

Validación no exhaustiva del método analítico de Walkley–Black, para la determinación de materia orgánica en suelos por espectrofotometría de UV-VIS

Not exhaustive validation of the analytical Walkley-Black method for determination of organic matter in soils by UV-VIS spectrophotometry

COLCIENCIAS TIPO 5. REPORTE DE CASO

RECIBIDO: FEBRERO 3, 2014; ACEPTADO: MARZO 26, 2014

Cristhian J. Yarce
crijayar@gmail.com

Jorge E. Castillo
jorgeca@hotmail.com

Universidad Santiago de Cali

Resumen

Se presentan las determinaciones estadísticas y los parámetros evaluados para la validación no exhaustiva del método de cuantificación de materia orgánica [MO] (estimada) propuesto por Walkley- Black, aplicado a muestras de suelos. Esta validación tiene como objetivo, dar a conocer algunas características de la metodología, en términos de su linealidad, precisión, límite de detección [LOD], límite de cuantificación [LOQ] y exactitud; tales parámetros, son evaluados bajo las condiciones ambientales, técnicas, instrumentales y de infraestructura del laboratorio de suelos y tejido foliar del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia [Cenicaña]. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: rango de trabajo lineal entre 0.363 – 5.081% MO, con un coeficiente de determinación $r^2 = 0.9969$; precisión expresada como repetibilidad: 0.1411% MO y como reproducibilidad: 0.0446% MO; el límite de detección obtenido fue de 0.064% MO; el límite de cuantificación por su parte fue de 0.2120% MO y por último la exactitud en términos del porcentaje de recuperación al 50% fue de 97% MO y al 100%, se obtuvo el mismo porcentaje.

Palabras Clave

Walkley-Black; validación; espectrofotometria; rango lineal; precisión; exactitud.

Abstract

Determinations statistics and parameters not evaluated for validating the proposed comprehensive Walkley-Black method of quantifying organic matter [OM] (estimated) is present; applied to soil samples. This validation aims , give out some features of the methodology, in terms of linearity, precision , limit of detection [LOD], limit of quantification [LOQ], and accuracy ; such parameters are evaluated under ambient conditions , technical , instrumental and laboratory infrastructure Soil and leaf tissue of the Research Center of Sugarcane Colombia [Cenicaña] . The results obtained were as follows: linear working range between 0363-5081 % MO, with a coefficient of determination $r^2 = 0.9969$; expressed as repeatability accuracy: 0.1411 % MO as reproducibility: 0.0446 % MO; the detection limit was obtained 0.064 % MO; the limit of quantification in turn was 0.2120 % MO and finally the accuracy in terms of percent recovery was 50% MO 97% and 100%, the same percentage was obtained.

Keywords

Walkley-Black; validation; spectrophotometry; linear range; accuracy; accuracy.

I. INTRODUCCIÓN

En química analítica, un estudio de validación es *no exhaustivo*, cuando se aplica sobre un método de análisis primario que no es nuevo, que ya ha sido estudiado por varios autores –quienes han determinado todos los parámetros para evaluar su desempeño– y que además ha sido normalizado y aceptado en diferentes manuales de análisis.

En el presente artículo se da a conocer la aplicación de dicho concepto de validación, al método Walkley-Black, para el análisis de materia orgánica (estimada) o carbono orgánico oxidable, aplicado a muestras de suelos (USDA, 2009). Este trabajo hace parte de la investigación que lleva por título *Determinación de materia orgánica en suelos del Valle Geográfico del Río Cauca cultivados con caña de azúcar, mediante espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR)*.

La materia orgánica del suelo hace referencia al material orgánico no vivo presente en él, que puede provenir de plantas, animales o microorganismos, y encontrarse en diferentes estados de descomposición, o transformación – como por ejemplo el *humus*, que es la fracción orgánica estabilizada y sintetizada a partir de los residuos anteriores (Baldoek & Nelson, 2000).

En una unidad de masa de suelo, la materia orgánica es la fracción de mayor actividad química dentro de tal matriz, ya que almacena varios elementos vitales en el suelo; a la vez que estimula el desarrollo de su estructura, es el principal foco para el intercambio de cationes, regula el intercambio de pH, regula las relaciones entre el sistema suelo-planta-agua-aire, es un gran depósito geoquímico de minerales y es uno de los sustratos primordiales para la actividad microbiana (Batjes & Dijkshoon, 1999; Bohn, McNeal, & O'Connor, 1993).

Se ha considerado que existe una relación directa entre el contenido de materia orgánica y el carbono orgánico, ya que, como se ha venido mencionando, este último se encuentra contenido en ella, por hacer parte de los compuestos de descomposición del material orgánico (Doran, Elliott, & Paustian, 1998).

