



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Departamento de Química



Publicaciones

EVALUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LA DETERMINACIÓN GRAVIMÉTRICA DE HUMEDAD, CENIZAS, GRASA Y FIBRA CRUDA

ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN ALIMENTOS POR EL MÉTODO KJELDAHL

METODOLOGÍAS APLICADAS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LOS NIVELES DE REFERENCIA PARA METALES PESADOS EN LA EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN EN SUELOS

Presentadas ante la ilustre Universidad de Carabobo como credencial de mérito para el ascenso a Profesor Titular

Ygmar C. Jiménez B.

CI: 7.122.452

Naguanagua, Octubre 2012

Evaluación de la incertidumbre en la determinación gravimétrica de humedad, cenizas, grasa y fibra cruda

Kelim Vano H.^{*,a}, Ygmar Jiménez^a, Maira G. de Núñez^b

^aDepartamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Av. Salvador Allende, Ciudad Universitaria, Valencia, Venezuela. Tele-fax: 58 241 8678805

^bDivisión Físico-Química, Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE). Zona Industrial Agustín Rivero, Av. Principal, Edificio CIEPE, San Felipe, Venezuela

Resumen.-

En la evaluación de los alimentos, el análisis proximal resulta de gran utilidad para el sector agroindustrial porque a través de ellos se puede definir la calidad y el valor nutricional, de allí la importancia del resultado analítico y el interés de que sea conocido con certeza. Con la finalidad de conocer las fuentes más significativas de incertidumbre, en el presente estudio se evalúa la incertidumbre de la medición en la determinación de humedad, cenizas, grasa y fibra cruda, aplicando la ley de propagación de incertidumbres descrita en la *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements* (GUM). Los resultados obtenidos indican que la fuente de mayor contribución en las determinaciones de humedad y grasa es la repetibilidad del método de ensayo, mientras que la fuente de incertidumbre más significativa en las determinaciones de cenizas y fibra cruda corresponde a la función calibración de la balanza.

Palabras clave: Incertidumbre, humedad, cenizas, grasa, fibra cruda

Evaluation of the uncertainty in the gravimetric humidity determination, ashes, fat and crude fiber

Abstract.-

In the food evaluation, proximal analysis is useful for the agro-industrial sector because through them you can define the quality and nutritional value, hence the importance of the analytical result and the interest to know it with certainty. With the purpose of to know the most significant sources of uncertainty, the present study evaluates the uncertainty of measurement in humidity determination, ashes, fat and crude fiber, applying the law of uncertainty propagation described in the *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements* (GUM). The obtained results show that the source of greater contribution in the determination of humidity and fat is the repeatability of the method, while the most significant source in the determination of ashes and crude fiber corresponds to the calibration function of the balance.

Keywords: Uncertainty, Humidity, Ashes, Fat, Crude Fiber

1. Introducción

En los alimentos, el propósito principal de un análisis proximal es determinar, entre otros, el contenido de humedad, cenizas, grasa y fibra cruda. Estos análisis resultan de mucho interés porque permiten caracterizar nutricionalmente a los alimentos así como también garantizar la calidad de productos formulados comercialmente [1]. Los métodos para la determinación del contenido de humedad, cenizas, grasa y fibra cruda en

alimentos son de tipo gravimétrico [2–5]. Esta técnica, a pesar de ser usada ampliamente en el análisis de rutina, implica una manipulación extensiva de la muestra por el analista, masas grandes de muestra, tiempo de análisis largo, y pre-tratamiento de la muestra antes del secado o de la incineración que dependen de la naturaleza de los constituyentes presentes [6]. Por esta razón, el resultado analítico requiere conocerse con certeza y está completo únicamente cuando va acompañado de un parámetro, como la incertidumbre, que defina la calidad de ese resultado obtenido. La incertidumbre, *parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pudieran ser razonablemente atribuidos al mensu-*

*Autor para correspondencia

Correos-e: kvano@uc.edu.ve (Kelim Vano H.),
yjimenez@uc.edu.ve (Ygmar Jiménez),
mgnunez@ciepe.gov.ve (Maira G. de Núñez)

rando [7], refleja duda acerca de la veracidad del resultado obtenido una vez que se han evaluado todas las posibles fuentes de incertidumbre y que se han aplicado las correcciones oportunas; por tanto, da una idea de la calidad del resultado [8]. Su importancia y aplicación en los últimos años ha sido objeto de estudios en diversas investigaciones del área analítica, que van desde su estimación en la medición de la cantidad de sustancia por espectrometría de dilución de isótopos de masa [9], pasando por la preparación de mezclas de gases primarios [10] y soluciones patrones de glucosa para el uso en refractometría [11], en el desarrollo de nuevas metodologías para su aplicación en métodos analíticos de rutina [12], así como su uso en el control de calidad [13] y en la determinación de la viscosidad absoluta [14]. En el presente estudio, tomando como base la metodología definida en la *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* (QUAM) [15], se evalúa la incertidumbre de la medición en la determinación de humedad, cenizas, grasa y fibra cruda aplicando la ley de propagación de incertidumbres descrita en la *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements* (GUM) [7], con la finalidad de conocer las fuentes más significativas de incertidumbre en cada determinación.

2. Metodología

La estructura de evaluación de la incertidumbre se llevó a cabo en los siguientes pasos [15]:

2.1. Análisis del proceso de medición

Primero se dio una especificación del mensurando, donde se incluyó una definición clara de lo que se mide, conteniendo la relación entre el mensurando y las cantidades de las que depende el mensurando, de acuerdo a lo indicado en los métodos de ensayos [7]. Posteriormente, se realizó una identificación de las fuentes de la incertidumbre efectuando un análisis causa-efecto [15].

2.2. Cálculo de la incertidumbre estándar

Se realizó la cuantificación de los componentes de la incertidumbre considerando cada fuente por separado para obtener la contribución de dicha fuente. Cada una de las contribuciones separadas de la incertidumbre es conocida como un componente de la misma. Cuando un componente es expresado como una desviación estándar, este componente de la incertidumbre es conocido como una *incertidumbre estándar*. Tal como se establece en la GUM [7], la incertidumbre se agrupó en

dos categorías; los componentes tales como los estudios interlaboratorios fueron evaluados según la distribución estadística de una serie de mediciones y caracterizados por las desviaciones estándar (incertidumbre estándar tipo A) [15]. Los otros componentes no provenientes de una serie de mediciones, también fueron caracterizados por las desviaciones estándar, pero evaluados asumiendo alguna función de distribución, tal como la distribución rectangular, triangular o Gaussiana, con base a la experiencia u otros juicios y criterios científicos (incertidumbre estándar tipo B) [15].

2.3. Cálculo de la incertidumbre estándar combinada y expandida

Una desviación estándar total, conocida como incertidumbre estándar combinada (u_c), es estimada como la raíz cuadrada positiva de la variación total obtenida al combinar todos los componentes de la incertidumbre, usando la ley de propagación de incertidumbres [7] (Ec. 1).

$$u_c^2 = \sum_{i=1}^N u_i^2(y) \quad (1)$$

La incertidumbre expandida (U) se obtuvo de multiplicar la incertidumbre estándar combinada (u_c) por el factor de cobertura apropiado, en este caso $k = 2$, para una distribución normal y nivel de confianza de aproximadamente un 95 % [7].

3. Análisis y Discusión de Resultados

3.1. Análisis del proceso de medición

La definición del mensurando y el análisis del proceso de medición en la determinación de humedad, cenizas, grasa y fibra cruda, cuyos detalles se encuentran en la literatura [2–5], permitieron definir y analizar los principales factores que tienen un impacto en la definición del mensurando. Los diagramas causa-efecto de la Figura 1 y 2 muestran las principales fuentes a la incertidumbre.

3.2. Cálculo de la incertidumbre estándar para cada uno de los factores que afectan la incertidumbre en la determinación gravimétrica

3.2.1. Función calibración de la balanza incertidumbre tipo (Bu_{lin}, u_{sen})

La función calibración de la balanza tiene dos fuentes potenciales de incertidumbre identificadas como la sensibilidad de la balanza y su linealidad [15]. La fuente

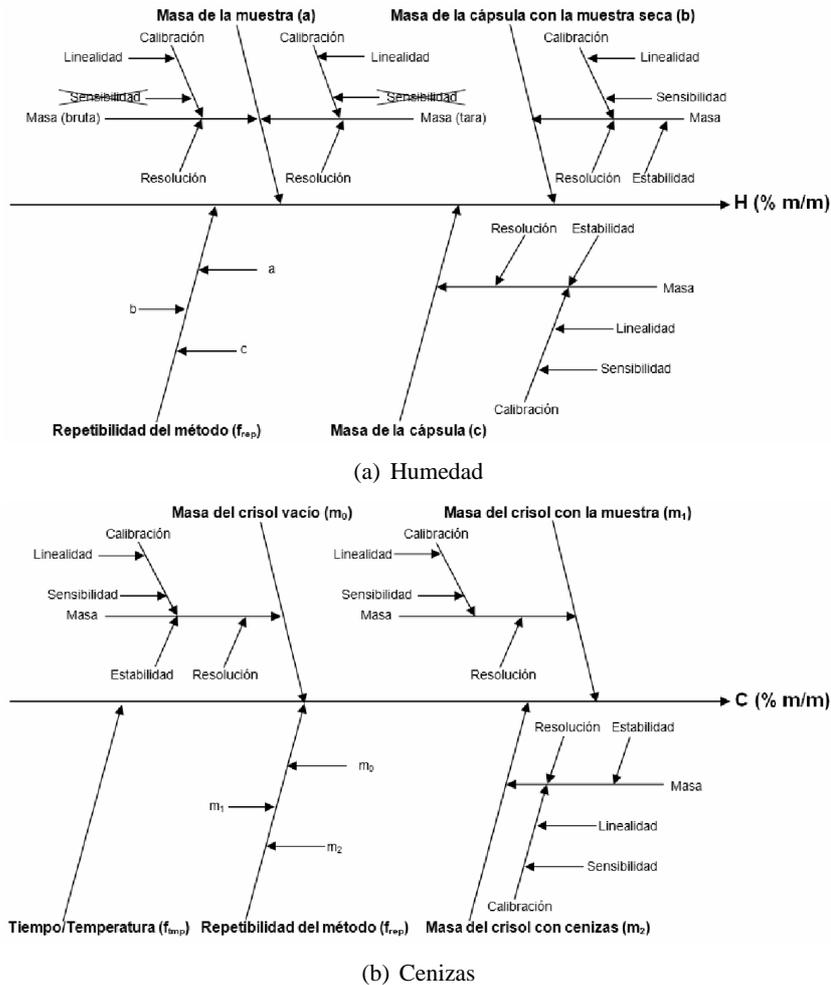


Figura 1: Fuentes de incertidumbre en la determinación de: a) humedad y b) cenizas, en harina de maíz precocida.

debida a la sensibilidad puede ser despreciada cuando la masa es determinada por diferencia de pesadas sobre una misma escala de la balanza y en un rango o límite muy pequeño [15]. La contribución debida a la linealidad (L) y la sensibilidad (S) obtenida del certificado de calibración de la balanza son estimadas, asumiendo una distribución uniforme, por lo tanto, la contribución debida a la calibración de la balanza viene dada por la suma cuadrática de las contribuciones L y S [15] (Ec. 2 y 3):

$$u_{lin}^2 = \frac{L^2}{3} \quad (2)$$

$$u_{sen}^2 = \frac{S^2}{3} \quad (3)$$

3.2.2. Resolución de la balanza incertidumbre tipo B (u_{res})

La habilidad de un instrumento de medición para responder a los cambios de la cantidad que está siendo me-

didada puede ser considerada como la incertidumbre de la medición debido a la resolución. En los instrumentos digitales puede ser considerada como $\pm \frac{1}{2}$ de la menor diferencia que puede haber entre dos lecturas de una indicación de la pantalla del instrumento. Si esta diferencia en el dispositivo indicador (balanza) es δx , el valor del estímulo que produce una indicación x dada puede localizarse en igual probabilidad en cualquier lugar del intervalo $x - \frac{\delta x}{2}$ a $x + \frac{\delta x}{2}$ [7]. El estímulo es entonces descrito mediante una distribución de probabilidad uniforme de anchura δx con una varianza dada por [7, 16] (Ec. 4).

