites del agua residual más aceite de referencia.

No	Gota de Aceite (mg)	Grasas y aceites (mg/l)
1	21.6	179.6
2	21.7	183.7
3	21.5	177.5
4	21.3	180.3
5	21.6	179.8

Al agregar la gota de aceite adicional, es para determinar si el equipo es capaz de detectar cantidades adicionadas, tal como es el caso que fue hecho de manera intencional. También es una manera más para corroborar los resultados.

Cabe mencionar que el resultado aquí señalado aún no incluye la resta del blanco de reactivo.

Ahora se procede a mostrar en la tabla 7 el resultado obtenido de la sustracción del blanco de reactivo a los resultados obtenidos de las muestras de agua residual más la gota de aceite de referencia.

Tabla 7. Contenido final de grasas y aceites de las muestras de agua residual con aceite de referencia.

No	Grasas y aceites (mg/l)
1	154.88
2	158.98
3	152.78
4	155.58
5	155.08

Al analizar los resultados antes expuestos se puede observar que el método empleado y el equipo si es capaz de detectar las cantidades de aceite adicionadas, ya que se puede constatar que el resultado es mayor que el resultado obtenido de la extracción de la muestra que contiene agua residual solamente.

La tabla 8 ejemplifica una comparación de los resultados finales de la primera corrida correspondiente a los resultados de la extracción de la muestra de agua residual sola, y a los resultados correspondientes de la extracción de la muestra de agua residual más el aceite de referencia añadido.

Dicha comparación se hace sumando el peso del aceite adicionado al resultado final (1) de las muestras de agua residual, y el resultado de esta operación es comparado con el resultado final (2) que es le correspondiente a las muestras de agua residual más el aceite de referencia.

Tabla 8. Comparación de los resultados de las muestras con y sin aceite de referencia.

No	Grasas y aceites del agua residual (mg/l)	Grasas y aceites de agua residual más aceite de referencia (mg/l)
1	158.08	154.88
2	162.78	158.98
3	155.58	152.78
4	158.98	155.58
5	158.68	155.08

Por lo tanto, al analizar los resultados de la comparación antes descrita, se demuestra que el método Soxhlet para la determinación de grasas y aceites descritos por la norma NMX-AA-005-SCFI-2000, es capaz de detectar cantidades determinadas del analito.

Además, se presenta en la tabla 9 una serie de operaciones que se realizaron con los resultados de la tabla 8, esto con el propósito de obtener el porcentaje de recuperación, para así saber con precisión cuanto del resultado final de la extracciones se esta recuperando. Esto esta basado en la norma NMX-AA-034-SCFI-2001 donde especifica claramente que el porcentaje de recobro no debe ser mayor a 5 mg/l, o lo que es igual, que el porcentaje de error no exceda del 5%.

Para realizar estas operaciones se utilizó una simple regla de tres para obtener los resultados expresados en porcentaje.

Tabla 9. Porcentaje de recuperación de grasas y aceites.

No	% DE
-----------	-------------

	RECUPERACIÓN
1	97.9757
2	97.6655
3	98.2002
4	97.8613
5	97.7312

Como se puede constatar, los resultados obtenidos de las operaciones para determinar el porcentaje de recuperación cumplen con el margen de error descrito por la norma NMX-AA-034-SCFI-2001 ya que todos los resultados tienen un error menor del 5%, lo que indica, que el porcentaje de recuperación que se está mencionando es el porcentaje real grasas y aceites recuperadas de la muestra de agua residual.

Por último se calcula la incertidumbre con la fórmula que se encuentra indicada en página 20, donde especifica que la incertidumbre debe ser igual al factor k , donde K es igual a dos. Por lo tanto, al analizar la incertidumbre producida por el procedimiento, se tiene que solamente los reactivos generan una incertidumbre,

El factor analista fue descartado, por ser una única persona la encargada de todo el procedimiento; el factor limpieza, fue eliminado al realizar los blancos de agua de la llave y de agua destilada, además, de utilizar hexano para su limpieza; y la incertidumbre generada por el uso de la balanza analítica SARTORIUS, fue totalmente eliminada, debido a que la balanza fue calibrada con trazabilidad al CENAM (Centro Nacional de Metrología), asimismo, fue verificada con un marco de pesas calibradas.

En cuanto a la incertidumbre generada por la trazabilidad de los resultados, no hay fuente de incertidumbre en este punto, puesto que, al ver y analizar los datos se puede apreciar que los resultados son completamente trazables y que la precisión del método es completa. Es importante mencionar que la posible incertidumbre generada por el material de referencia utilizado fue descartada, ya que, el material

que se utilizó es muy semejante al mesurando estudiado, igualmente, que se cuentan con los datos precisos de los pesos utilizados.

En lo que se refiere a la incertidumbre formada por el uso de pretratamiento, no existe, esto a razón de que no se realizó ningún tipo de tratamiento especial ni complicado a la muestra, lo único que se aplicó fue ácido sulfúrico concentrado y temperatura de refrigeración. Por lo que esta incertidumbre es totalmente descartada con conocer perfectamente las cantidades usadas y la concentración de este reactivo, en cuanto a la temperatura, esta fue vigilada con un termómetro calibrado.