El método evaluado consiste en la determinación estimada de la materia orgánica del suelo, la cual no es considerada directa, ya que el principio de la metodología es la oxidación del carbono orgánico del suelo, según lo planteado por Walkley-Black, donde, a través de un factor de aproximación, se puede asumir el contenido de materia orgánica. Tal factor es conocido como el factor de

Van Bemmelen, que indica que en 100g de materia orgánica, hay 58g de Carbono Orgánico (Howard, 1966; Agulhon, citado por Villalbí & Vidal, 1988; Walkley & Black, 1934); de esta manera, se ha venido trabajando en diferentes sectores, principalmente el agrícola, para la estimación del parámetro evaluado.

El método Walkley-Black comprende una combustión húmeda de la materia orgánica, con una mezcla de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y ácido sulfúrico (H_2SO_4). Después del proceso, en la cuantificación, se mide colorimétricamente el cromato reducido o el ion cromo (III) generado, por su relación directa con la cantidad de carbono orgánico oxidado. Generalmente, se determina el color verde del Cr^{3+} a una longitud de onda (λ) de 600 nm (USDA, 2009; Arrieche & Pacheco, 2000; Baker, 1976). La reacción oxidación del carbono orgánico, por acción de ácido sulfúrico y el dicromato de potasio presenta la ecuación 1:



Para el estudio de validación, es necesario evaluar parámetros estadísticos como precisión, linealidad, exactitud, LOD y LOQ, ya que para utilizar una técnica de análisis secundario, como es la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR), se utilizan los resultados de un método de análisis *primario* que han sido obtenidos sobre un grupo de muestras, llamado generalmente *conjunto de aprendizaje*, con el cual se calibra tal técnica, que tiene como objetivo predecir resultados a partir de las relaciones encontradas entre el conjunto de aprendizaje y los datos espectroscópicos obtenidos de cada muestra. Por lo tanto, para juzgar los modelos obtenidos mediante técnicas secundarias, es necesario conocer los parámetros estadísticos que presenta el método primario, el cual es llamado de esta manera, porque guarda una relación directamente proporcional (principalmente lineal) entre las concentraciones del analito en estudio y la señal analítica o instrumental del método, que puede darse en unidades de absorbancia, transmitancia, reflectancia, dispersión, fluorescencia, etc. (Krishnan, Alexander, Butler, & Hummel, 1980; Bowman, Guenzi, & Savory, 1991; Larrahondo, & Palau, 2001; Burns & Ciurzac (2008); Cabrera, 2003; Miller, 2002).

Con tal evaluación de los parámetros estadísticos mencionados, se logra la optimización de la metodología Walkley-Black para el análisis primario de materia orgánica

en suelos, que se lleva a cabo siguiendo el protocolo analítico del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia [Cenicaña].

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Reactivos e instrumentos

Los reactivos utilizados fueron: sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$), ácido sulfúrico (H_2SO_4), dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), de grado analítico, marca Merck. La metodología y los análisis de validación fueron desarrollados en un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible, marca Shimadzu, modelo UV1800, con un rango de longitudes de onda entre 190 -1100 nm. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia.

B. Metodología

El procedimiento analítico aplicado fue el método Walkley-Black para el análisis de materia orgánica en suelos, establecido en el Manual de Protocolos del Laboratorio de Suelos de Cenicaña (Calero, 1992).

C. Diseño del experimento de validación

Determinación del rango lineal

A partir de los resultados históricos del análisis de materia orgánica (estimada) en muestras de suelos, realizados por el laboratorio de Cenicaña, se fijó analizar un rango de concentración entre 0.363 y 7.259% de MO, a partir del cual se seleccionan las concentraciones de trabajo más adecuadas, según la proporcionalidad lineal de los resultados.

Determinación de la linealidad

Después de seleccionado el rango de trabajo donde se evidencia proporcionalidad lineal entre la señal instrumental y las concentraciones evaluadas, se realiza una prueba estadística de hipótesis, para la evaluación del coeficiente de correlación (r), de la curva de calibración; de esta forma, se determina estadísticamente la validez de la proporcionalidad observada.

Determinación de la precisión

Se evaluó la precisión en términos de la repetibilidad y reproducibilidad del método. Los análisis se llevaron a cabo en y entre días, para la presentación de resultados, se determinó su coeficiente de variación y los valores de

repetibilidad y reproducibilidad. También se incluyó un corto análisis sobre el análisis de la repetibilidad del método cuando se utilizan muestras de suelo con diferentes características de pH y textura.

Determinación del límite de detección y cuantificación

Se preparó una curva de calibración, con niveles bajos de concentración y, a partir de ella se estudiaron los residuos de los valores estimados de la señal (Y_i), frente a los valores predichos de la señal (\hat{Y}_i), el intercepto de la misma (a), la pendiente (b) y la desviaciones estándar de las señales respecto a las concentraciones (Sy/x); con tales residuos es posible conocer la concentración que tenga una señal de $Yb+3Sb$, que indica el límite de detección (señal diferente a la del blanco, que el método es capaz de detectar) y también es posible conocer la concentración que muestre una señal de $Yb+10Sb$, que indica el límite de cuantificación (valores después de los cuales, el método puede cuantificar con una precisión definida).