$$u_{res}^2 = \frac{\left(\frac{\delta x}{2}\right)^2}{3} \quad (4)$$

3.2.3. Repetibilidad del método de ensayo incertidumbre tipo A (u_{rep})

La evaluación de la incertidumbre tipo A es normalmente usada para obtener un valor de la repetibilidad

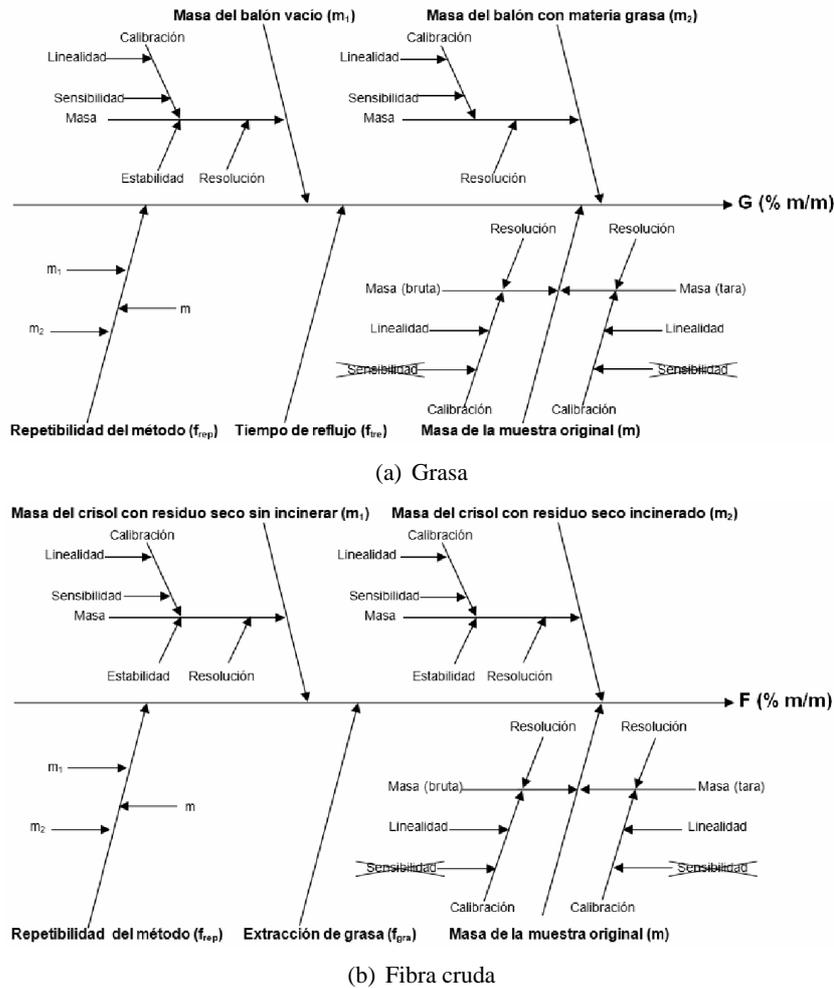


Figura 2: Fuentes de incertidumbre en la determinación de: a) grasa y b) fibra cruda, en harina de pescado.

o aleatoriedad de las mediciones. La contribución de la repetibilidad del método a la incertidumbre puede ser obtenida de resultados de pruebas colaborativas a través de la desviación estándar de reproducibilidad interlaboratorios S_R [12 – 15] (Ec. 5)

$$u_{rep} = S_R \tag{5}$$

3.2.4. Estabilidad de peso constante incertidumbre tipo B(u_{est})

La obtención de un peso constante representa una variable crítica durante las determinaciones gravimétricas generalmente cuando se trabaja en un análisis que involucra la evaporación de componentes. Normalmente la constancia de peso se obtiene de dos pesadas consecutivas que difieren en no más de 0,2 mg [17]. Partiendo de ello, si el cambio en el peso en un intervalo de tiempo es de $\pm m_{pc}$. La varianza se puede obtener, asumiendo una distribución uniforme (garantizando una cobertura amplia) [15], por medio de la

Ecuación (6):

$$u_{est}^2 = \frac{(\pm m_c)^2}{3} \tag{6}$$

3.2.5. Temperatura–tiempo de incineración en la determinación de cenizas incertidumbre tipo B(u_{inc})

La obtención de cenizas, en el caso específico de muestras de cereales y leguminosas se lleva a cabo entre 400° C y 600° C [3], lo que podría introducir una fuente potencial de incertidumbre debida a variaciones en la temperatura definida para la incineración. De igual manera, el tiempo necesario para la obtención de cenizas de color gris claro o peso constante se logra entre 16 y 18 horas, siendo este tiempo una fuente potencial de incertidumbre. Si el cambio en la masa de cenizas para un intervalo de tiempo es de $\pm m_c$, la varianza se puede obtener, asumiendo una distribución uniforme (garantizando una cobertura amplia)

[15], (Ec. 7)

$$u_{est}^2 = \frac{(\pm m_{pc})^2}{3} \quad (7)$$

3.2.6. *Tiempo de reflujó en la extracción de grasa incertidumbre tipo B(u_{ext})*

La obtención de un extracto graso, en el caso específico de alimentos para animales se lleva a cabo en un lapso entre 5 h a 12 h [4], lo que conduce a una potencial fuente de incertidumbre debido al efecto del tiempo de reflujó sobre los resultados. Si el cambio en la masa del extracto graso para un intervalo de tiempo de reflujó es de $\pm m_{ext}$, la varianza se puede obtener, asumiendo una distribución uniforme (garantizando una cobertura amplia) [15], (Ec. 8)

$$u_{est}^2 = \frac{(\pm m_{ext})^2}{3}. \quad (8)$$

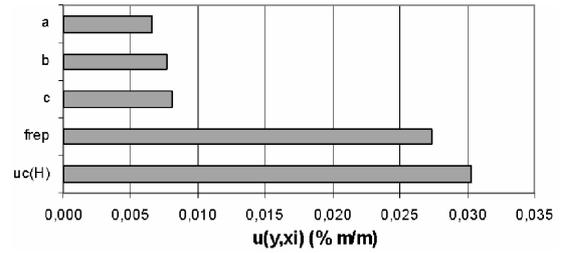
3.3. *Calculo de la incertidumbre estándar combinada (u_c) y la incertidumbre Expandida (U)*

Los datos pertinentes a cada parámetro de entrada para cada una de las cuatro determinaciones, han sido resumidos en la Tabla 1 a la Tabla 4.

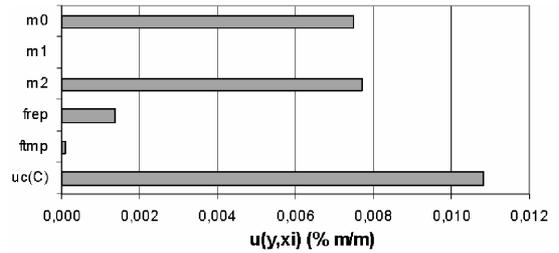
La mayor contribución a la incertidumbre combinada (Figuras 3a y 4a) en la determinación de humedad y grasa está representada por la repetibilidad del método de ensayo, lo que indica que de requerirse mejorar la calidad de la medición, es decir, reducir la incertidumbre, se debería aumentar el número de mediciones.

La Figura 3b muestra claramente que la mayor contribución a la incertidumbre combinada para la determinación de cenizas se debe a las variables m_0 y m_2 , de donde a su vez, la sub-contribución debida al efecto de la función calibración, específicamente la fuente debida a la linealidad de la balanza, es la que conlleva a la mayor contribución sobre la incertidumbre de las variables antes mencionadas (Figura 5a).

En la determinación de fibra cruda, se observa que la mayor contribución a la incertidumbre combinada se debe a las variables m_1 y m_2 , tal como se muestra en la Figura 4b, lo que conduce a su vez a indicar que la sub-contribución debida al efecto de la función calibración, específicamente la fuente debida a la linealidad de la balanza, es la que conlleva, a la mayor contribución sobre la incertidumbre de las variables antes mencionadas (Figura 5b).

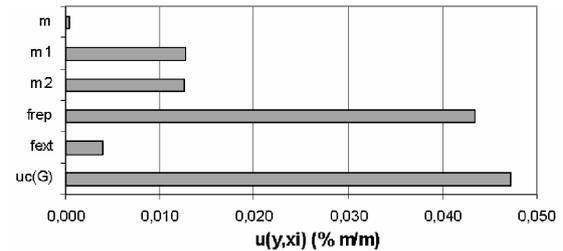


(a) Humedad

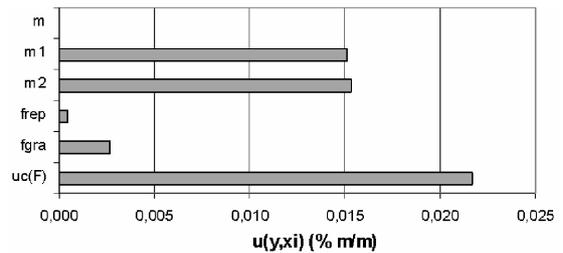


(b) Cenizas

Figura 3: Contribuciones a la incertidumbre combinada en la determinación de: a) humedad y b) cenizas.



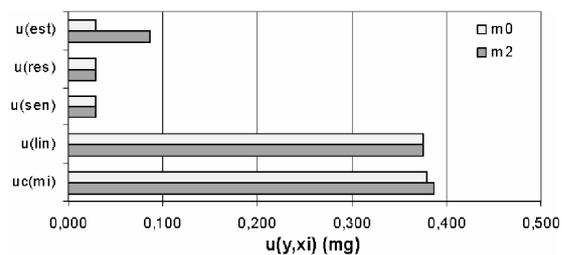
(a) Grasa



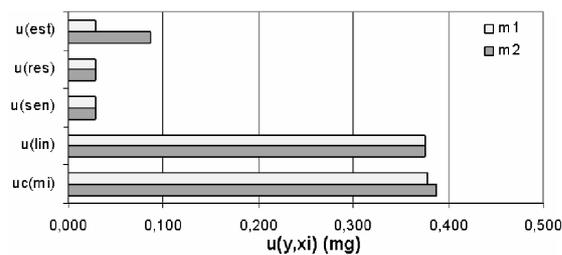
(b) Fibra cruda

Figura 4: Contribuciones a la incertidumbre combinada en la determinación de: a) grasa y b) fibra cruda.

La incertidumbre combinada fue estimada para cada una de las determinaciones a través de la ley de propagación de incertidumbres, empleando la Ec. 1 [7]. Los resultados para cada una de las determinaciones se resumen en la Tabla 5.



(a)



(b)

Figura 5: a) Sub-contribuciones a la incertidumbre de las variables m_0 y m_2 , en la determinación de cenizas; b) Sub-contribuciones a la incertidumbre de las variables m_1 y m_2 , en la determinación de fibra cruda.

Tabla 5: Resultados del análisis de incertidumbre en las determinaciones de humedad, cenizas, grasa y fibra cruda

Variable	Tipo de muestra de harina	Mensurando	Incertidumbre estándar combinada, $u_c(x_i)$	Incertidumbre expandida, $U(x_i)$ con $k=2$
Humedad, % m/m	Maíz precocida	11,844	0,0303	0,061
Cenizas, % m/m	Maíz precocida	0,616	0,0108	0,022
Grasa, % m/m	Pescado	2,658	0,0472	0,094
Fibra Cruda, % m/m	Pescado	0,131	0,0216	0,043

4. Conclusiones

En los métodos de humedad y grasa, la incertidumbre está principalmente determinada por la repetibilidad del método de ensayo, mientras que en los métodos de determinación de cenizas y de fibra cruda la incertidumbre está principalmente determinada por la función calibración, específicamente por linealidad de la balanza. Al estimar la incertidumbre en una determinación gravimétrica en particular, es necesario tomar en cuenta que la calibración de la balanza y la repetibilidad del método de ensayo constituyen las fuentes de incertidumbre más significativas.

