

Empleo del software RStudio para la validación analítica Pb en suelo urbano

Use of RStudio software for analytical validation of Pb in urban soils

Eliany Nicado Leal¹✉, Alba Yadira Corral Avitia¹, Laura Elena Santana Contreras¹, Jonatan Torres Pérez¹, Miroslava Quiñonez Martínez¹, Juan Pedro Flores Margez¹

¹ Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas, Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Programa de Maestría Ciencias Químico Biológicas, México

RESUMEN

La validación de los métodos analíticos es un requisito importante en la práctica del análisis químico, por lo que cada vez que se desea realizar un control de calidad de una medición, es necesario llevarlo a cabo. La presente investigación tiene como objetivo validar analíticamente la determinación de Pb en suelo urbano por espectrometría de absorción atómica en horno de grafito (GF-AAS por sus siglas en inglés), ya que en un futuro se desea medir el impacto que pueden causar las deposiciones atmosféricas en los suelos, debido a las emisiones de material particulado de las ladrilleras artesanales de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. En breve se obtuvo valores de alta calidad, ya que se usaron técnicas y análisis estadísticos más robustos y en menos tiempo que una validación convencional.

PALABRAS CLAVE: validación; metal pesado; suelo urbano.

ABSTRACT

The validation of analytical methods is an important requirement in the practice of chemical analysis, so that every time a quality control of a measurement is desired, it is necessary to carry it out. The objective of this research is to analytically validate the determination of Pb in urban soil by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS), since in the future it is desired to measure the impact that atmospheric depositions can cause in soils, due to particulate matter emissions from artisanal brick kilns in Ciudad Juarez, Chihuahua, Mexico. As a result, high quality values were obtained since more robust statistical techniques and analysis were used and, in less time, than conventional validation using RStudio software.

KEYWORDS: validation; heavy metal; urban soil.

Correspondencia:

DESTINATARIO: Eliany Nicado Leal.

INSTITUCIÓN: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas.

DIRECCIÓN: Av. Plutarco Elías Calles núm. 1210, Fovissste Chamizal, Ciudad Juárez, Chih., Méx. C. P. 32310.

CORREO ELECTRÓNICO: al216538@alumnos.uacj.mx

Fecha de recepción: 27 de junio de 2023. **Fecha de aceptación:** 21 de noviembre de 2023. **Fecha de publicación:** 27 de noviembre de 2023.



I. INTRODUCCIÓN

La validación de métodos analíticos es un requisito importante en la práctica del análisis químico. Su realización proporciona un alto grado de confianza en el método analítico y en la calidad de los resultados, al disminuir el número de fallos y repeticiones. Los datos obtenidos durante la validación son pruebas documentales que proporcionan un alto grado de seguridad y cumplimiento de los criterios legales ^{[1], [2]}.

Actualmente, existen diferentes formas de analizar los datos de una validación analítica, por ejemplo, al utilizar softwares como Excel, Minitab, SPSS, sin embargo, estas suelen requerir tiempo y recursos, por lo que se les dificulta a la mayoría de los analistas en laboratorios. En esta investigación se empleó el software RStudio como herramienta estadística, ya que su estructura incluye paquetes estadísticos que ayudan a obtener resultados más robustos y confiables en menor tiempo ^[2]. Este software es un entorno de desarrollo integrado para el lenguaje de programación R, dedicado al cálculo estadístico y a los gráficos. Por su facilidad de aprendizaje y aplicación, se utilizó para la validación analítica de la determinación de Pb en muestras de suelo urbano por espectrometría de absorción atómica en horno de grafito (GF-AAS, por sus siglas en inglés), integrando conocimientos estadísticos previos con técnicas robustas y más completas proporcionadas por este software.