Determinación de la exactitud

A la muestra caracterizada en la determinación de precisión, sobre la cual ya se conoce el valor de concentración promedio, se le adicionan concentraciones de 50% y 100% de materia orgánica, de manera que se establezcan los porcentajes de recuperación del método para las concentraciones de analito adicionado.

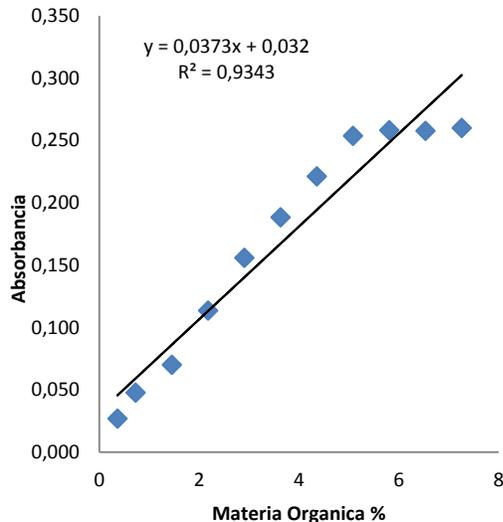
III. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Para el análisis estadístico aplicado y la validación no exhaustiva llevada a cabo, se siguieron referencias de las temáticas de estadística aplicada al análisis químico (Miller, 2002; Calero, 1992; Covenin, 1992; ISO-REMCO N280, 2006; Skoog, West, Holler, & Crouch, 2004). A continuación se presentan los parámetros evaluados y el diseño para cada uno de ellos.

A. Rango lineal

De una curva de calibración promedio, construida a partir de los resultados de seis curvas preparadas con anterioridad, se observó una pérdida en la relación lineal, a partir de la pareja de datos (5.08, 0.25), como se observa en la Figura 1.

Figura 1. Curva de calibración para el análisis del rango lineal



La ecuación de la recta en el gráfico anterior, la cual es utilizada para el cálculo de los residuos, es:

$$Y = 0.0488X + 0.0083 \quad [2]$$

El análisis del rango lineal es realizado utilizando la observación de datos anómalos, a través de una prueba de contraste de Grubbs (Miller, 2002), lo cual es posible, ya que en una regresión lineal, los residuos de las rectas de calibrado se distribuyen normalmente.

La prueba fue aplicada entre los residuos de la recta de calibración, donde se presume o se identifica la correlación lineal, y se compararon con los (hasta pareja de datos 5.081, 0.254) residuos de la pareja de datos siguiente, donde se observa la pérdida de linealidad.

La prueba de contraste de Grubbs, compara la desviación entre el valor sospechoso d y los valores medios medidos; en término de los residuos obtenidos. Para usar este contraste se formula la hipótesis nula (H_0): El valor sospechoso no es anómalo, es decir que todas las medidas proceden de la misma población. De igual manera, la hipótesis alterna (H_1): El valor sospechoso se presume como anómalo y debe ser descartado del grupo de datos analizado. Para probar cualquiera de las dos hipótesis se calcula el estadístico G (ecuación [3]):

$$G_{\text{calculado}} = \frac{|\text{Valor sospechoso} - \text{Promedio}|}{\text{desviación estándar } (s)} \quad [3]$$

(s) se calcula incluyendo el valor sospechoso. Si $G_{\text{calculado}} > G_{\text{critico}}$, se rechaza la H_0

Con la ecuación [2] $Y = 0.0488x + 0.0083$ se realiza la determinación de los valores de Y teóricos, para cada uno de los puntos de calibración, y se obtienen los siguientes valores de residuo:

$$\text{Residuos} = |Y_{\text{teóricos}} - Y_{\text{experimental}}| \quad [4]$$

En la Tabla 1, los valores de los estándares del 1 al 8 fueron utilizados desde la curva de calibración y el valor de estándar 9 es el que se presume como sospechoso (no utilizado para el cálculo de los residuos de la curva); con estos datos se obtiene un valor de G calculado de 2.57. Según las tablas se observa un valor de G Crítico para un tamaño de 9 muestras, a un 95% de confianza, de 2.22; se rechaza la H_0 .

Tabla 1. Datos obtenidos para la aplicación del contraste de Grubbs

# Estándar	Y Teórico	Y Experimental	Residuos	Residuos
1	0.0261	0.0268	0.0007	0.0007
2	0.0438	0.0477	0.0039	0.0039
3	0.0792	0.0700	-0.0092	0.0092
4	0.1147	0.1135	-0.0012	0.0012
5	0.1501	0.1558	0.0057	0.0057
6	0.1856	0.1883	0.0027	0.0027
7	0.2210	0.2212	0.0002	0.0002
8	0.2564	0.2537	-0.0027	0.0027
9	0.2917	0.2582	-0.0335	0.0335
			Promedio	0.0069
			Desviación Estándar	0.0111
			G Calculado	2.5690

En conclusión, según el contraste estadístico de Grubbs, el último punto evaluado en esta prueba es un dato que se presume como anómalo y por lo tanto es correcto cortar la gráfica de calibración en ese punto, ya que este debería ser descartado de la misma.