Referencias

- [1] Colombato D. (2000), *Análisis de alimentos: Aplicaciones prácticas*. Fac. Agronomía. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- [2] COVENIN 1553 (1980), *Productos de cereales y leguminosas. Determinación de humedad*. Fondonorma, Venezuela.
- [3] COVENIN 1783 (1981), *Productos de cereales y leguminosas. Determinación de cenizas*. Fondonorma, Venezuela.
- [4] COVENIN 1162 (1979), *Alimentos para animales. Determinación de grasa cruda*. Fondonorma, Venezuela.
- [5] COVENIN 1194 (1979), *Alimentos para animales. Determinación de fibra cruda*. Fondonorma, Venezuela.
- [6] Felsner M., Cano C, Matos J., de Almeida L., y Bruns R. (2004), *Optimization of Thermo-gravimetric Analysis of Ash Content in Honey*. J. Braz. Chem. Soc. Vol. 15. No. 6, pp. 797-802.
- [7] BIMP, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML (1995), *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM)*. Switzerland.
- [8] Maroto A., Boqué R., Riu J. y Rius R. (2001), *Incertidumbre y Precisión*. Técnicas de Laboratorio. ISSN 0371-5728. No. 266, pp. 834-837.
- [9] Milton M. y Wielgosz R. (2000), *Uncertainty in SI-traceable measurements of amount of substance by isotope dilution mass spectrometry*. Metrologia. No. 37, pp. 199-206.
- [10] Alink A. y Van der Veen A. (2000), *Uncertainty calculations for the preparation of primary gas mixtures. Part 1: Gravimetry*. Metrologia. No. 37, pp. 641-650.
- [11] Vaz D., Castanheira I, Fino H. y Van der Veen A. (2000), *Uncertainty budgets and mps in refractometry: a project study*. OIML Bulletin, Volume XLI, No. 4, pp. 8-12.
- [12] Maroto A. (2002), *Incertidumbre en métodos analíticos de rutina* (Tesis Doctoral). Facultat de Química, Universitat Rovira i Virgili. España.
- [13] Armishaw P. (2003), *Estimating measurement uncertainty in an afternoon. A case study in the application of measurement uncertainty*. Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement. Vol. 8, No. 5, pp. 218-224.
- [14] Brizard M., Megharfi M. y Verdier C. (2005), *Absolute falling-ball viscometer: evaluation of measurement uncertainty*. Metrologia. No. 42, pp. 298-303.
- [15] EURACHEM/CITAC. (2000), *Quantifying uncertainty in analytical measurement*, Second Edition. Laboratory of the Government Chemistry, London, UK.
- [16] Lira I. (2006), *Resolution Revisited*. Metrologia, Vol. 43, pp. L14-L15.
- [17] Vogel I., A. (1960), *Química Analítica Cuantitativa*. Kapelus, Buenos Aires.

Estimación de la incertidumbre de la medición para la determinación de proteínas en alimentos por el método de Kjeldahl

Kelim Vano H.^a, Ygmar Jiménez^{*,a}, Maira G. de Núñez^b

^aDepartamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo

^bDivisión Físico-Química, Fundación Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE)

Resumen.-

En la evaluación de los alimentos, la determinación de proteínas resulta de gran utilidad para el sector agroindustrial porque a través de ella se puede definir la calidad y valor nutricional, de allí la importancia del resultado analítico y el interés de que sea conocido con certeza. Con la finalidad de conocer y cuantificar las fuentes más significativas de incertidumbre, en el presente estudio se estima la incertidumbre de la medición para la determinación de proteínas en alimentos cuando se emplea el método de Kjeldahl, aplicando la metodología descrita en '*Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement - QUAM*'. Los resultados obtenidos muestran que la etapa de cuantificación constituye una de las más importantes del método, ya que las fuentes que tienen mayor contribución a la incertidumbre estándar combinada son el volumen y la concentración de ácido titulante.

Palabras clave: Incertidumbre, Proteínas, Alimentos, Kjeldahl

Estimation of the measurement uncertainty for the determination of proteins in foods by the Kjeldahl method

Abstract.-

In the food evaluation, the determination of protein is useful for the agro-industry sector because through them you can define the quality and nutritional value, hence the importance of the analytical result and the interest to know it with certainty. With the purpose of to know and quantify the most significant sources of uncertainty, the present study evaluates the measurement uncertainty in the determination of protein when using the Kjeldahl method, applying the law of uncertainty propagation described in the '*Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement - QUAM*.' The obtained results show that the quantification step is one the most important of method, since the sources that have the greatest contribution to the combined standard uncertainty are the volume and the concentration of titrant acid.

Keywords: Uncertainty, Measurement, Protein, Foods, Kjeldahl

Recibido: mayo 2010

Aceptado: febrero 2011

1. INTRODUCCIÓN

En los alimentos, la determinación de proteínas resulta de mucho interés porque permite caracterizar nutricionalmente a los alimentos, así como

también garantizar la calidad de los productos formulados comercialmente [1].

El método oficial para la determinación del contenido de proteínas en alimentos es el volumétrico [2]. Este método se basa en la digestión de la materia orgánica de la muestra, que por acción de ácido sulfúrico concentrado y calor (activado por un agente catalítico), se transforma el nitrógeno total contenido en la muestra, en sulfato de amonio. Seguidamente se lleva a cabo la

*Autor para correspondencia

Correo-e: yjimenez@uc.edu.ve (Ygmar Jiménez)

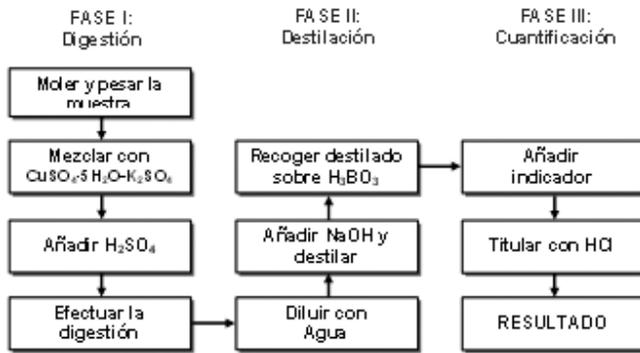


Figura 1: Determinación de proteínas en productos de cereales y leguminosas

fase de destilación con una solución fuertemente alcalina de hidróxido de sodio, con ello, se logra la liberación del nitrógeno presente en la sal de amonio, en forma de amoníaco gaseoso. El gas formado es recogido en una solución de ácido bórico, obteniéndose borato de amonio. A través de la valoración del borato de amonio con ácido clorhídrico, se determina cuantitativamente la concentración de nitrógeno (véase Figura 1). La relación entre la concentración de nitrógeno y el peso original de la muestra, multiplicado por el factor de conversión Nitrógeno-Proteínas, es el contenido de proteínas, y está definido por [2]:

$$P = \frac{Cac \times (V_m - V_b) \times PE_N}{m_m \times f_c} \times f_p \times f_{rep} \times 100, \quad (1)$$

donde, P : Contenido de proteínas en la muestra, (% m/m); C : Concentración de la solución titulante ácida, (eq·L⁻¹; V_m : Volumen de titulante consumido en la muestra, (mL); V_b : Volumen de titulante consumido en el blanco, (mL); PE_N : Peso equivalente del Nitrógeno, (14,0067 g·eq⁻¹; m_m : Masa de la muestra, (g); f_c : Factor de conversión de unidades (1000 mL·L⁻¹); f_p : Factor de conversión Nitrógeno-Proteínas, (adimensional); f_{rep} : Factor de repetibilidad del método de ensayo (adimensional).

Aunque muchas de las decisiones que se toman en el sector agroindustrial para caracterizar los alimentos están basadas en la información que aportan los resultados obtenidos al aplicar un método analítico, no es suficiente con que

dicho método esté validado, sino que el resultado está completo únicamente cuando va acompañado de un parámetro, como la incertidumbre, que defina la calidad de ese resultado obtenido. La incertidumbre, “*parámetro positivo, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pudieran ser razonablemente atribuibles al mensurando, basada en la información usada*” [3], refleja duda acerca de la veracidad del resultado obtenido una vez que se han evaluado todas las posibles fuentes de incertidumbre y que se han aplicado las correcciones oportunas; por tanto, da una idea de la calidad del resultado [4,5].

Debido a su importancia, en los últimos años ha sido objeto de estudio y aplicación en diversos métodos analíticos, tales como: determinaciones gravimétricas [6]; potenciométricas [7, 8]; espectroscópicas y/o espectrométricas que incluye las técnicas de Absorción Atómica (AAS) [9], Emisión Atómica (AES), Absorción Molecular, Infrarrojo (IR) y Masas (MS) [10], Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [11]; y las cromatográficas, entre las que se encuentran las técnicas de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) [12, 13, 14], Cromatografía de Gases con Detector de Masas (GC-MS) [15, 16] y Cromatografía Líquida Iónica [17].

Este trabajo contribuye a mejorar la comprensión de los componentes de incertidumbre cuando se determina el contenido de proteínas en alimentos por el método de Kjeldahl. Con la finalidad de conocer y cuantificar las fuentes más significativas de incertidumbre, se aplicó en el presente estudio una estimación de acuerdo con la metodología definida en el documento ‘*Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement – QUAM*’ [18], el cual fue desarrollado para el tratamiento de las mediciones analíticas bajo el cumplimiento de los lineamientos establecidos en la ‘*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements – GUM*’ [3].

2. METODOLOGÍA

El proceso de estimación de la incertidumbre se llevó a cabo en los siguientes pasos [18]:

2.1. Análisis del proceso de medición

Primero se dio una especificación del mensurando, donde se incluyó una definición clara de lo que se mide, conteniendo la relación entre el mensurando y las cantidades de las que depende el mensurando (Ecuación 1), de acuerdo a lo indicado en el método de ensayo COVENIN 1195:1980 [2]. Posteriormente, se realizó una identificación de todas las posibles fuentes de incertidumbre efectuando un análisis causa-efecto [18].

2.2. Estimación de la incertidumbre estándar

Se realizó la cuantificación de los componentes de la incertidumbre considerando cada fuente por separado para obtener la contribución de dicha fuente. Cada una de las contribuciones separadas de la incertidumbre es conocida como un componente de la misma. Cuando un componente es expresado como una desviación estándar, este componente de la incertidumbre es conocido como una “incertidumbre estándar”. Tal como se establece en la GUM [3], la incertidumbre se agrupó en dos categorías; los componentes tales como observaciones repetidas independiente fueron evaluados según la distribución estadística de una serie de mediciones y caracterizados por la desviación estándar (incertidumbre estándar tipo A) [18]. Los otros componentes no provenientes de una serie de mediciones, también fueron caracterizados por las desviaciones estándar, pero evaluados asumiendo alguna función de distribución, tal como la distribución rectangular, triangular o Gaussiana, con base a la experiencia u otros juicios y criterios científicos (incertidumbre estándar tipo B) [18].

2.3. Estimación de la incertidumbre estándar combinada y expandida

Una desviación estándar total, conocida como incertidumbre estándar combinada (u_c), es estimada como la raíz cuadrada positiva de la variación total obtenida al combinar todos los componentes de la incertidumbre, usando la ley de propagación de incertidumbres [3]:

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N u_i^2(y) = \sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u_i^2(x_i). \quad (2)$$

La incertidumbre expandida (U) se obtuvo de multiplicar la incertidumbre estándar combinada (u_c) por el factor de cobertura apropiado, en este caso $k = 2$, para una distribución normal y nivel de confianza de 95 % [3].

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Análisis del proceso de medición

La definición del mensurando y el análisis del proceso de medición en la determinación de proteínas, cuyos detalles se encuentran en la literatura [2], permitieron definir y analizar los principales factores que tienen un impacto en la definición del mensurando.