La novedad de este estudio es que los resultados obtenidos no difieren de los de una validación normal, ya que cumplen los criterios de rendimiento establecidos por normativas como Analytical Chemistry in Europe (Eurachem), International Organization of Standardization (ISO) y Environmental Protection Agency (EPA) ^[3]. Estos resultados de rendimiento del método analítico pueden servir para evaluar la seguridad del metal Pb en muestras de suelo urbano, por lo que se requiere un resultado cuantitativo cuyo límite de detección sea inferior a los valores obtenidos por diferentes autores para esta matriz.

El objetivo de este estudio es demostrar el cumplimiento de criterios de la linealidad de la curva de calibración, la determinación de los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ, por sus siglas en inglés), la determinación de la precisión del equipo, la veracidad del método y la incertidumbre de medida ^[4], además de criterios analíticos establecidos por las normas ISO como normalidad, independencia, homocedasticidad y

linealidad de los residuos para la determinación de Pb en suelos urbanos mediante GF-AAS.

II. METODOLOGÍA

Entre las características de funcionamiento que debe desempeñar la determinación de Pb por GF-AAS para confirmar que es adecuada para el propósito descrito, destacan el cumplimiento de la linealidad de la curva de calibración, la determinación de los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ), la determinación de la precisión del equipo, la veracidad del método y la incertidumbre de medida ^[4]. Esta cuantificación del metal en muestras de suelo urbano se realiza en base a la masa del elemento (estado elemental) en el volumen de la matriz estudiada.

En este estudio se utilizaron como reactivos una solución patrón de 1000 mg/L de Pb, dihidrogenofosfato de amonio como modificador de la matriz ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 5 %) para eliminar posibles interferencias durante la medición, HNO_3 (65 % suprapur[®]) y agua milli-Q[®] (Tipo I). Todos los reactivos utilizados eran p.a (puro para análisis) y trazables al NIST (National Institute of Standards and Technology). Las concentraciones de oligoelementos en muestras patrón de un solo elemento se analizaron con un espectrofotómetro de absorción atómica (AAS) Perkin Elmer de la serie Model AAnalyst 200 con horno de grafito y utilizando argón.

DETERMINACIÓN DE LINEALIDAD

La evaluación de la linealidad utilizó una curva de calibración de Pb con un rango de concentración de 20 a 100 $\mu\text{g/L}$ siguiendo los criterios establecidos por la EPA 239.2 para la determinación de Pb por GF-AAS ^[5], añadiendo como modificador de la matriz una solución de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Se analizaron la significancia de los efectos de la constante y el intercepto. También, se determinó el cumplimiento de los supuestos de linealidad: homocedasticidad, normalidad, independencia y linealidad de los residuos de la curva de calibración. Además, se determinó el ajuste a un modelo de regresión lineal simple. Estos resultados son útiles como indicadores de la bondad de ajuste del modelo a los datos ^{[6], [7]}.

DETERMINACIÓN DEL LOD Y DEL LOQ

El método del blanco se utilizó para cuantificar el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación

(LOQ). Se prepararon diez blancos de reactivo y se midió su absorbancia mediante GF-AAS. Los cálculos realizados para su determinación se llevaron a cabo de acuerdo con las Ecuaciones (1) y (2), respectivamente, que se presentan a continuación [8]. Para la determinación de estos límites se aplicó el paquete estadístico QualityTools del software RStudio.

$$Y_{LOD} = Y_B + 3S_B \quad (1)$$

$$Y_{LOQ} = Y_B + 10S_B \quad (2)$$

donde Y_{LOD} : límite de detección en términos de absorbancia; Y_{LOQ} : límite de cuantificación en términos de absorbancia; Y_B : absorbancia del blanco y S_B : desviación estándar del blanco

DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN

El estudio de la exactitud se analizó bajo los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad. Para ello fue necesario demostrar que el GF-AAS es capaz de proporcionar resultados repetibles y reproducibles, incluso si se modificaban algunas variables durante la medición, como los analistas y los días de medición. Se prepararon tres diluciones a tres niveles de concentración bajo, medio y alto y se realizaron mediciones repetidas de las soluciones. La reproducibilidad se cuantificó de la misma forma que la repetibilidad, variando dos factores de analistas y días de medición [1], [2].