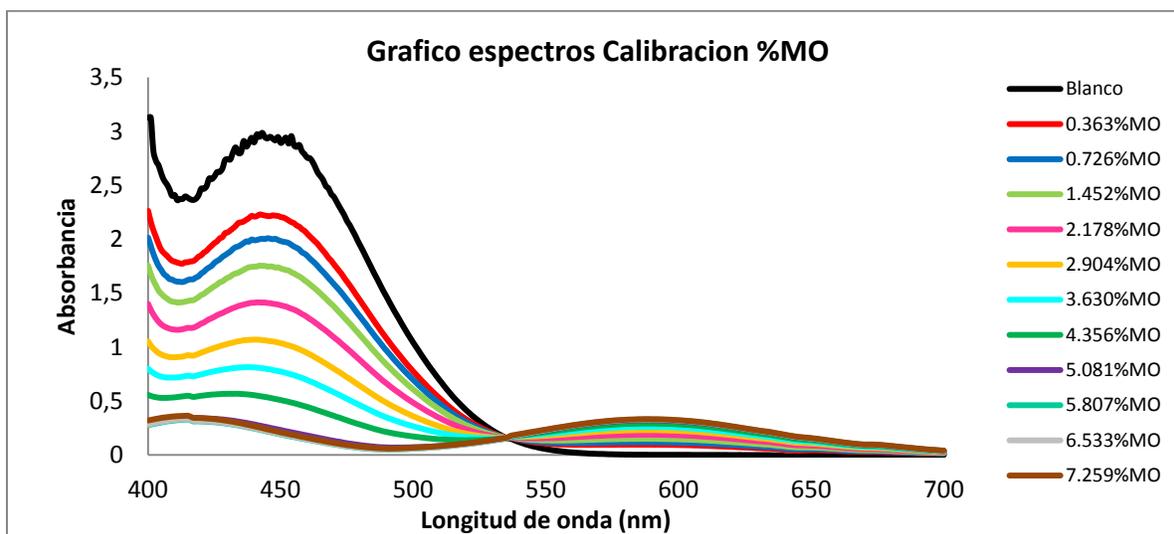
Evaluación química del rango lineal

Para analizar químicamente el comportamiento de las soluciones estándar preparadas y ver el efecto que produce al tener concentraciones progresivas de MO, se les toma el espectro UV-VIS a cada una de las soluciones; este da información para tomar la decisión de cortar la gráfica o seleccionar el rango de trabajo donde se presenta linealidad del método, como se observa en la Figura 2, donde cada punto de la gráfica corresponde a concentraciones de 0.36, 0.726, 1.45, 2.18, 2.90, 3.63, 4.36, 5.08, 5.81, 6.53, y 7.26 por ciento de MO respectivamente; esta grafica muestra

que hasta el punto de concentración de 5.08% de MO hay una respuesta apreciable en la disminución de la señal que aparece aproximadamente a 450nm, en relación a la señal que aparece a 600nm, donde la primera corresponde a la disminución en la concentración del ion cromato (Cr_2O_7)⁻² en relación con el aumento de la concentración del ion cromo (III) (Cr^{+3}), que indica la oxidación del carbono orgánico en cada estándar o patrón de calibración utilizado; por lo tanto, se puede afirmar que, para el método de determinación de materia orgánica estimada por la metodología Walkley-Black, no se detecta un cambio en la intensidad de las señales de los iones mencionados, a

partir de concentraciones de 5.08% de materia orgánica en base muestra, lo cual se evidencia en el espectro por las intensidades constantes de estas dos señales (450 y 600nm), a pesar de que se sigue añadiendo materia orgánica hasta alcanzar concentraciones de 7.26%. La anterior conclusión respalda el análisis estadístico de rango lineal realizado en la etapa anterior, donde se definió que, a partir del punto de concentración 5.08% de MO, no hay correlación lineal proporcional entre la señal de Absorbancia y la concentración de MO en porcentaje evaluada.

Figura 1. Representación gráfica de los espectros de cada punto de la curva de calibración evaluada para rango lineal



Estas afirmaciones también se pueden evaluar a partir de la construcción de una relación entre las señales presentadas por las longitudes de onda de máxima absorbancia para cada uno de los patrones de calibración, relación conocida como *coeficientes de extinción*. Para el análisis de la disminución en coeficientes de extinción, se toma la relación de absorbancias entre las señales de las dos especies, el ion Cromo (VI) y el ion Cromo (III), que se encuentran aproximadamente a 454nm y 600nm respectivamente. Estos datos se presentan en la Tabla 2. Se observa que, a partir de la concentración hasta donde la curva es lineal, la relación de los coeficientes de extinción a longitudes de onda 454/600 nm o 600nm/454 nm, es casi constante; es decir no hay proporcionalidad entre la concentración de MO adicionada en el estándar y la generación del ion de interés, ya sea Cromo (III) y Cromo (VI).