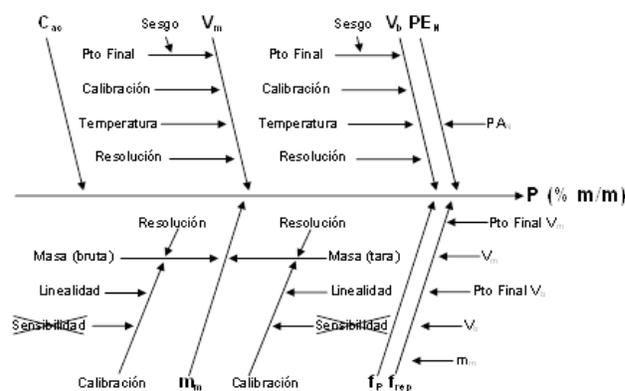


Figura 2: Fuentes de incertidumbre en la determinación de proteínas en productos de cereales y leguminosas (método de Kjeldahl) [P: Contenido de proteínas en la muestra (% m/m); C_{ac} : Concentración de la solución titulante de HCl ($\text{eq}\cdot\text{L}^{-1}$); V_m : Volumen de titulante consumido en la muestra (mL); V_b : Volumen de titulante consumido en el blanco (mL); PE_N : Peso equivalente del Nitrógeno; m_m : Masa de la muestra (g); f_P : Factor de conversión Nitrógeno-Proteínas (adimensional); f_{rep} : fuente de incertidumbre debida a la repetibilidad del método de ensayo (adimensional)].

El diagrama causa-efecto de la Figura 2 muestra las fuentes de incertidumbre en la determinación de proteínas, mientras que en el diagrama causa-efecto de la Figura 3 se detallan las fuentes de incertidumbre para la determinación de la concentración de la solución titulante de HCl (C_{ac}), obtenida por medio de la estandarización con una base patrón primario.

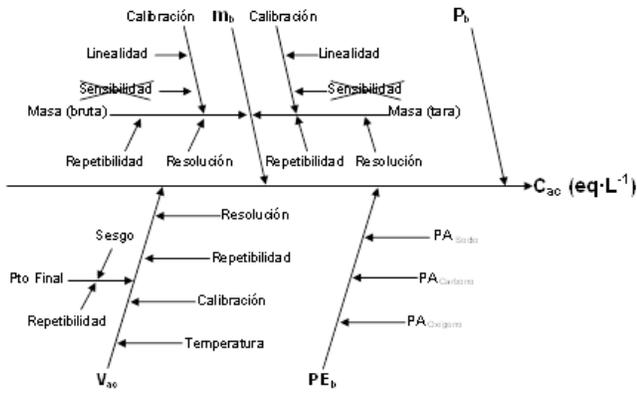


Figura 3: Fuentes de incertidumbre en la determinación de la concentración de una solución de ácido clorhídrico estandarizada con carbonato de sodio como patrón primario [C_{ac} : Concentración de HCl ($\text{eq}\cdot\text{L}^{-1}$); m_b : Masa de la base patrón primario (g); P_b : Pureza de la base patrón primario (adimensional); PE_b : Peso equivalente de la base patrón primario – Na_2CO_3 ($\text{g}\cdot\text{eq}^{-1}$); V_{ac} : Volumen de HCl consumido (mL)].

3.2. Cálculo de la incertidumbre estándar para cada uno de los factores que afectan la incertidumbre en la determinación de proteínas:

3.2.1. Función calibración de la balanza – incertidumbre estándar tipo B (u_{lin}, u_{sen}):

La función calibración de la balanza tiene dos fuentes potenciales de incertidumbre identificadas como la sensibilidad de la balanza y su linealidad [18]. La fuente debida a la sensibilidad puede ser despreciada cuando la masa es determinada por diferencia de pesadas sobre una misma escala de la balanza y en un rango o límite muy pequeño [18]. La contribución debida a la linealidad (L) y la sensibilidad (S) obtenida del certificado de calibración de la balanza son estimadas, asumiendo una distribución uniforme, por lo tanto, la contribución debida a la calibración de la balanza viene dada por la suma cuadrática de las contribuciones L y S [18]:

$$U_{lin}^2 = \frac{L^2}{3} \tag{3}$$

$$U_{sen}^2 = \frac{S^2}{3} \tag{4}$$

3.2.2. Resolución de un instrumento – incertidumbre estándar tipo B (u_{res}):

La habilidad de un instrumento de medición para responder a los cambios de la cantidad que está siendo medida puede ser considerada como la incertidumbre de la medición debido a la resolución. En los instrumentos digitales puede ser considerada como $\pm \frac{1}{2}$ de la menor diferencia que puede haber entre dos lecturas de una indicación de la pantalla del instrumento. En los instrumentos analógicos es la $\pm \frac{1}{2}$ de la diferencia que puede haber entre dos marcas. Si esta diferencia en el instrumento es δx , el valor del estímulo que produce una indicación x dada puede localizarse en igual probabilidad en cualquier lugar del intervalo $x - \delta x/2$ a $x + \delta x/2$ [3]. El estímulo es entonces descrito mediante una distribución de probabilidad uniforme de anchura δx con una varianza dada por [3]:

$$U_{res}^2 = \frac{(\delta x/2)^2}{3} \tag{5}$$

3.2.3. Repetibilidad de un instrumento o del método de ensayo – incertidumbre estándar tipo A (u_{rep}):

La evaluación de la incertidumbre tipo A es normalmente usada para obtener un valor de la repetibilidad o aleatoriedad de las mediciones. La desviación estándar experimental de la media de una serie de mediciones ($S_{(\bar{x})}$) puede ser tomada directamente como incertidumbre estándar Tipo A [18]:

$$U_{rep} = S_{(\bar{x})} \tag{6}$$

La contribución de la repetibilidad del método de ensayo a la incertidumbre puede ser obtenida de resultados de pruebas colaborativas a través de la desviación estándar de reproducibilidad interlaboratorios S_R [5, 18]:

$$U_{rep} = S_R \tag{7}$$

3.2.4. Función calibración del material volumétrico – incertidumbre estándar tipo B (U_{cal}):

Los fabricantes de material volumétrico especifican los errores máximos permitidos (emp)

a la temperatura de 20°C sin definir el nivel de confianza o la información del tipo de distribución. La contribución, asumiendo una función de distribución triangular para convertirla a la incertidumbre estándar, puede calcularse de acuerdo a la ecuación [18]:

$$u_{cal}^2 = \frac{emp^2}{6}. \quad (8)$$

3.2.5. Temperatura en la medición del volumen – incertidumbre estándar tipo B (u_{tem}):

De acuerdo a los fabricantes de material volumétrico, se especifica que los mismos son calibrados a la temperatura de 20°C, mientras que la temperatura del laboratorio varía dentro de unos límites. La incertidumbre proveniente de este efecto se calcula estimando el rango de variación de la temperatura (ΔT) del laboratorio y el coeficiente de expansión del volumen. La expansión del volumen del líquido es considerablemente más grande que la del material [18]. Empleando un coeficiente de expansión del agua (α) de $2,1 \times 10^{-4} \text{C}^{-1}$, la contribución para el volumen medido (V), empleando una distribución rectangular para convertirla a la incertidumbre estándar puede calcularse de acuerdo a la ecuación [18]:

$$u_{temp}^2 = \frac{(\Delta T_{lab} \times \alpha \times V)^2}{3}. \quad (9)$$

3.2.6. Sesgo del punto final de la titulación – incertidumbre estándar tipo B (u_{tem}):

El método de ensayo establece la detección del punto final a través de un cambio de color empleando un indicador, ahora bien, la sensibilidad del indicador a los cambios de pH durante la reacción y la habilidad del analista en la detección del cambio de color introducen una diferencia sistemática entre el punto final y el punto de equivalencia (sesgo del punto final) [18]. Una comparación entre el resultado obtenido para el punto final por el método visual con el obtenido por el método potenciométrico indicó una diferencia o sesgo del punto final de $-0,033\text{mL}$, y dado de que no existe evidencia del tipo de distribución, se empleó una distribución

rectangular para convertirla a la incertidumbre estándar, de acuerdo a la ecuación:

$$u_{sgo}^2 = \frac{sesgo^2}{3}. \quad (10)$$

3.2.7. Pureza de un reactivo – incertidumbre estándar tipo B (u_{pur}):

La pureza de un reactivo es citada en el catalogo o envase del reactivo donde se especifica que la misma debe estar dentro de unos límites definidos por las impurezas, por consiguiente, la contribución debida a la pureza de un reactivo son estimadas asumiendo una distribución uniforme y viene dada por [18]:

$$u_{pur}^2 = \frac{impuresas^2}{3}. \quad (11)$$

3.2.8. Peso equivalente – incertidumbre estándar tipo B (u_{PE})

La incertidumbre del peso equivalente (PE) de una sustancia es determinada, de acuerdo a la ecuación (12), en función del número de átomos (n_i), la incertidumbre de los pesos atómicos ($u_{peso\ atomico}$) de los elementos que constituyen la sustancia y el factor de equivalencia (α). La incertidumbre del Peso Atómico es obtenida directamente de la tabla de pesos atómicos publicada por la Unión Internacional de la Química Pura y Aplicada (IUPAC) [19] y la contribución se obtiene empleando una distribución rectangular para convertirla a la incertidumbre estándar, de acuerdo a la ecuación (13) [18]:

$$u_{PE} = \frac{\sum_i n_i \cdot u_{PA_i}}{\alpha}, \quad (12)$$

$$u_{PA} = \frac{u_{peso\ atomico}^2}{3}. \quad (13)$$

3.2.9. Factor de conversión Nitrógeno-Proteínas – incertidumbre estándar tipo B (u_{fp}):

En el caso particular de la determinación de proteínas es común el uso de un factor de conversión del contenido de nitrógeno orgánico a proteínas, que es lo que en realidad se determina. Dicho factor, cuyo valor se estima considerando el porcentaje de nitrógeno que contiene la proteína en los alimentos, constituye una potencial

fuelle de incertidumbre debido a que la fracción analizada no necesariamente es proteína pura, adicionalmente se desconoce si su estimación proviene del redondeo o truncamiento. Si la última cifra significativa del factor de proteínas es δ , la incertidumbre es entonces descrita mediante una distribución de probabilidad uniforme de anchura δ con una varianza dada por:

$$u_{f_p} = \frac{\left(\frac{\delta}{2}\right)^2}{3}. \quad (14)$$

3.3. Cálculo de la incertidumbre estándar combinada (u_c) y la incertidumbre expandida (U):

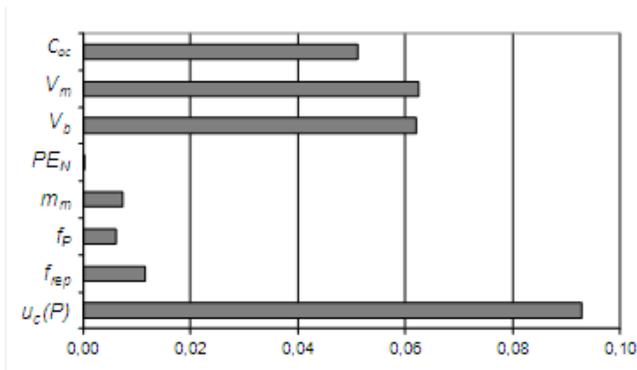


Figura 4: Contribuciones a la incertidumbre estándar combinada en la determinación de proteínas en alimentos ($u_{c(P)}$) [P : Contenido de proteínas en la muestra (% m/m); C_{ac} : Concentración de la solución titulante de HCl ($\text{eq}\cdot\text{L}^{-1}$); V_m : Volumen de titulante consumido en la muestra (mL); V_b : Volumen de titulante consumido en el blanco (mL); PE_N : Peso equivalente del Nitrógeno; m_m : Masa de la muestra (g); f_p : Factor de conversión Nitrógeno-Proteínas (adimensional); f_{rep} : fuente de incertidumbre debida a la repetibilidad del método de ensayo (adimensional)].

Los datos correspondientes a cada parámetro de entrada para la determinación de proteínas se resumen en la Tabla 1, mientras que en la Tabla 2 se presentan los detalles de la estandarización de la solución de ácido titulante. En las Figuras 4 y 5 se muestran las contribuciones a la incertidumbre.