El procedimiento propuesto para verificar que el método proporciona resultados adecuados bajo los criterios de repetibilidad y reproducibilidad fue el Gage R&R del paquete estadístico QualityTools de RStudio. Este se basa en estimar la variabilidad inducida en las medidas por el propio sistema y la compara con la variabilidad total observada para determinar la viabilidad del sistema de medida mediante un ANOVA [9].

DETERMINACIÓN DE LA VERACIDAD

El análisis de la veracidad del método se realizó a tres niveles de concentración como en el estudio de exactitud, utilizando una solución de concentración conocida y calculando el porcentaje de recuperación según la Ecuación (3) que se presenta a continuación [2], [4].

$$\% R = \frac{(C_0 - C_e)}{C_e} * 100 \quad (3)$$

donde % R: porcentaje de recuperación; C_0 : concentración conocida y C_e : concentración del patrón medida por el equipo.

INCERTIDUMBRE DE MEDIDA

El mensurando del método se identificó para determinar la incertidumbre de medida, que en este caso es la concentración de Pb, se determinaron las fuentes de incertidumbre junto con sus incertidumbres combinadas y, finalmente, se calculó la incertidumbre expandida para un factor de cobertura igual a 2 ($K = 2$) [10], [11].

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DETERMINACIÓN DE LINEALIDAD

La **Tabla 1** muestra los resultados obtenidos para el análisis de regresión lineal simple, demostrando que los datos proporcionados por el GF-AAS sí presentaron un ajuste a este modelo de regresión. Estos resultados se obtuvieron a partir de la función de resumen del software RStudio, que proporcionó datos más completos que un análisis de regresión lineal en Excel. Se demuestra que los datos proporcionados por el GF-AAS se ajustan a un modelo de regresión lineal simple (**Tabla 1**).

TABLA 1
RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL

SUPUESTOS A CUMPLIR	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	¿SE CUMPLE?
Pendiente significativamente distinta a cero	p-value < 0.05	< 2*10 ⁻¹⁶	Sí
No exista falta de ajuste	p-value < 0.05	< 2*10 ⁻¹⁶	Sí
Homocedasticidad de residuos	p-value > 0.05 (prueba de Breusch Pagan)	0.1825	Sí
Normalidad de residuos	p-value > 0.05 (Shapiro Wilk)	0.837	Sí
Linealidad e independencia de residuos	Suma de cuadrados de residuos igual o cercana a cero	8.02*10 ⁻¹⁹	Sí

Además de los resultados numéricos, el software RStudio proporciona gráficos en los que se puede ver el cumplimiento de los criterios. Las Figuras 1a), 1b) y 1c) muestran los gráficos correspondientes al análisis de homocedasticidad, normalidad, linealidad e independencia de los residuos. En la Figura 1a) se observa el gráfico de residuos frente a valores ajustados y muestra que los puntos de las réplicas se distribuyen aleatoriamente alrededor del eje central, lo que indica que

existe homocedasticidad de los residuos, dato que confirma los resultados obtenidos en la Tabla 1. La Figura 1b) muestra un gráfico Q-Q en el que se observa que los residuos siguen una tendencia de normalidad y la Figura 1c) expone un gráfico de la raíz de los residuos estandarizados frente a escala-localización. En este último gráfico, los residuos no siguen ningún patrón y se distribuyen en torno al eje principal, por lo que se cumple el supuesto de linealidad e independencia.