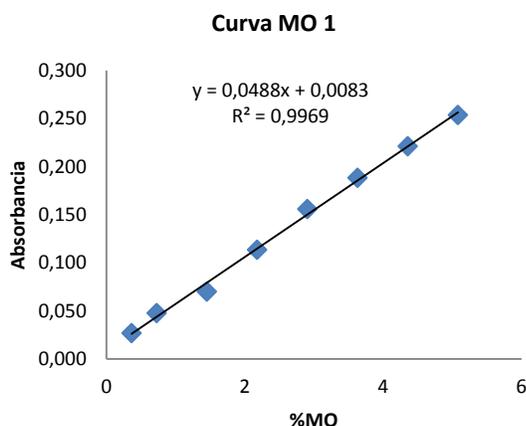
Tabla 2. Datos asociados a la disminución o el aumento de absorbancia en los espectros

Concentración % MO	Longitud de Onda (λ)		Factores	
	Absorbancia 450nm	Absorbancia 600nm	K	K'
Blanco (0)	2.973	0.002	1486.250	0.001
0.363	2.220	0.040	55.500	0.018
0.726	2.010	0.111	18.108	0.055
1.452	1.756	0.109	16.110	0.062
2.178	1.416	0.189	7.492	0.133
2.904	1.068	0.230	4.643	0.215
3.630	0.813	0.261	3.115	0.321
4.356	0.568	0.291	1.952	0.512
5.081	0.340	0.323	1.053	0.950
5.807	0.328	0.328	1.000	1.000
6.533	0.334	0.330	1.012	0.988
7.259	0.363	0.331	1.097	0.912

B. Análisis de linealidad

Después de seleccionado el rango lineal de la curva de calibración, se realiza una prueba de hipótesis o *t-student* al coeficiente de correlación obtenido de la curva de calibración comprendida en dicho rango. De acuerdo con lo anterior (ver Figura 3), se aplica la prueba al rango de concentraciones entre 0.36-5.08% (8 puntos, curva MO 1).

Figura 3. Evaluación de la linealidad



La ecuación de la recta para esta curva (MO1) es $Y = 0.0488X + 0.0083$, un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9969 y un coeficiente de correlación (r) = 0.9984.

Para verificar si existe una correlación significativa entre las concentraciones y las señales en evaluación, con la prueba *t-student*, se plantean dos hipótesis:

- H_0 : no existe correlación del rango lineal entre la señal instrumental (Abs) y el porcentaje de MO en base muestra (%MO); y
- H_1 : existe correlación del rango lineal entre la señal instrumental (Abs) y el porcentaje de MO en base muestra (%MO).

$$t_{\text{calculado}} = \frac{r(\sqrt{n-2})}{\sqrt{1-r^2}} \quad [5]$$

Entonces, para la Curva MO 1

$$t_{\text{calculado}} = \frac{0.9984(\sqrt{8-2})}{\sqrt{1-0.9969}}$$

$$t_{\text{calculado}} = 43.25$$

¿ $t_{\text{cal}} > t_{\text{crítico}}$ ($tn-2 = 2.45$ a 0.05)?

R// SI

Entonces, se rechaza H_0 y se retiene H_1 . En conclusión, se evidencia una correlación del rango lineal, estadísticamente significativa, entre la señal instrumental (Abs) y el porcentaje de materia orgánica en base muestra a un nivel de significancia de 0.05. Por lo tanto, es adecuado trabajar dentro de este rango evaluado.

C. Análisis de precisión

Precisión en términos de repetibilidad

Para determinar la precisión con este criterio, se utiliza una muestra de suelo, con valor de pH 7.1, es decir de un rango neutro, en un mismo día, bajo unos mismos parámetros o condiciones. Para ello, se realizan diez repeticiones y se determinan según la curva de materia orgánica definida para linealidad (ver Figura 3).

En la Tabla 3 se observan los resultados obtenidos de las 10 preparaciones de la misma muestra y los valores del promedio arrojado en % de materia orgánica, la desviación estándar de estas mediciones y el coeficiente de variación; también se observa un valor llamado *valor de r*, conocido como valor de reproducibilidad, el cual indica la cantidad, en porcentaje de diferencia, variación o desviación, que se pueden presentar en los resultados que el método arroja cuando se realizan medidas repetidas sobre la misma muestra; estas son variaciones normales del método, sujetas a los errores aleatorios del mismo.