Las contribuciones representadas en la Figura 4 muestran que el mayor aporte a la incertidumbre estándar combinada en la determinación de proteínas lo proporcionan las variables V_m y V_b , seguida de la contribución de la concentración de

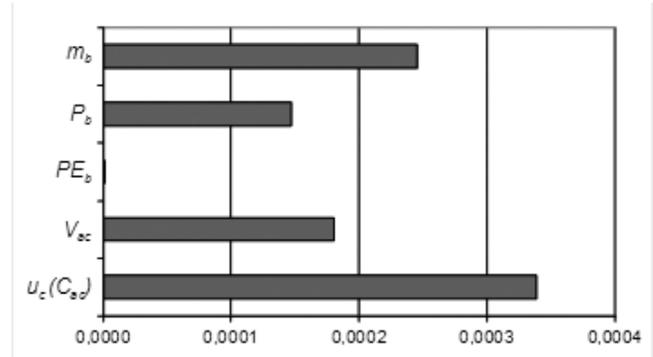


Figura 5: Contribuciones a la incertidumbre estándar combinada en la determinación de la concentración de HCl por estandarización con Na_2CO_3 $u_{c(C_{ac})}$. [m_b : Masa de la base patrón primario (g); P_b : Pureza de la base patrón primario (adimensional); PE_b : Peso equivalente del Na_2CO_3 ; V_{ac} : Volumen del ácido consumido (mL)]

la solución titulante de HCl C_{ac} ; la incertidumbre debida la masa de la muestra m_m , factor de proteínas f_p y factor de repetibilidad del método f_{rep} tienen una influencia menos significativa sobre la incertidumbre estándar combinada. En cuanto a la variable, peso equivalente del nitrógeno PE_N , ésta no representa una fuente significativa para la incertidumbre estándar combinada. Al evaluar detalladamente las sub-contribuciones individuales para las variables V_m y V_b (véase Tabla 1), se encuentra que el mayor aporte a la incertidumbre estándar combinada lo constituye la calibración de la bureta seguido por el sesgo producido en la de detección del punto final.

En cuanto a la mayor contribución a la incertidumbre estándar combinada en la determinación de la concentración de la solución de ácido clorhídrico titulante C_{ac} se observa que, tal como se muestra en la Figura 5, ésta está influenciada principalmente por la masa de la base patrón primario m_b seguida por la contribución del volumen de ácido titulante consumido V_{ac} y por la pureza del patrón primario P_b .

Tabla 1: Contribución de las fuentes de incertidumbre en la determinación de proteínas (P, % *m/m*)

Variable	Estimado	Fuente de incertidumbre	Evaluación	Incertidumbre original	Distribución	Incertidumbre estándar u_i
Concentración de la solución de HCL (C_{ac})	0,10152 eq·L ⁻¹	(ver Tabla 2)	B	0,00068eq·L ⁻¹	Normal	0,00034eq·L ⁻¹
Volumen de titulante consumido en la muestra (V_m) (mL)	6,10	Calibración	B	0,075	Triangular	0,0306
		Temperatura	B	0,0064	Rectangular	0,0037
		Resolución	B	0,05	Rectangular	0,0144
		Sesgo. Pto. Final	B	0,033	Rectangular	0,0191
Volumen de titulante consumido en el blanco (V_b) (mL)	1,30	Calibración	B	0,075	Triangular	0,0306
		Temperatura	B	0,0014	Rectangular	0,0008
		Resolución	B	0,05	Rectangular	0,0144
		Sesgo Pto. Final	B	0,033	Rectangular	0,0191
Peso equivalente del Nitrógeno ($g \cdot eq^{-1}$)	14,0067	Obtención del PA	B	0,0002	Rectangular	0,00012
Masa de la muestra (M_m) (g)	0,5557	Resolución	B	0,0001	Rectangular	0,0000289
Factor de conversión Nitrógeno – Proteínas f_P	6,25	Linealidad	B	0,00065	Rectangular	0,0003754
		Obtención del factor	B	0,005	Rectangular	0,00144
Factor de repetibilidad del método (f_{rep})	1	Repetibilidad	A	0,00150	Normal	0,00150

Tabla 2: Contribución de las fuentes de incertidumbre en la determinación de la concentración de una solución de ácido clorhídrico estandarizada con carbonato de sodio como patrón primario (C_{ac} , $eq \cdot L^{-1}$)

Variable	Estimado	Fuente de incertidumbre	Evaluación	Incertidumbre original	Distribución	Incertidumbre estándar, u_i
Masa de la base patrón primario (m_b) (g)	0,2206 g	Repetibilidad	A	0,00007 g	Normal	0,0000700
		Resolución	B	0,0001 g	Rectangular	0,0000289
		Linealidad	B	0,00065	Rectangular	0,0003753
Pureza de la base patrón primario P_b	0,9975	Impurezas	B	0,0025	Rectangular	0,00144
Peso equivalente del Na_2CO_3 (PE_b) ($g \cdot eq^{-1}$)	52,99422	Obtención de los Pesos Atómicos	B	0,00035	Normal	0,00035
Volumen del ácido consumido V_{ac} (mL)	40,90	Calibración	B	0,075 mL	Triangular	0,0306
		Repetibilidad	A	0,0067	Normal	0,0067
		Resolución	B	0,05	Rectangular	0,0144
		Temperatura	B	0,043	Rectangular	0,0248
		Sesgo Pto. Final	B	0,033	Rectangular	0,0191
		Repet. Pto. Final	A	0,056	Normal	0,0560

Tabla 3: Resultados del análisis de la incertidumbre en la determinación de proteínas en alimentos

Variable	Tipo de muestra	Mensurando, P	Incertidumbre estándar combinada, $u_c(P)$	Incertidumbre expandida, $U_{(P)}$ con $k = 2$	Incertidumbre relativa expandida $U_{(P)}/P$ con $k = 2$
Proteínas, % m/m	Harina de maíz precocida	7,68	0,093	0,19	2,5

En cuanto a la variable del peso equivalente de la base PE_b , es notable que ésta fuente no es significativa. Al evaluar detalladamente las subcontribuciones individuales para la variable masa (en este caso masa del patrón primario, m_b) (véase Tabla 2), se observa que el mayor aporte a la incertidumbre estándar combinada lo provoca el efecto que ejerce la linealidad de la balanza sobre la medición de la masa, tal como fue reportado en un trabajo anterior [6], este efecto podría ser disminuido por un ajuste diario de la balanza. Por otra parte, para la variable V_{ac} (véase Tabla 2) se encuentra que el mayor aporte a la incertidumbre estándar combinada lo constituye el efecto que ejerce la repetibilidad en la detección del punto final, así como también la calibración de la bureta y el efecto de la temperatura sobre la medición del volumen gastado en la estandarización.

La incertidumbre estándar combinada fue estimada a través de la ley de propagación de incertidumbres, empleando la ecuación (2) [3]. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

4. CONCLUSIONES

Se estimó la incertidumbre de la medición para la determinación de proteínas en alimentos (método de Kjeldahl) siguiendo la metodología descrita en *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (QUAM)* obteniéndose que la incertidumbre expandida relativa, para un nivel de confianza de aproximadamente 95 % con $k = 2$, es del 2,5 %. Esta metodología, que tiene la ventaja de, estimar la incertidumbre asociada del resultado de medición y reconocer las fuentes de incertidumbre más significativas, permite también a su vez, identificar oportunidades de mejora en el desempeño del método de ensayo bajo evaluación, en este caso, en la determinación de proteínas en alimentos por el método de Kjeldahl, la incertidumbre estándar combinada está principalmente determinada por la medición del volumen (calibración del material volumétrico) y por la calidad de la estandarización del ácido titulante utilizado en la fase de cuantificación (volumen de ácido consumido, pureza del patrón primario y masa del patrón primario). Por lo

tanto, al estimar la incertidumbre de la medición en una determinación volumétrica en particular, es necesario tomar en cuenta que, debido a que la calibración del material volumétrico, la linealidad de la balanza (calibración) y la pureza de los reactivos constituyen las fuentes de incertidumbre más significativas, es aconsejable el empleo de material volumétrico Clase A calibrado, calibrar periódicamente de la balanza, así como también, usar reactivos de alta pureza y emplear el método potenciométrico para determinar el punto final de la titulación, todo ello con el fin de garantizar la calidad de la medición. Adicionalmente, en ésta determinación, el peso equivalente no contribuye significativamente a la incertidumbre de la medición.

Referencias

- [1] Colombato D. (2003). Análisis de alimentos: Aplicaciones prácticas. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- [2] COVENIN 1195 (1980). Alimentos. Determinación de nitrógeno, Método de Kjeldahl, Fondonorma, Caracas, Venezuela.
- [3] JCGM 100 (2008). Evaluation of measurement date - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM). Cerdex, France.
- [4] Maroto, A., R. Boqué, J. Riu, F. Rius (2001). Incertidumbre y Precisión. Técnicas de Laboratorio. ISSN 0371-5728. n° 266, pp 834-837.
- [5] Maroto, A. (2002). Incertidumbre en métodos analíticos de rutina (Tesis Doctoral). Facultat de Química, Universitat Rovira i Virgili. Tarragona, España.
- [6] Vano, K., Y. Jiménez, M.G. de Núñez (2009). Evaluación de la Incertidumbre en la determinación Gravimétrica de Humedad, Cenizas, Grasa y Fibra Cruda. Revista Ingeniería UC, Vol. 16, n° 2, pp. 27 – 33.
- [7] Mathew, K. L. et al (2009). Uranium assay determination using Davis and Gray titration: an overview and implementation of GUM for uncertainty evaluation. J Radioanal Nucl Chem, Vol. 282, pp. 939 – 944.
- [8] Rmanjaneyulu, P.S. et al (2010). Estimation of uncertainty in measurement of boron in Zr-Nb alloy samples by BF₄⁻ ion selective electrode. Accred Qual Assur, Vol. 15, pp. 665 – 671.
- [9] Duta S. et al (2007). Practical aspects of the uncertainty and traceability of spectrochemical measurement results by electrothermal atomic absorption spectrometry. Spectrochimica Acta Part B, Vol. 62, pp. 337 – 343.

- [10] Dobiliené, J. et al (2010), Uncertainty of measurement in spectrometric analysis: A case study. *Measurement*, Vol. 43, pp. 113 – 121.
- [11] Al-Deen, T.S. et al (2004). An uncertainty budget for the determination of the purity of glyphosate by quantitative nuclear magnetic resonance (QNRM) spectroscopy. *Accred Qual Assur*, Vol. 9, pp. 55 – 63.
- [12] Kristl, J. et al (2007). Evaluation of measurement uncertainty in the determination of iasmonic acid in *Lemna minor* L. by liquid chromatography with fluorescence detection. *Accred Qual Assur*, Vol. 12, pp. 303 – 310.
- [13] Drolc, A., A. Pintar (2011). Measurement uncertainty evaluation and in-house method validation of the herbicide iodosulfuron-methyl-sodium in water samples by using HPLC analysis. *Accred Qual Assur*, Vol. 16, pp. 21 – 29.
- [14] Dias, M.G. et al (2008). Uncertainty estimation and in-house method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production. *Food Chemistry*, Vol. 109, pp. 815 – 824.
- [15] Shegunova, P. et al (2008). Estimation of measurement uncertainty in organic analysis: two practical approaches. *Accred Qual Assur*, Vol. 13, pp. 11 – 18.
- [16] Leung, G.N.W., et al (2007). A bottom-up approach in estimating the measurement uncertainty and other important considerations for quantitative analyses in drug testing for horses. *J. Chromatography A*, Vol. 1163, pp. 237 – 246.
- [17] Campos Giménez, E., T. Bénet, L. Spak (2004). The uncertainty in the calculation of the amount of blocked and reactive lysine in milk products, as determined by the furosine method. *Accred Qual Assur*, Vol. 9, pp. 605 – 614.
- [18] EURACHEM/CITAC. (2000). *Quantifying uncertainty in analytical measurement*, Second Edition. Laboratory of the Government Chemistry, London, UK.
- [19] IUPAC. (2007). *Periodic Table of the Elements*. http://old.iupac.org/reports/periodic_table/.
Fecha de consulta: 30/04/2011



Metodologías aplicadas para el establecimiento de los niveles de referencia para metales pesados en la evaluación de la contaminación en suelos

Julissa Brizuela*, Ygmar Jiménez

Departamento de Química, Facultad de Ciencia y Tecnología,
Universidad de Carabobo, Carabobo, Venezuela

(*) jbrizuela@uc.edu.ve

Recibido: 29/02/2012

Revisado: 18/07/2012

Aceptado: 22/08/2012

Resumen

Para el estudio de suelos potencialmente contaminados por metales pesados es necesario definir los máximos niveles admisibles (niveles de referencia, NR), que no representan riesgo a la salud. Debido a que en los suelos no solo existe la adición antrópica, sino que existe un contenido natural de metales (niveles de fondo), propio de cada región edafogeológica, se recomienda establecer NR particulares para cada zona geográfica. Actualmente no existe una metodología única utilizada para establecer los NR para los metales en suelos, por lo que se planteó como objetivo de este estudio recopilar información sobre las diferentes metodologías aplicadas, lo que conllevó a construir un esquema general que engloba las metodologías más comunes.