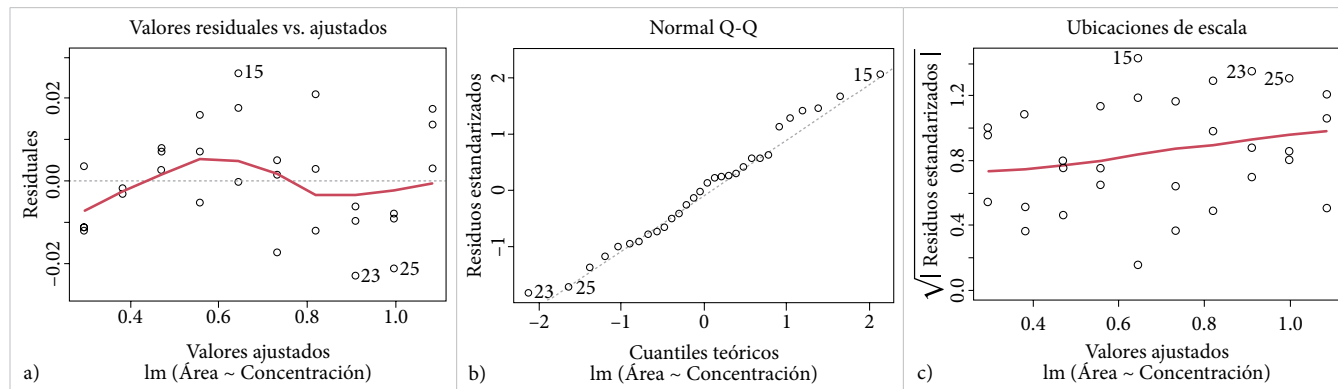


Figura 1. Gráficos RStudio para corroborar la regresión lineal: a) homocedasticidad de los residuos, b) normalidad de los residuos y c) linealidad e independencia de los residuos.

Teniendo en cuenta los criterios de aceptación para cada uno de los supuestos, se puede concluir que los datos proporcionados por el GF-AAS para un rango de curva de calibración de 20 a 100 µg/L se ajustan a un modelo de regresión lineal simple, por lo que el método se describe mediante una función del tipo $y = mx + n$. La Figura 2 muestra la curva de calibración obtenida para la determinación de Pb en muestras de suelo con su ecuación de la recta.

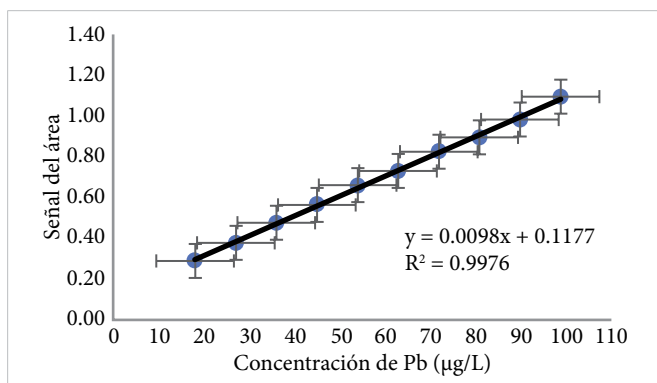


Figura 2. Curva de calibración obtenida para la cuantificación de Pb en suelo urbano.

Los resultados de LOD y LOQ fueron de 4.88 y 8.68 µg/L respectivamente, por lo que el equipo GF-AAS po-

drá determinar y cuantificar concentraciones de Pb por encima de estos límites.

DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN

Los resultados de los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad se muestran a continuación en la Tabla 2. Como puede observarse, los valores de variabilidad proporcionados por la repetibilidad y la reproducibilidad oscilaron entre 0.1163 y 0.3151 %, respectivamente, cumpliéndose, por tanto, los criterios de aceptación para cada parámetro e indicando que el equipo es capaz de repetir y reproducir los mismos datos, aunque se cambie el analista o los días de medida.

TABLA 2
RESULTADOS DE LA VARIABILIDAD DE LA REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

VARIABLE	CRITERIO DE ADAPTACIÓN	RESULTADOS
Repetibilidad	% Var ≤ 1 %	0.1163
Reproducibilidad	% Var ≤ 1 %	0.3151

La Figura 3 que se presenta a continuación muestra la variación entre los analistas en los tres niveles de con-

centración estudiados, para lo cual se tomaron las tres diluciones preparadas por cada analista para los tres niveles de concentración y se le realizaron tres réplicas a cada una, para un total de nueve mediciones por niveles de concentración. Este gráfico se obtuvo con el paquete estadístico GageR&R de RStudio.