Tabla 1. Datos para análisis de precisión (repetibilidad)

Promedio %MO	1.75
Desviación estándar	0.05
Coefficiente de Variación (%CV)	2.82
Valor de r	0.14

El coeficiente de variación obtenido en medidas repetidas es de 2.82 %, el cual, aunque se podría considerar alto, según la literatura, para el método de determinación de materia orgánica por Walkley-Black, se mueve entre 2% y 4%, ya que el método puede presentar algunas fuentes de error debido al procedimiento que se realiza. El valor de r , se calcula, según literatura (Miller, 2002), tomando un factor de cobertura K de 2.85 y multiplicándolo por la desviación estándar de la repetibilidad, en ocasiones conocida como S_r . Para este caso es:

$$\text{Valor de } r = 2.85 \times 0.05 = 0.14$$

Este valor indica que cada vez que se realice la determinación de materia orgánica en un mismo día, los

valores pueden presentar un error del 0.14%, en términos de la cantidad obtenida de materia orgánica; es decir, para un resultado de 1.75% de MO, el valor real –según este criterio– sería de 1.75 ± 0.14 % MO; este valor de la desviación en repetibilidad debe ser comparado con los puntos más bajos de la curva de calibración utilizada y con los valores del límite de detección y cuantificación.

Repetibilidad según pH

Para evaluar el comportamiento del método en términos de repetibilidad cuando se analizan muestras de diferentes pH, se tomaron muestras de suelo de niveles de pH bajo 5.2, medio 6.7 y alto 8.1-8.3, a las cuales se les determino, según la curva de calibración establecida (ver Figura 3), el nivel de repetibilidad, después del análisis realizado por cinco repeticiones; se observaron algunas diferencias (ver Tabla 4).

Tabla 2. Repetibilidad según pH

pH	Promedio	Desviación	CV	r
8.3	1.01	0.11	10.44	0.30
5.2	2.81	0.65	22.98	1.84
6.7	1.67	0.02	1.11	0.05
8.1	2.58	0.08	3.20	0.24

En la Tabla 4 se observa que valores de pH bajos –alrededor de 5 unidades–, y valores altos –alrededor de 8 unidades–, producen resultados de repetibilidad relativamente altos; esto indica diferencias en los valores de concentración de materia orgánica muy altos, pero se observa que a condiciones de pH cercanas a la neutralidad, alrededor de 6.7, el valor de r, en repetibilidad es el más bajo, al igual que el coeficiente de variación.

Cabe mencionar que el experimento no es suficiente para concluir que el método definitivamente tiene comportamientos diferentes en términos de repetibilidad cuando se varía la matriz pH en las muestras de suelo, esta es una buena recomendación para futuras investigaciones.

Precisión en términos de reproducibilidad

Para este parámetro se utilizó la misma muestra de la evaluación anterior, pero se realizaron las réplicas en días diferentes, con material volumétrico diferente y en condiciones de ambiente diferentes.

En la Tabla 5 se observan unos valores similares para el promedio de concentración encontrado en la muestra problema, también el coeficiente de variación, tal como se

menciona en la evaluación de repetibilidad, tiene una variación en ordenes aproximados de 2% a 4%, lo cual se establece en la teoría para este método analítico.

Al igual que en repetibilidad, la reproducibilidad calcula un valor r, donde se comparan las diferencias en los resultados, debido a pequeños cambios en las condiciones de análisis. Este valor es el siguiente:

$$\text{Valor } r = 2.85 * S_r \quad [6]$$

En este caso S_r corresponde a la desviación global de las desviaciones de las determinaciones individuales.

Tabla 3. Reproducibilidad entre días

Parámetro	Día 1	Día 2	Día 3
Promedio % MO	1.75	1.74	1.78
Desviación Estándar	0.05	0.07	0.08
CV%	2.82	4.28	4.40
Valor de r	0.14	0.21	0.22

El valor r presentado en la Tabla 6, y encontrado en este caso para reproducibilidad, es menor que el valor encontrado para el caso de repetibilidad, lo cual es algo muy significativo, aunque hay diferentes valores de r y de S_r , lo cual es una interpretación global del método bajo diferentes condiciones. Las interacciones de variación aleatoria del mismo pueden ser negativas y positivas, por lo cual el valor de r aquí presentado de 0.04% de materia orgánica, se hace más pequeño.

Tabla 4. Datos globales para reproducibilidad

Promedio %MO	1.75
Desviación estándar	0.02
Coefficiente de Variación	0.89
Valor de r	0.04

D. Análisis del límite de detección y cuantificación

Se realizó a través de una curva de calibración de rango bajo, con concentraciones de materia orgánica (%) desde 0.09% hasta 0.73%, la cual se muestra en la Tabla 7.

Tabla 5. Curva de calibración para LOD y LOQ

Concentración % MO	Absorbancia		
	Curva 1	Curva 2	Promedio
0.09	0.0009	0.0012	0.0010
0.18	0.0058	0.0058	0.0058
0.36	0.0203	0.0205	0.0204
0.54	0.0384	0.0377	0.0381
0.73	0.0499	0.0502	0.0501

Con los datos de absorbancia y concentración se realiza el cálculo de los residuos presentados en la Tabla 8, utilizando la herramienta análisis de datos del programa MS-Excel.