Palabras clave: contaminación de suelos; metales pesados; niveles referencia.

Abstract

New maximum permissible levels (reference levels RL) for the study of potentially contaminated soils by heavy metals were defined. Despite of anthropogenic contaminants in soils, there is also presented a certain amount of natural metals (background levels) in these soils according to the proper geographic region, which encouraged us to establish particular RL for the metals in soils. Currently, there is not an unique methodology to establish the RL for metals in soils, thus this study intend to review information on different methodologies applied to define RL. A general scheme covering all methodologies are presented.

Keywords: Soil contamination; Heavy metals; Reference levels

Introducción

La contaminación de un suelo no sólo supone en sí misma una pérdida de un recurso natural, sino que, además existe el riesgo de que los contaminantes presentes en el suelo pueden alcanzar determinados receptores (agua, aire, plantas, humanos) provocando efectos negativos en los mismos^{1,2}. La forma más relevante de contaminación de suelos es debido a derivados del petróleo y metales pesados³. La mayor atención a este tipo de contaminación se ha dirigido al sector agrícola, donde la contaminación por metales pesados, es provocada por una mala gestión agrícola, vertidos industriales, tráfico pesado, entre otras causas⁴⁻⁷. La valoración de la contaminación del suelo por metales pesados junto con la adopción de valores estándar, es fundamental para mantener las funciones agrícolas y ecológicas de los suelos, llegando a constituirse un indicador de la calidad del suelo, decisivo en relación con los riesgos de toxicidad⁸⁻¹¹.

La tarea de demostrar que un suelo está contaminado, no es fácil, en especial si se trata de metales pesados, ya que su

presencia en el suelo puede tener un origen natural o antrópico. Por lo tanto, es necesario distinguir entre los denominados niveles de fondo (background) y los niveles de referencia (NR) o carga crítica de un suelo, con el fin de deducir si existe la necesidad de un estudio analítico de la contaminación, en función del uso^{7,12}. El término de Nivel Genérico de Referencia (NGR), es definido para cada sustancia como la concentración límite en el suelo que se traduce en un riesgo admisible a la salud humana. Los NGR para las diferentes sustancias contaminante van a ser una herramienta fundamental en la gestión de suelos contaminados, pues van a delimitar aquellos suelos en los que razonablemente no se van a producir efectos (no contaminados), de los que pueden resultar más problemáticos (potencialmente contaminados), en cuyo caso es obligado un estudio más detallado para precisar si se declara o no como contaminado¹³⁻¹⁵. En la figura 1 se muestra la relación entre el riesgo admisible, los niveles de referencia y la contaminación de suelos.



Fig. 1: Los niveles de referencia en la definición de suelos contaminados.

La EPA¹⁶ ha propuesto un conjunto de ecuaciones para el cálculo de los NGRs en función de distintos escenarios (residencial, industrial, agrícola, etc), vías de exposición (ingestión del suelo, contacto dérmico; inhalación) y tipo de contaminante¹⁷, utilizando criterios toxicológicos y ecotoxicológicos; es un método que requiere del cálculo de varios parámetros, con datos, preferiblemente locales, generados por otros entes (como la ATSDR, FDA, investigaciones epidemiológicas, etc) u otras investigaciones¹⁸⁻²¹, lo que muchas veces es de difícil acceso. La EPA también suministra junto con el modelo, valores por defecto, con lo que se logran algunas aproximaciones, facilitando el cálculo en aquellos casos donde no se dispone de algunos de los parámetros requeridos.

Con el objetivo de simplificar y hacer sustentable el procedimiento de obtención de estos valores de referencia, el Real Decreto de España RD 9/2005 ha propuesto que, cuando la Comunidad Autónoma no disponga de niveles genéricos de referencia para metales pesados ni sea posible la realización de análisis de riesgos, el cálculo de los NGRs se haga mediante la adición de dos veces la desviación estándar a la media aritmética, obtenida con el análisis de contenidos totales de metales en suelos no contaminados, independientemente de la distribución de la población que se utilice²².

Entre las principales ventajas del uso de los NGRs, se encuentra que: constituyen una buena aproximación económica y preventiva, para la evaluación de procesos de contaminación a nivel de fase exploratoria. Cuando esos niveles se superan, es obligatoria una investigación detallada. Además, constituyen referentes fundamentales para la investigación y gestión de suelos potencialmente contaminados.

Entre las principales limitaciones del uso de los NGRs, se encuentra que: para su obtención no toman en cuenta las numerosas reacciones y equilibrios multifase que tienen

lugar en el suelo y que controlan la dinámica de los metales pesados. Por otra parte, hacen referencia a contenidos totales de metales pesados en el suelo y no a concentraciones biodisponibles, siendo esta última la que indica la movilidad del metal y por ende, es lo que rige la toxicidad del metal. Por lo que, en países como Noruega ya han adoptado en su normativa de suelos contaminados valores límites para la biodisponibilidad de los metales pesados^{1,23,24}.

Los niveles de referencia específicos (NRE) se establecen a partir de los niveles de fondo y rectas de regresión, las cuales establecen la relación entre los contenidos de metales y las propiedades edáficas²⁵. Estos valores de referencia son más realistas, puesto que al considerar las propiedades edáficas, tienen en consideración la capacidad amortiguadora del suelo hacia los procesos de contaminación por metales pesados¹³.

En Holanda, país pionero en el desarrollo de metodologías para la determinación y valoración de riesgo, se han desarrollado niveles de referencia para metales pesados en función de la fracción de arcilla y/o contenido en materia orgánica, y se calculan mediante ecuaciones de regresión lineal en las que se considera un suelo estándar con 25% de arcilla y 10% de materia orgánica, teniendo en cuenta los niveles de fondo de los suelos holandeses^{8,21}. Esta normativa no se puede aplicar en países mediterráneos o en Venezuela, porque los suelos son muy diferentes.

El fondo geoquímico natural (niveles de fondo, *geochemical background*), representa la concentración de un elemento químico en suelos no contaminados. Como este valor es prácticamente imposible de obtener, ya que actualmente no existen suelos vírgenes no contaminados en el mundo, se utilizan los denominados niveles de fondo geoquímico (*geochemical baseline*)²⁶, que representan una medida de las variaciones geoquímicas superficiales, tal como se encuentran en el momento de realizar la toma de muestra. Como estos valores pueden estar influenciadas por la litología del subsuelo y afectadas por el contenido geoquímico de la unidad geotectónica donde se encuentra, se determina también los fondos geoquímicos regionales (*regional geochemical baseline*)^{21,27-29}.

El establecimiento de niveles de fondo para un territorio, constituye una poderosa arma para la planificación ambiental y para las políticas de Salud Ambiental. Sirve de base para documentar, cualquier procedimiento para declarar un suelo como contaminado^{13,17,30}.

Actualmente la mayoría de los países se encuentran en una fase temprana en el registro e identificación de emplazamientos contaminados. Dinamarca, Suiza y Alemania se encuentran entre los países que han identificado gran parte del total de sus lugares contaminados. En Holanda,

Estados Unidos, Alemania y Suiza se han establecido niveles de referencia con rango normativo. En España tienen rango normativo las comunidades del País Vasco, Madrid y Aragón, y otras están en proceso de aprobación, como en Galicia, Murcia y Cataluña²⁹.

La investigación orientada hacia la gestión de suelos contaminados, ha recibido mucho apoyo del sector económico europeo, debido a los elevados costos relacionados con los proyectos de descontaminación. A pesar del avance logrado, existen algunas lagunas a nivel mundial sobre los niveles o valores de calidad de suelos. Por ejemplo, no existe una metodología única, explícita y estandarizada para la calidad de los suelos evaluada con respecto a metales pesados³¹.

En Venezuela, al revisar la política ambiental se encuentra que existe un amplio marco legal, que incluye la protección del recurso agua, aire y suelo³², pero no hay normativas específicas que reglamenten la protección del

suelo como resultado de la contaminación antropogénica por metales pesados.

En el cuadro 1 se presenta un resumen de la legislación ambiental de mayor interés para el sector industrial de Venezuela, dirigidos a la prevención y control de la contaminación del recurso suelo.

El presente trabajo está orientado a recopilar información sobre las diferentes metodologías aplicadas, para establecer los niveles de referencia para metales pesados en suelos. Dicha información, servirá de orientación en la discusión de nuevas normativas para suelos o para fijar criterios en posteriores estudios ambientales relacionados con la caracterización de la contaminación en un suelo de uso agrícola o industrial potencialmente contaminado por metales pesados, en Venezuela o en cualquier otro país donde no se hayan fijado criterios para establecer niveles de referencia para metales pesados en suelos.

Cuadro 1: Resumen de la normativa ambiental venezolana relacionadas con la prevención y control de la contaminación del recurso suelo

Norma		Breve Descripción
Ley sobre sustancias y materiales peligrosos (año 2001)		Regula la generación, uso, recolección, almacenamiento, transporte, tratamiento y disposición final de las sustancias, materiales y desechos peligrosos
Ley Forestal de suelos y aguas (año 1966)		Rige la conservación, fomento y aprovechamiento de los recursos naturales y sus productos. Fue modificada a través de la Ley de Suelos y Aguas (año 1977)
Decreto 1.257 (año 1996)		Dicta las normas sobre Evaluación ambiental de actividades susceptibles de degradar el ambiente, establecer la obligatoriedad de los estudios de impacto ambiental de proyectos de rellenos sanitarios y de seguridad.
Decreto 2.635 (año 1998)		Norma para el control de la generación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos. Regula la recuperación de materiales y el manejo de los desechos cuando estos tienen características, composición o condiciones peligrosas, representando una fuente de riesgos a la salud y el ambiente.

Adaptado de la referencia 32

Metodologías utilizadas para establecer Niveles de Referencia

La metodología seguida para la definición de los niveles de referencia, es científicamente muy rigurosa, de manera general incluye los siguientes grupos de tareas^{13,17,25}:

La descripción detallada de cada una de estas etapas resulta de vital importancia para garantizar las conclusiones extraídas del estudio. Entre los puntos más importantes relacionados con las metodologías revisadas, se pueden destacar:



Muestreo y mediciones:

Los puntos de muestreo se deben realizar atendiendo a que, deben ser suelos sin contaminación previsible (zonas alejadas de núcleos industriales y vías de alta densidad de tráfico) y la unidad morfológica a la que pertenece la muestra debe ser lo más representativa posible. Para la localización de las muestras es indispensable el apoyo de diversos mapas cartográficos edafológicos y geológicos disponibles a escalas de 1.400.000; 1.200.000 y 1.500.000. Aplicar un muestreo de tipo estratificado aleatorio, el cual permite estimar el error de muestreo. A la vez que se recomienda trabajar con muestras compuestas (5-10 submuestras) de la capa arable (0-20 cm ó 50 cm superficial). Cuando no se tiene conocimiento de la distribución de los contenidos de metales, es útil determinar el tamaño de muestra óptimo¹⁵. Y muchas veces es necesario un estudio tipo piloto (*screening*). La digestión de la muestra se realiza por microondas o con agua regia. Se requiere la utilización de técnicas analíticas

confiables, validadas, y los niveles de detección y especificidad necesarios²³, comúnmente se utiliza espectroscopia de absorción atómica (AA) o la espectroscopia de emisión acoplado inductivamente a plasma (ICP) o una cámara de grafito.

Métodos estadísticos más utilizados:

Análisis estadístico Univariante (media, mediana, Desviación Estándar (DE), gráfico box-plot, histogramas, Test de normalidad Kolmorov-Smirnov, otros); Análisis de varianza y pruebas de significación; Análisis Estadístico Multivariante (Análisis de Componentes Principales; Análisis de Clúster y Análisis Discriminante Lineal).