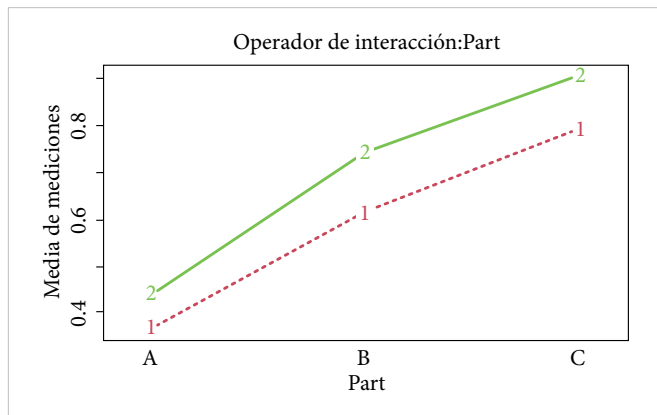


Figura 3: Diferencias entre las mediciones realizadas por dos analistas diferentes para un total de nueve muestras por analistas.

Como puede verse en el gráfico, hay muy poca variación entre los analistas (1 y 2) en los tres niveles de concentración estudiados.

DETERMINACIÓN DE LA VERACIDAD

Los resultados de veracidad se muestran en la [Tabla 3](#), presentada a continuación.

TABLA 3
RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

NIVELES DE CONCENTRACIÓN	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN
Nivel Bajo	103.4837
Nivel Medio	105.7488
Nivel Alto	99.0719

Los valores del porcentaje de recuperación oscilaron entre 99 a 106 %. El rango de concentración tomados para la validación analítica fue de 20 a 100 µg/L, niveles a los que les corresponde un rango de 60 a 115 % y de 80 a 110 %, respectivamente [2]. Al comparar los resultados obtenidos se observa que se encuentran en este rango, por tanto, se puede afirmar que el GF-AAS es capaz de producir datos que son reales y ciertos bajo las condiciones estudiadas.

INCERTIDUMBRE EN LA MEDICIÓN

La [Figura 4](#) muestra un diagrama de espina de pescado que relaciona las fuentes de incertidumbre que existen durante el proceso de medición del Pb.

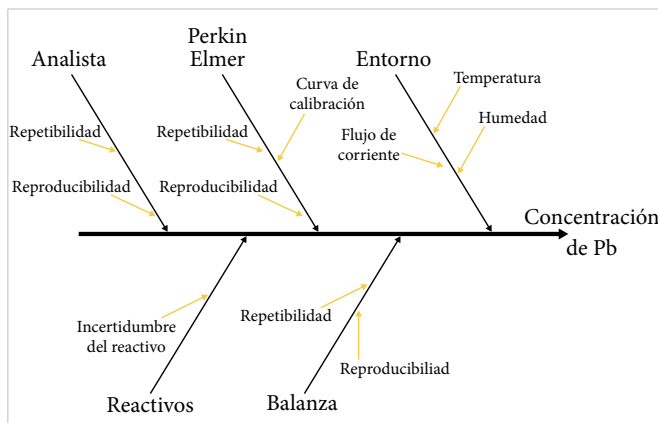


Figura 4. Diagrama de incertidumbre de medición de Pb en suelos urbanos.

IV. CONCLUSIONES

Al determinar la incertidumbre combinada de todas las fuentes de incertidumbre se calculó la incertidumbre expandida con un factor de cobertura ($K = 2$), obteniendo por tanto un valor de 0.012 mg/kg.