Por lo antes mencionado, se tiene que las incertidumbres encontradas son las generadas por el hexano, tierras diatomeas, filtro, cartucho de extracción con algodón, matraz Soxhlet. Y al llevar estos datos a la fórmula para obtener la incertidumbre se tiene que:

$$U = K \cdot \sqrt{U^2_{\text{Procedimiento}}}$$

donde:

U = Incertidumbre

$K = 2$

$U^2 = 1$ (hexano, tierras diatomeas, filtro, cartucho de extracción con algodón y matraz Soxhlet)

por lo tanto:

$$U = 2 \cdot \sqrt{1} \longrightarrow U = 2 \cdot 1 = 2$$

Como se puede apreciar la incertidumbre generada durante el procedimiento de extracción de grasas y aceites por el método de Soxhlet, es completamente aceptada, ya que se encuentra dentro lo establecido por la incertidumbre.

4.7 Determinación de la exactitud del método de Soxhlet

Prueba de t de Student

Repeticiones	Valor del AR (mg) “ μ_0 ”	Cantidad recuperada (mg)	% de Recobro
1	21.6	21.16	97.9757
2	21.7	21.19	97.6655
3	21.5	21.11	98.2002
4	21.3	20.84	97.8613
5	21.6	21.10	97.7312

Fórmula:

$$t_{cal} = \frac{\bar{x} - \mu_0}{S / \sqrt{\eta}}$$

Donde:

$\eta = 5$ (Número total de datos)

$\nu = 4$ ($\eta - 1$, grados de libertad)

$\alpha = 0.005$

$\bar{x} = 21.08$ (Promedio de cantidad recuperada)

$S = 0.139104$ (Desviación estándar)

$\mu_0 = 21.54$ (Promedio del valor de referencia)

$$t_{cal} = \frac{\bar{x} - \mu_0}{S / \sqrt{\eta}} = 7.3944$$

$$t_{tab(\nu, \alpha)} = 8.610$$

Intervalo de confianza (μ):

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{tab} S}{\sqrt{\eta}}$$

$$\mu = 21.08 \pm 0.45999$$

Por lo tanto se tiene un intervalo de confianza de:
20.6200 a 21.53999 mg de cantidad recuperada.

Criterio de aceptación:

Si $-t_{tab} \leq t_{cal} \leq t_{tab}$ entonces el método es repetible.

$$\begin{array}{l} \text{Tenemos que: } -t_{tab} \leq t_{cal} \leq t_{tab} \\ \text{porque: } -8.610 \leq 7.3944 \leq 8.610 \end{array}$$

Por lo tanto: el método de Soxhlet es exacto con un intervalo de confianza de 99.5%

CONCLUSIÓN

El objetivo planteado fue cumplido al validar el método de Soxhlet para grasas y aceites en agua residual, que es el utilizado en el Laboratorio de análisis de aguas, suelo y plantas del Instituto Tecnológico de Sonora. Con esta validación se ayuda a conseguir la acreditación y certificación del laboratorio, ya que la validación de métodos es requisito indispensable para la acreditación.

Realizando una variación en la metodología empleada por la norma NMX-AA-005-SCFI-2000, la cual indica que el embudo de filtración a utilizar es el embudo Büchner, el cual fue remplazado por el equipo de filtración millipore obteniendo con este último buenos resultados.

Se obtuvo un porcentaje de recobro que va desde el 97.6655% al 98.2002%. Con una t de Student calculada de 7.3944, la cual cumple con el criterio de aceptación en un intervalo de confianza del 99.5%, lo que indica la exactitud del método.

Por lo tanto se tiene la extracción de grasas y aceites por el método de Soxhlet cumple con los criterios establecidos por la NMX-AA-005-SCFI-2000, obteniendo resultados confiables, trazables y reproducibles.

GLOSARIO

Acreditación: Certificación realizada por un organismo reconocido de la capacidad, objetividad, competencia e integridad de una agencia, servicio, o individuo para certificar el cumplimiento de la Norma ISO 9000 (ISO 8402).

Análisis de Varianza: Técnica estadística básica para analizar datos experimentales, permitiendo discriminar la magnitud de la variabilidad que producen distintas causas (Martínez, 2000).

Calibración: La comparación de un instrumento o sistema de medición de exactitud no verificada con un instrumento o sistema de exactitud conocida para detectar cualquier desviación del comportamiento requerido (Martínez, 2000).

Calidad: La totalidad de las características de un producto o servicio que le confieren aptitud para satisfacer necesidades establecidas e implícitas (ISO 8402).

Coeficiente de variación (CV): Es un valor relativo de la desviación estándar con respecto a la media aritmética y nos dice que porcentaje de la media aritmética representa la desviación estándar (Martínez, 2000).

Control de la Calidad: Técnicas y actividades de carácter operativo, utilizadas para satisfacer los requisitos de Calidad de un producto o servicio (ISO 8402).

Desviación Estándar: Es la raíz cuadrada de la varianza (Martínez, 2000).