El criterio estadístico para la derivación de los niveles de referencia, dependerá de las características edafológicas específicas en un área geográfica y del tipo de distribución de los datos de concentración de metales³³. En la tabla 1 se muestran algunos de los criterios estadísticos utilizados para la derivación de los niveles de referencia.

Tabla 1. Resumen de las metodologías comúnmente usadas para establecer los niveles de referencia para metales pesados en suelo.

Obtención de los datos	Metodologías según tratamiento estadístico de los datos	Características principales	Expresiones de los niveles de fondo y niveles de referencia
Determinación de contenido total de metales en zona sin contaminación previsible para determinar los niveles de fondo (X= es el valor medio del contenido del elemento traza y DE= desviación estándar)	Métodos estadísticos descriptivos	Identificación y eliminación de valores discordantes. Es favorable cuando no se sospecha una posible contaminación en la zona Identificación del tipo de distribución de los datos (prueba de normalidad)	NR=X+nDE Si la distribución de los datos es Normal NR=NF+2DE; NR=NF+3DE Si la distribución no es normal NR= [(3° I – 1° I) * 1.5]; I= intercuartil
	Gráficas Probabilísticas	Utilización de todos los datos incluyendo valores discordantes. Es favorable cuando existe una posible contaminación en la zona de estudio Requiere tamaños de muestras grandes.	Representación gráfica de la concentración del elemento en función del porcentaje de frecuencias acumuladas Se identifican dos poblaciones: población de fondo y población con posible contaminación específica. Se calcula la media aritmética y desviación estándar para cada población y se define el límite superior dado por la ecuación: X+nDE
	Método del Bootstrap	Cálculos repetitivos para obtener estadísticos asociados a una muestra (Re-muestreos). No obliga a la eliminación de valores discordantes.	Obtención del histograma de distribución de los valores X+nDE y cálculo de los intervalos de confianza. El valor medio del intervalo se asume como el valor de referencia
	Ecuaciones lineales	Determinación e Identificación de las propiedades de los suelos que tengan alta correlación con los metales. Correlación del contenido de metales pesados con las propiedades edáficas (materia orgánica, arcilla, carbonatos, otros).	NR= X+Aa+Bb+...Zz; donde: NR= es el nivel de referencia A, B, ... Z= valores medios de las propiedades edáficas. a, b, ... z= pendientes de las rectas de regresión simple

Adaptado de la referencia 33

En la figura 2, se representa de manera global las metodologías más utilizadas, en estudios realizados por varios autores^{13,17,18,21,27,28,30,32-37}, abarcando el método estadístico descriptivo y el método de ecuaciones lineales. Allí se observa que, como punto de partida se debe tener información del sitio, lo que conllevara a fijar una estrategia de muestreo. Luego deben desarrollarse tres etapas de medición: contenido total de metales, propiedades edáficas y un análisis mineralógico de ser posible o creerse necesario. Teniendo este grupo de datos se debe aplicar un análisis estadístico descriptivo y en función de estos resultados, adoptar el criterio estadístico más apropiado para expresar los niveles de referencia.

Los niveles de fondo se obtienen a partir de los datos el contenido de base de los metales, aquí dependiendo de la distribución de los datos se utiliza la media aritmética si es una distribución normal, o si no resulta una distribución normal o es log-normal y su desviación estándar es pequeña se toma la media geométrica como nivel de fondo.

Luego que se tiene el nivel de fondo, se selecciona la expresión a usar para proponer los niveles de referencia, por ejemplo: si no hay correlación estadísticamente significativa entre el contenido de metales y las propiedades edáficas se puede utilizar la expresión más sencilla: $NR = NF + nDE$ o fórmulas EPA, en este caso serían niveles genéricos de referencia (NGRs).

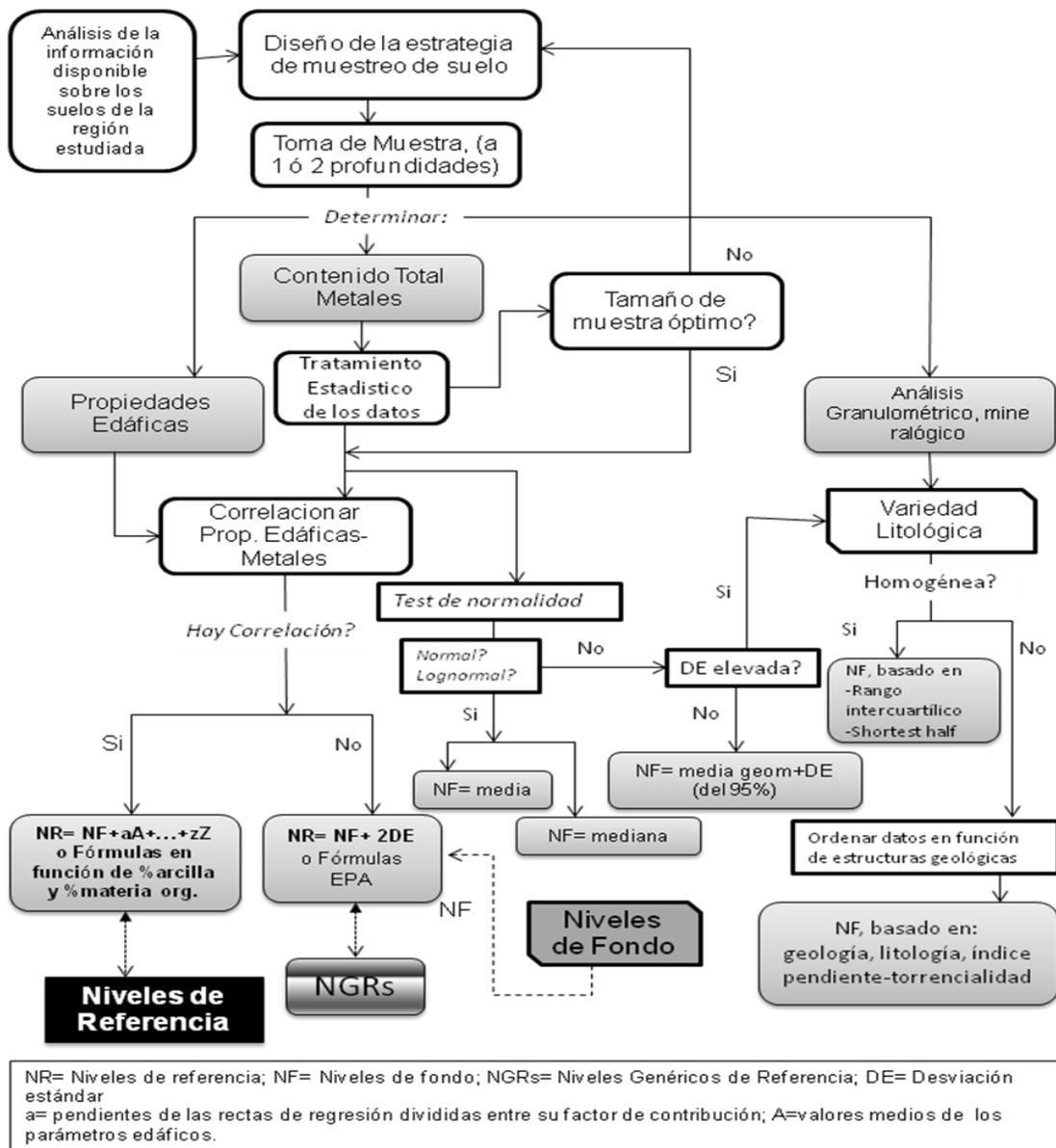


Fig. 2: Esquema general de las metodologías más utilizadas para establecer niveles de referencia.

Pero si por el contrario, existe una correlación estadísticamente significativa, se puede expresar con una ecuación de regresión lineal, resultando un nivel de referencia específico^{13,17,22}.

Si el análisis mineralógico y granulométrico arroja que existe una variedad litológica, se aplica el mismo procedimiento, estructurando los datos según la geología y los resultados se expresan de manera específica para cada unidad litológica.

Países que ya han establecido Niveles de Referencia (NR)

Solo unos pocos países ya han establecido los valores de fondo para los metales pesados, y consecuentemente los niveles de referencia. Donde no se han establecido NR, utilizan los valores de referencia extranjeros. Por lo

general, en estudios donde se investiga la calidad del suelo, con miras a aplicar procesos de remediación, se comparan los contenidos de metal obtenidos con los rangos establecidos por legislaciones de varios países y agencias internacionales como la EPA o con los propuestos por otros autores^{35,37-41}. En la tabla 2, se evidencia la gran variabilidad de estos estándares establecidos por diversas países y organismos, lo cual puede explicarse por el hecho de que los patrones de distribución de concentraciones de los elementos son principalmente influenciados por la naturaleza geoquímica de la roca^{10, 25,42-44}. Por lo que, el buen uso de estos valores estándares implica usar aquellos basados en fondos geoquímicos de propiedades semejantes al área estudiada.

Tabla 2: Niveles de referencia propuestos por agencias y por diferentes legislaciones en varios países y algunas provincias de España, para los metales pesados más frecuentes en los suelos (mg/kg suelo).

	Cd	Cu	Pb	Zn	Cr	Ni
Normativa Suiza	-	50	50	200	75	50
IHOBE-País vasco ⁽¹⁾	-	25	45	110	-	40
USEPA-Estados Unidos ⁽²⁾	0,5	25	100	-	130	50
CETESB-Brasil ⁽³⁾	-	30	20	60	40	10
Tabla Holandesa	-	50	85	140	100	30
UE (máximo)	-	140	300	300	-	75
Austria	-	100	100	300	100	100
Canadá	-	100	200	400	75	100
Polonia	-	100	100	300	100	100
Japón	-	125	400	250	-	100
Gran Bretaña	-	100	100	300	50	50
Alemania	-	200	1000	600	200	200
China	0,43	31,7	37,5	117,7	58,9	-
South Hydereabad- India	-	35	20	71	35	-
Holanda, valor referencia	0,8	36	85	140	100	35
Holanda, valor de urgente intervención	12	190	530	720	380	210
Málaga-España	0,5	65	69	132	132	-
Granada-España	-	26	36	76	66	-
Madrid-España	0,84	34	88	109	-	-
Medina del campo Valladolid-España	0,44	9,41	13,78	33,44	16,14	-
Almeira-España ⁽⁴⁾	15,6	578	-	4,63*10 ³	2,35*10 ³	313
Castellon-España ⁽⁵⁾	0,3	31,3	23,4	74	29,7	19,4
Alicante-España ⁽⁶⁾	0,7	28	28	83	36	31
Alicante-España ⁽⁷⁾	0,9	28	28	91	39	37
Murcia-España ⁽⁸⁾	-	19	14	66	69	30

Adaptado de las referencias 44 y 33.

⁽¹⁾ IHOBE (2003) del Gobierno Vasco. ⁽²⁾ Soil Guideline Departament Enviromental Agency de Estados Unidos. ⁽³⁾ Enviroment Agency of Sao Paulo, Brazil. ⁽⁴⁾ Propuesto por Sierra, 2005 usando fórmulas de la EPA, sin restricción de uso. ⁽⁵⁾ Propuesto por Peris, 2006 usando NR=VF+2DE. ⁽⁶⁾ Propuesto por Mico, 2005 usando NR=VF+2DE. ⁽⁷⁾ Propuesto por Mico, 2005 usando intercuartiles VR= [(3° I - 1° I) * 1.5]. ⁽⁸⁾ Propuesto por Castillo et al, 2003 usando media entre NR=VF+2DE y Regresión lineal.

Por otra parte, en esta tabla 2 se agrupan algunos valores de NR establecidos en estudios realizados en algunas Autonomías de España, país donde se han avocado en los últimos años a obtener niveles de referencias regionales. Aquí también se pueden distinguir las variaciones que existen, entre los NR propuestos para los metales pesados, a pesar de referirse a un mismo país, debido básicamente a su diversidad geológica y edáfica, observándose que existen algunos rangos de concentración amplios: Ni (9,81-313 mg/kg); Cu (9,41-578 mg/kg); Zn (33,44-4,63*10³ mg/kg); Cd (0,3-15,6); Cr (16,14-2,35*10⁴ mg/kg) y Pb (13,78-44,7 mg/Kg). Esta variabilidad, apoya lo que dicen algunos autores sobre que no es recomendable proponer valores para todo un territorio nacional, siendo lo más adecuado establecer niveles de referencia regionales^{13,17,30}. El método de cálculo, en algunos casos también introdujo diferencias, resultando el menos restrictivo donde se utiliza para el cálculo las fórmulas propuestas por la EPA.