Los resultados obtenidos en este estudio manifiestan el cumplimiento de los requisitos para una validación analítica convencional y también demuestran que tanto la preparación y manejo de la solución estándar evaluada de Pb como el material de cristalería y el equipo Perkin Elmer utilizado en el estudio, permiten cuantificar valores por encima de 8.68 µg/L; reproducir y repetir resultados a pesar de que se cambien factores externos, como son los analistas, y producir resultados exactos en la matriz de estudio (estos datos son descritos por un modelo de regresión lineal simple bajo la función $y = mx + n$). Por lo tanto, este equipo es adecuado para el propósito descrito: la cuantificación de Pb en muestras de suelo urbano para la evaluación futura del impacto ambiental ocasionado por las ladrilleras artesanales en los suelos urbanos de Ciudad Juárez, así como para otros estudios potenciales de Pb y otros metales en suelos y agua

El empleo del software RStudio como alternativa para realizar cálculos estadísticos de la validación indicó que es apto para este propósito, donde se obtuvieron todos los resultados en menos de 30 minutos de ejecu-

ción. El *script* de programación generado durante este proceso puede ser llevado a grandes escalas fuera del laboratorio analítico, ayudando a distintas empresas de producción con su control de calidad de procesos.

REFERENCIAS

- [1] L. Correia, M. E. Soares y M. L. Bastos, "Validation of an electrothermal atomization atomic absorption spectrometry method for the determination of aluminum, copper, and lead in grapes," *J. Agric. Food. Chem.*, vol. 54, no. 25, pp. 9312-9316, dic. 2006, doi: [10.1021/jf0620564](https://doi.org/10.1021/jf0620564).
- [2] A. G. González, M. Á. Herrador y A. G. Asuero, "Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards," *Talanta*, vol. 82, no. 5, pp. 1995-1998, 2010, doi: [10.1016/j.talanta.2010.07.071](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.07.071).
- [3] B. Magnusson y U. Örnemark, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2.^a ed. Eurachem, 2014.
- [4] A. Gustavo y M. Ángeles, "A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 26, no. 3, pp. 227-238, 2007, doi: [10.1016/j.trac.2007.01.009](https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009).
- [5] EPA-NERL: 239.2: Lead by Graphite Furnace AA, EPA/600/4-79/020, NEMI, 1978. [En línea]. Disponible en: https://www.nemi.gov/methods/method_summary/5297/
- [6] A. G. Asuero, A. Sayago y A. G. González, "The correlation coefficient: An overview," *Crit Rev Anal Chem*, vol. 36, no. 1, pp. 41-59, 2006, doi: [10.1080/10408340500526766](https://doi.org/10.1080/10408340500526766).
- [7] B. Magnusson y S. L. R. Ellison, "Treatment of uncorrected measurement bias in uncertainty estimation for chemical measurements," *Anal Bioanal Chem*, vol. 390, no. 1, pp. 201-213, 2008, doi: [10.1007/s00216-007-1693-1](https://doi.org/10.1007/s00216-007-1693-1).
- [8] A. Shrivastava y V. P. Gupta, "Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods," *Chron. Young Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 21-25, 2011, doi: [10.4103/2229-5186.79345](https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345).
- [9] M. Sharma, S. P. Sahni y S. Sharma, "Validating a destructive measurement system using Gauge R&R - A case study," *Eng. Manag. Prod. Serv.*, vol. 11, no. 4, pp. 34-42, dic. 2019, doi: [10.2478/emj-2019-0031](https://doi.org/10.2478/emj-2019-0031).
- [10] A. Maroto, R. Boqué, J. Riu y F. X. Rius, "Effect of non-significant proportional bias in the final measurement uncertainty," *Analyst*, vol. 128, no. 4, pp. 373-378, 2003, doi: [10.1039/b210526h](https://doi.org/10.1039/b210526h).
- [11] R. Frenkel, I. Farrance y T. Badrick, "Bias in analytical chemistry: A review of selected procedures for incorporating uncorrected bias into the expanded uncertainty of analytical measurements and a graphical method for evaluating the concordance of reference and test procedures," *Clin Chim Acta*, vol. 495, no. feb., pp. 129-138, 2019, doi: [10.1016/j.cca.2019.03.1633](https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.03.1633).