Exactitud de una medición: proximidad entre el resultado de una medición y el valor verdadero del mesurando (NORMA IRAM 32, 1997).

Incertidumbre: es un parámetro, asociado al resultado de una medida, que caracteriza el intervalo de valores que puede ser razonablemente atribuidos al mensurando (BIPM, 1993).

Media Aritmética o Promedio $\bar{x}$: La media aritmética o promedio, no es más que la suma de los datos que se quieren promediar, dividida entre el número de datos y se representa con equis testada (Ishikawa, 1986).

Mesurando: magnitud particular sometida a medición (NORMA IRAM 32, 1997).

Muestra: se compone de los individuos, objetos, medidas u observaciones seleccionados por la población (Juran, 1989).

Muestreo Aleatorio: Técnica de muestreo utilizada comúnmente por la cual las unidades que componen la muestra son seleccionadas de tal manera que todas las combinaciones de n unidades tienen la misma oportunidad de ser elegidas como muestra (Juran, 1989).

Precisión intermedia: magnitud que relaciona la variación en los resultados observados cuando uno o más factores, tales como tiempo, equipamiento, operador, varían dentro de un mismo laboratorio (Guide EURACHEM- CITAC, 2000).

Procedimiento: Manera especificada de realizar una actividad (ISO 8402).

Repetibilidad (de los resultados de las mediciones): proximidad entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mesurando, realizadas bajo las mismas condiciones de medición. (Aplicación de un mismo procedimiento, a un mismo objeto, por el mismo operador, en intervalos cortos de tiempo, con el mismo equipamiento instrumental, en el mismo lugar) (NORMA IRAM 32, 1997).

Trazabilidad: Aptitud de reconstruir la historia, la utilización o la localización de un producto por medio de identificaciones registradas (ISO 8402).

Validación: Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista (NORMA IRAM 32, 1997).

Varianza (Variancia) S2: La varianza o variancia es el promedio de las desviaciones al cuadrado entre los datos y su media aritmética (Ishikawa, 1986).

Verificación: Confirmación por examen y aporte de evidencias objetivas que los requisitos especificados han sido satisfechos (ISO 8402).

BIBLIOGRAFÍA

BIPM,IEC,IFCC,ISO,IUPAC,IUPAP,OIML. 1993. Guide to the expression of uncertainty in measurement, ISO. Ginebra.

Díaz, M., Hernández, I., Martínez, M., Licea, M., Gómez, L., Louro, G., Morera, Y. y Gonzalez, E. 1998. Validación de técnicas analíticas.

Eurachem. 1995. Quantifying uncertainty in analytical measurements. EURACHEM Secretariat, P.O. Box 46, Teddington, Middlesex, TW11 0LY, UK.

Ishikawa, Kaoru. 1986. Guide to Quality Control. White Plains, N.Y.

ISO Guide 30. 1996. Terms and definitions used in connection with reference materials, International Organization for Standardization.

ISO Guide 32. 1997. Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials, International Organization for Standardization.

ISO Guide 34. 1996. Quality system guidelines for the production of reference materials, International Organization for Standardization.

ISO/TAG4/WG3. 1992. "Guide to the expression of uncertainty in measurement" (GUM) ISO-IEC-BIPM Ginebra.

ISO 3534-1. 1993. Statistics - Vocabulary and symbols. Part 1: Probability and general statistical terms. ISO, Ginebra.

ISO 8402. 1986. Quality - Vocabulary. International Organization for Standardization, Geneva.

Juran, J.M. 1989. Quality Improvement Tools Juran Institute.

MC-OAA. 2003. Manual de la Calidad del OAA.

Maroto, A., Boqué, R., Riu, J., Rius, X. 2001. Incertidumbre y precisión. Técnicas de Laboratorio. pp. 834-837.

Maroto, A., Boqué, R., Riu, J., Rius, X. 1999. Analytica Chimica Acta 391. pp. 173-185.

Martínez R., Suárez I. 2000. Apuntes Curso de Control Estadístico de Proceso. México.

Montgomery, D. Y Runger G. 1998. Probabilidad y Estadística. Aplicaciones a la Ingeniería. Editorial McGRAW-HILL. México. pp. 314,135, A-9.

NMX-AA-034-SCFI-2001. Análisis de agua - determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba (Cancela a las NMX-AA-020-1980 y NMX-AA-034-1981).

NMX-IEC-17025-IMNC-2000. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

NMX-AA-005-SCFI-2000. Análisis de agua - determinación de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba (cancela a la NMX-AA-005-1980).

NOM-002-ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.

Norma IRAM 301:2000-Norma ISO/IEC 17025. 1999.

Riu, J., Boqué, R., Maroto, A., Rius, X. 2001. Determinación de la trazabilidad en medidas químicas. Técnicas de Laboratorio. pp. 312-315.

Sardiñas, O. y Hernández, M. 2002. Aseguramiento de la Calidad en un Laboratorio Acreditado. Rev. Cubana Hig. Epidemiol. 40 (1) : 16 – 19.

USP- 24. 2000. Validation. General Chapters, epig. 1225. pp. 2149.

<http://html.rincondelvago.com/aguas-residuales.html>