Tabla 6. Valor de los residuos para LOD y LOQ

Residuos	Pronóstico para Y
0.001251585	-.000206585
-0.001262348	0.007067348
-0.001240213	0.021615213
0.001886921	0.036163079
-0.000635945	0.050710945

Valor de $S_{y/x}$ calculado = 0.0017

Utilizando el intercepto de la curva de calibración observado en la grafica (0.0075), como valor de Y_b , y el valor $S_{y/x}$ calculado a partir de los residuos de la curva, se tiene una señal para el LOD de $0.0075 + 3 * 0.0017 = -0.0024$ y para el LOQ una de $0.0075 + 10 * 0.0017 = 0.0095$.

Para obtener las concentraciones para tales señales de LOD y LOQ, se debe utilizar la pendiente y el intercepto de la recta de calibración construida. De esta forma las concentraciones en términos de % de materia orgánica para el LOD y LOQ son de 0.06% y 0.21%, respectivamente.

E. Análisis de exactitud

En el trabajo desarrollado se tomó como valor y muestra de referencia la utilizada en la determinación de reproducibilidad y repetibilidad, y el promedio de concentración de materia orgánica obtenido del análisis de reproducibilidad. Este último se asumió como valor real, y es de 1.75% MO (ver Tabla 6); a este se le adiciono, en términos del % de MO, un dopaje del 50% y el 100%. Para cada adición, se evaluó la respuesta del método, utilizando cinco muestras repetidas en cada nivel; este procedimiento fue realizado por duplicado. Sus resultados se presentan en la Tabla 9.

Tabla 7. Datos para el análisis del porcentaje de recuperación

Nivel de dopaje	Primera determinación	Segunda determinación
Promedio MO 50%	2.59	2.60
Promedio MO 100%	3.46	3.44

Se realizaron dos preparaciones –replicas en tiempos diferentes– de las muestras dopadas con los niveles mencionados de analito; cada nivel tuvo cinco repeticiones, para lograr una mayor representatividad en la

determinación de exactitud. Las muestras fueron determinadas sobre la curva presentada en la Figura 3.

Las muestras dopadas al 50% de concentración de materia orgánica deberían, en teoría, tener una concentración de 2.63 % MO, es decir lo que se adiciono fue una cantidad de 0.88 % MO. Por su parte las muestras dopadas con el 100 % de concentración de MO, en teoría, deberían tener una concentración de 3.50 % MO, es decir que la cantidad adicionada fue de 1.73% de MO.

Para evaluar los porcentajes de recuperación obtenidos se aplica la ecuación (Agulhon, citado por Villalbí & Vidal, 1988):

$$\%Rec. = \frac{\% MO \text{ Determinado} - \% MO \text{ referencia o real}}{\% MO \text{ Adicionado}} \times 100 \quad [7]$$

Donde:

% Materia Orgánica Determinado = % MO promedio obtenido del análisis de las 5 muestras dopadas con los niveles del 50 y 100 % de MO

% Materia Orgánica referencia o real = % MO de la muestra referencia utilizada
% Materia Orgánica Adicionada = Es el % MO obtenido de calcular el 50 % y el 100 % al valor de referencia inicial.

Aplicando la ecuación (Agulhon, citado por Villalbí & Vidal, 1988) a los datos presentados en la Tabla 9, se obtienen los siguientes resultados:

$$\begin{aligned} \text{Promedio Recuperación al 50\%} &= 97 \% \\ \text{Promedio Recuperación al 100\%} &= 97\% \end{aligned}$$

Estos resultados están acordes con la recuperación que debe ofrecer un método químico analítico, en donde lo ideal es que se recupere entre el 95 y el 100 por ciento de las concentraciones adicionadas; por lo tanto, los valores encontrados corresponden a un método con una exactitud aceptable y adecuada.

IV. CONCLUSIONES

Se puede decir que el método evaluado cumple unos criterios acerca de la linealidad, la precisión, el límite de detección y la cuantificación y exactitud, los cuales, están acorde con los esperados y con los reportados en la literatura; pero cabe resaltar que, para haberlos obtenido de esta forma, fue necesario llevar a cabo una optimización en

cuanto a la forma procedimental de desarrollar el método. Se deben tomar precauciones en los pesajes de las muestras, en sus diluciones, y en el uso del material volumétrico, ya que cualquier parámetro de validación se puede ver afectado si se cambia alguna de las condiciones de operación.

El método Walkley-Black, para el análisis de materia orgánica estimada, es una metodología, que aunque lleva muchos tiempo de haber sido propuesta, todavía ofrece unos resultados adecuados, desde el punto de vista analítico, tal como se ve en los parámetros de validación obtenidos.