Conclusiones

- Los niveles de referencia (NR) representan una guía de valores a tener en cuenta en los trabajos de evaluación, donde se quiere tener una idea rápida del estado de contaminación del emplazamiento.
- Antes de que un suelo sea declarado como contaminado por metales pesados se requiere establecer su calidad a través de la determinación de los niveles de fondo de metales pesados y propuesta de niveles de referencia.
- Hay una variedad de metodologías científicamente rigurosas, aplicadas para el establecimiento de dichos valores, las cuales se asemejan principalmente en lo relacionado al muestreo y se diferencian en el criterio estadístico para expresar los resultados.
- En la revisión de estudios de contaminación de suelos por metales pesados, se evidenció que son muchos los que basan su discusión, sobre si el emplazamiento está o no contaminado, en valores estándares fijados por otros países o agencias internacionales, que poseen suelos con propiedades muy distintas, por lo que pudieran estar subestimando o sobreestimando el nivel de contaminación encontrado.
- A pesar de que, son pocos los países que han establecido sus valores de referencia, la tendencia mundial es el desarrollo de los valores básicos para cada región en cada país. Esta situación representa un reto, ya que no es una tarea fácil, debido a todas las dificultades asociadas al tratar con material edáfico y elementos a nivel traza (heterogeneidad, dependencia del contexto geológico y edáfico, baja reproducibilidad, niveles detectables requeridos muy bajos, entre otros factores). Hasta tanto no se logre esto, se seguirán

tomando como guía los estándares internacionales ya establecidos, siendo lo más adecuado, la utilización de aquellos basados en fondos geoquímicos de propiedades semejantes al área estudiada.

- En cuanto a nuestro país, es necesario revisar las normas establecidas para la protección y recuperación del suelo, actualizarlas según la tendencia mundial, incluyendo estándares de referencia, de manera de poder mejorar la gestión ambiental de sitios potencialmente contaminados. Y contar además, con un instrumento que permita evaluar el impacto sobre el suelo de diferentes actividades industriales y agrícolas. Para ello, es necesario que se apoyen las investigaciones científicas orientadas para tal fin, con el adecuado financiamiento y se exija al sector industrial su participación.

Referencias

1. J Ansorena. El suelo en la agricultura y el medio ambiente. Contaminación del Suelo. Cap. IV. Departamento de Agricultura y Medio Ambiente. Sustrai-49, 40(1) (1996).
2. A Bautista, J Etchevers, J Del Castillo, R Gutiérrez. La calidad del suelo y sus indicadores. **Ecosistemas**, **13(2)**, 90-97 (2004).
3. Y Pérez, N Moura, M Balbin, R Valdés & M Lima. Contenido de elementos metálicos en suelos característicos del Municipio San José de las Lajas. **Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias**, **21(1)**, 43-46 (2012).
4. O Morton. Contenido de Metales Pesados en Suelos de la Ciudad de México. **Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, **9(1)**, 45-47 (2006).
5. C Mico, M Peris, J Sánchez, L Recátala. Heavy metal content of agricultural soil in a Mediterranean semiarid area: The Segura River Valley (Alicante). **Spanish Journal of Agricultural Research**, **4(4)**, 363-372 (2006).
6. J Pérez, J Domènech, J. Ramos, L Molinelli. Suelos Contaminados. Documento Final. GT-SCON- IXCONAMA. 9no. Congreso Nacional del Medio Ambiente. España (2008).
7. J Prieto-Méndez, A González, C González, A Román, F Prieto. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales Pesados provenientes de suelos y agua. Revisión. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, **10**, 29-44 (2009).
8. L Pérez, A Moreno, L González. Valoración de la calidad de un suelo en función del contenido y disponibilidad de metales pesados. **Edafología**, **7(3)**, 113-120 (2000).
9. J Hernández, M Fernández, M Alarcón. Valores de fondo y valores genéricos de referencia para Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb y Zn en suelos del campo de Cartagena, Murcia (SE España). **Edafología**, **12 (2)**, 105-114 (2005).

10. L Recatalá, J Sánchez, C Arbelo, D Sacristán. Can reference values of heavy metals useful as soil quality standards? Contributions from assays in representative Mediterranean agricultural soils. World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World. 16 August Australia. Published on DVD. 23-26 (2010).
11. M Dasaram, M Satyanarayanan, V Sudarshan, A Keshav Krishna. Assessment of Soil Contamination in Patancheru Industrial Area, Hyderabad, Andhra Pradesh, India. **Research Journal of Environmental and Earth Sciences** **3(3)**, 214-220 (2011).
12. E Galán, J Fernández-Caliani, I González, P Aparicio, A Romero. Influence of Geological Setting on Geochemical baselines of trace elements in soil Application to Soil of South-West Spain. **Journal of Geochemical Exploration**. **98**, 89-106 (2008).
13. C Micó. Estudio de metales pesados en suelos agrícolas con cultivos hortícolas de la provincia de Alicante. Universidad de Valencia. Servei de publicacions. Tesis Doctoral (2005).
14. D Baretino. La investigación de suelos contaminados en el IGME. Instituto Geológico y minero de España. Ríos Rosas, 23. 28003 Madrid. Extraído el 04 Julio del 2012, en el sitio: <http://www.igme.es/internet>.
15. J Aguilar, C Dorronsoro, E Galan, A Gómez. Los criterios y estándares para declarar un suelo como contaminado en Andalucía, la metodología y técnica de toma de muestra y análisis para su investigación. En Investigación y Desarrollo Medioambiental en Andalucía. OTRI. Universidad de Sevilla. 61-64 (1999)
16. EPA. Guide to site and soil description for hazardous waste site characterization. Vol 1: Metals (1992).
17. M Sierra. Niveles de metales pesados y asociados en suelos de la provincia de Almería. Parámetros que los afectan y riesgos de contaminación. Departamento de Edafología y Química Agrícola. Universidad de Granada. España. Tesis Doctoral (2005).
18. A Vázquez, L Cajuste, R Carrillo-González, B Zamudio-González, E Álvarez-Sánchez, J Castellanos-Ramos. Límites permisibles de acumulación de cadmio, níquel y plomo en suelos del valle del mezquital, Hidalgo. **Terra Latinoamericana**, **23(4)**, 447-455 (2005).
19. A Rihn, C Anacona. Riesgos ambientales asociados a sitios contaminados. Proyecto FDI. INTEC-SAG. México (2004).
20. M Díez, M Simón, F Martín, C Dorronsoro, I García, C Van Gestel. Ambient trace element background concentrations in soils and their use in risk assessment. **Science of the Total Environment**. **407**, 4622-4632 (2009).
21. E Galán, A Romero. Contaminación de suelos por metales pesados. Conferencia. **Revista de la Sociedad Española de Mineralogía**, **10**, 48-60 (2008).
22. BOE. Real Decreto 9/2005, de 14 de Enero, por el que se establece la relación de Actividades Potencialmente Contaminantes del Suelo y los Criterios y estándares para la Declaración de Suelos contaminados. Pp 11. BOE nº 15 de 18 de enero de 2005, Madrid.
23. L Acevedo. Caracterización de la contaminación en sólidos (suelos y sedimentos) encaminada a su regeneración: muestreo, extracción y técnicas analíticas más utilizadas. Simposio Internacional de Geología Ambiental para Planificación del Uso del Territorio, Puerto Varas (2002).
24. T Tarvainen. E Kallio. Baselines of certain bioavailable and total heavy metal concentrations in Finland. **Applied Geochemistry**. **17**, 975 (2002).
25. M Castillo, J Martín, R Jiménez. Estándares de calidad de los suelos del Campo de Montiel (ciudad real) en función del contenido en metales pesados. **Edafología**, **10(1)**, 23-32 (2003).
26. R Salminen, V Greforauskiene. Considerations regarding the definition of a geochemical baseline of elements in the surficial materials in areas differing in basic geology. **Applied Geochemistry** **15**, 647-653 (2000).
27. P Tume, J Bech, F Reverter, J Bech, L Longan, L Tume, B Sepúlveda. Concentration and distribution of twelve metals in Central Catalonia surface soils. **Journal of Geochemical Exploration**. Disponible on line en: www.elsevier.com/locate/jgeoexp (2010).
28. C Cancela. Contenido de macro-, micronutrientes, metales pesados y otros elementos en suelos naturales de São Paulo (Brasil) y Galicia (España). Universidad de A Coruña, España, Tesis doctoral, 574p. (2002).
29. M Irabien, I Yusta. Selección de fondo geoquímico para metales pesados en sedimentos actuales en la Bahía de Santander. **Geogaceta**, **26**, 39-42 (1999).
30. R Jiménez, P Conde, J Martín, R García. Niveles de fondo geoquímico e influencia del marco geológico en las concentraciones edafogeoquímicas de base de suelos seleccionados de Castilla-La Mancha. **Estudios Geológicos**. **66(1)**, 123-130 (2010).
31. J Pina. Estudio de los niveles de referencia y valores de fondo de elementos traza en los suelos. Departamento de Ingeniería Química y Combustibles. Abstract (del IGME) Spain (2007).
32. G Ferrara, M Najul, M Lara, R Sánchez. Fundamentos para la evaluación y control de la calidad ambiental. Cendes, UCV 2008.
33. G Rueda, J Rodríguez, R Madriñan. Metodologías para establecer valores de referencia de metales pesados en suelos agrícolas: Perspectivas para Colombia. **Acta Agronómica**, **60 (3)**, 203-218 (2011).
34. M Sánchez. Determinación de metales pesados en suelos de Medina del Campo (Valladolid): contenidos extraíbles, niveles de fondo y de referencia. Universidad de Valladolid. España. Tesis Doctoral (2003).

35. H Rivera, J Chira, M Campián, F Cornelio. Análisis correlacional y evolutivo de los metales pesados en sedimentos del río Santa entre Huaraz – Carhuaz. **Revista del Instituto de Investigaciones FIGMMG**, **11(21)**, 19-24 (2008).
36. M Peris. Estudio de metales pesados en suelos bajo cultivos hortícolas de la provincia de Castellón. Universidad de Valencia. Servei de publicacions. Tesis Doctoral (2006).
37. I Suciú, C Cosma, M Todică, S Bolboacă, L Jäntschi. Analysis of Soil Heavy Metal Pollution and Pattern in Central Transylvania. Transylvania. **Int. J. Mol. Sci.**, **9**, 434-453 (2008).
38. IHOBE. Investigación de la Contaminación del Suelo. Plan Director para la protección del suelo. Gobierno Vasco. Ed IHOBE S.A. (1993).
39. S Puga, M Sosa, T Lebgue, C Quintana, A Campos. Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. **Ecología Aplicada**, **5(1-2)**149-155 (2006).
40. A Carrasquero. Determinación de los niveles de contaminación con plomo en los suelos y polvo de las calles de la ciudad de Maracay. **Agronomía Trop.**, **56(2)**, 237-252 (2006).
41. I Camargo, G Hiromoto, M Flues. Heavy Metal Partition in Acid Soils Contaminated by Coal Power Plant. **J. Braz. Chem. Soc.**, **18(4)**, 831-837 (2007).
42. G Montenegro, C Fredes, E Mejías, C Bonomelli, L Olivares. Contenidos de metales pesados en suelos cercanos a un Relave cuprífero chileno. **Agrociencia**, **43**, 427-435 (2009).
43. S Siddiqui, R Khattak. Heavy metals distribution in the soils of Peshawar Valley, Northern-Pakistan. **Scientific Research and Essays**. **7(5)**, 544-552 (2012).
44. F Belmonte, A Romero, F Alonso, J Moreno, S Rojo. Afección de suelos agrícolas en áreas limítrofes a explotaciones mineras del Sureste de España. **Papeles de Geografía**, **51-52**, 45-54 (2010).