Una de las determinaciones que más interés genera en el presente trabajo, es que se realizó buscando relacionar el impacto del valor de pH en las muestras de suelo, con la concentración de materia orgánica determinada por la metodología de WB, ya que se observó que, a un nivel cercano a la neutralidad, la repetibilidad y los coeficientes de variación son los mejores, aunque no se puede afirmar que ese efecto se deba, definitivamente, a la variación en pH. Se propone como recomendación para futuros estudios, ya que para afirmar con certeza este supuesto, entre pH y metodología WB, se debe realizar un diseño experimental con diferentes variables, como los niveles de pH y los tipos de suelo.

Este trabajo es el punto de partida y aporta los elementos de juicio para evaluar las calibraciones que se quieren lograr en la investigación de espectroscopia de infrarrojo cercano, aplicada al análisis de materia orgánica en suelos, ya que es necesario conocer los parámetros de validación por los que se rige la metodología primaria, sea para trasladarlos o para mejorarlos cuando se implemente la metodología alternativa, que se basa en una técnica instrumental secundaria NIR.

V. REFERENCIAS

- Arrieché I. & Pacheco, Y. (2000). Determinación de carbono orgánico en muestras de suelos mediante dos procesos analíticos. *Venesuelos*, 6, 9-13
- Baker, K.F. (1976). The determination of organic carbon in soils using a probe-colorimeter. *Lab. Pract.* 25, 82-83
- Baldock, J.A. & Nelson, P. (2000). Soil organic matter. En M.E Summer [Ed.], *Handbook of soil science*, (pp. B25-B84). Boca Raton, FL: CRC
- Batjes, N.H. & Dijkshoon, J.A. (1999). Carbon and nitrogen stocks in soils of the Amazon Region. *Geoderma*, 89, 273-286
- Bohn, H.L., McNeal, B.L., & O'Connor. G.A. (1993). *Química del suelo*. México D.F., México: Limusa
- Bowman, R.A., Guenzi, W.D., & Savory, D.J. (1991). Spectroscopic method for estimation of soil organic carbon. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43, 78-83
- Burns, D. & Ciurzacq, E. (2008). *Handbook of Near-Infrared Analysis* [3a ed. - Practical Spectroscopy Series . vol. 35]. Boca Raton, FL: CRC
- Cabrera, E. (2003). Preparación de muestras de referencia de suelo. Maracay, Venezuela: Laboratorio UNILAB / Ceniap
- Calero, L. (1992). *Manual de análisis del laboratorio de suelos y tejido foliar*. Cali, Colombia: Cenicafé
- Comisión Venezolana de Normas Industriales [Covenin]. (1992). Norma Covenin N° 2972-92 (ISO 5725-86). *Precisión de los métodos de ensayo. Determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad de un método de ensayo normalizado, mediante ensayos realizados por diferentes laboratorios*. Caracas, Venezuela: Covenin
- Doran J.W., Elliott, E.T., & Paustian, K. (1998). Soil microbial activity, nitrogen cycling, and long-term changes in organic carbon pools as related to fallow tillage management. *Soil & Tillage Research*, 49, 3-18.
- Howard, P.J.A. (1966). The carbon-organic matter factor in various soil types. *Oikos*, 15, 229-236
- ISO-REMCO N280, (2006). The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry. *Pure & Appl. Chem.*, 78(1), 145-196
- Krishnan, P., Alexander, J.D., Butler, B.J., & Hummel, J.W. (1980). Reflectance technique for predicting soil organic matter. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 44,1282-1285
- Larrahondo, J.E. & Palau, F. (2001). Espectroscopia de infrarrojo cercano NIR. Principios generales [serie Procesos Industriales, N° 1]. Cali, Colombia: Cenicafé.
- Miller, N.J. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*, [4a ed.]. Madrid, España: Pearson
- Skoog, W., West, D.M., Holler, F.J., & Crouch, H. (2004). Aplicaciones de los métodos espectroscópicos atómicos y moleculares. En *Química analítica* [7a. ed], (pp.614-656). México D.F., México: McGraw-Hill
- United States Department of Agriculture [USDA]. (2009). Organic matter indexes. En *Methods of soil analysis* [part 3]. Washington, DC: American Society of Soil Science.
- Villalbí, I. & Vidal, M. (1988). *Análisis de suelos y foliares: interpretación y fertilización* [monografías de la obra agrícola de la Fundación Caja de Pensiones]. Barcelona, España
- Walkley, A. & Black, I. (1934). An examination of the Degjtjareff method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sciences*. 37, 29-38

CURRÍCULOS

Cristhian J. Yarve. Químico de la Universidad Santiago de Cali. Tecnólogo químico de la Universidad del Valle. Universidad Santiago de Cali.

Jorge Castillo. Licenciado en Química de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas (1994), Químico Farmacéuta de la Universidad Nacional (1997), Especialista en Química (2003) y Máster en Química (2007) de la Universidad del Valle. Actualmente es docente de la Universidad Santiago de Cali y la Universidad del Valle.