

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE QUIMICA



***“ESTUDIO DEL MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINACIÓN
ESPECTROFOTOMÉTRICA DE NITRATOS Y NITRITOS, SU CONTROL DE
CALIDAD MEDIANTE TÉCNICAS DE VALIDACIÓN Y APLICACIÓN EN LA
EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE AGUA SUPERFICIAL DE RIO”***

TESIS

***PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN QUIMICA***

CRISTINA ELIZABETH TORO VILCHEZ

LIMA – PERU

2001

ESTUDIO DEL MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE NITRATOS Y NITRITOS, SU CONTROL DE CALIDAD MEDIANTE TÉCNICAS DE VALIDACIÓN Y APLICACIÓN EN LA EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE AGUA SUPERFICIAL DE RÍO

ÍNDICE

	PÁG
RESUMEN	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. NITRATOS Y NITRITOS	12
2.1. QUÍMICA DEL NITRÓGENO	12
2.2. NITRATOS	13
2.3. NITRITOS	14
III. AGUAS SUPERFICIALES	15
3.1. CARACTERÍSTICAS DEL AGUA	15
3.2. FUENTES Y USOS DEL AGUA SUPERFICIAL	16
3.3. CALIDAD DEL AGUA SUPERFICIAL	16
IV. CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS SUPERFICIALES	17
4.1. FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE AGUAS SUPERFICIALES	17
4.2. FUENTES DE CONTAMINACIÓN POR NITRATOS Y NITRITOS	18
4.3. EFECTOS EN LA SALUD POR CONTAMINACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS	21
V. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS	23
5.1. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS	23
5.1.1. MÉTODO COLORIMETRICO	23
5.1.2. MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA IÓNICA	24
5.2. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS	24
5.2.1. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS EN EL RANGO ULTRAVIOLETA CERCANO	24
5.2.1.1. MÉTODO ESPECTROFOTOMETRICO ULTRAVIOLETA SELECTIVO	25
5.2.1.2. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO CON 2,6 DIMETILFENOL	25
5.2.2. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS EN EL RANGO VISIBLE (MÉTODOS COLORIMÉTRICOS)	26
5.2.2.1 MÉTODO COLORIMÉTRICO DE REDUCCIÓN CON CADMIO	26
5.2.3. MÉTODO DE ELECTRODO SELECTIVO	27
5.2.4. MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA	27

	<i>PÁG.</i>
VI. TÉCNICAS DE VALIDACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DEL ANÁLISIS	28
6.1. TÉCNICAS DE VALIDACIÓN	28
6.1.1. MÉTODO Y PROCESO DE MEDICIÓN	28
6.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS	35
6.1.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	35
6.1.4. CALIBRACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN	36
6.1.4.1. ESTÁNDAR DE CONTROL (EC)	36
6.1.4.2. ESTÁNDARES DE VERIFICACIÓN (EV)	36
6.1.4.3. BLANCOS DE CALIBRACIÓN (BC)	36
6.1.4.4. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN POR REGRESIÓN LINEAL	37
6.1.5. VALIDACIÓN DE RESULTADOS	37
6.2. CARTAS DE CONTROL	41
6.2.1. DEFINICIÓN DE CARTA DE CONTROL	41
6.2.2. PRINCIPIO DE UNA CARTA DE CONTROL	41
6.2.3. PERIODO PRELIMINAR (CONCEPTO PARA LA PREPARACIÓN DEL CONTROL DE CALIDAD RUTINARIO)	42
6.2.4. TIPOS DE CARTA DE CONTROL Y SUS APLICACIONES	44
6.2.4.1. CARTAS SHEWHART	44
A. CARTA CONTROL X (O CARTA DE EXACTITUD)	44
B. CARTAS DE CONTROL DE VALORES BLANCOS	46
C. CARTA CONTROL DE PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	46
6.2.4.2. CARTAS R (CARTAS DE CONTROL DE RANGO O CARTAS DE PRECISIÓN)	48
6.2.4.3. CARTAS DE CONTROL DE DIFERENCIA	50
6.2.4.4. CARTAS DE CONTROL CUSUM	51
6.2.5. EVALUACIÓN DE LAS CARTAS DE CONTROL	52
6.2.6. RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS CARTAS DE CONTROL	54
VII. ESTUDIO EXPERIMENTAL	55
7.1. ANTECEDENTES	55
7.2. OBJETIVOS	56
7.3. METODOLOGÍA DE ESTUDIO	56
7.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	57
7.4.1. ELECCIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO, INSTRUMENTOS Y REACTIVOS EMPLEADOS	57
7.4.2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS	60

	<i>PÁG.</i>
7.4.3. <i>PREPARACIÓN DE MUESTRAS CONTROL</i>	62
7.4.4. <i>DESARROLLO DEL MÉTODO EMPLEADO</i>	63
7.4.5. <i>EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS DEL MÉTODO ELEGIDO</i>	64
7.4.5.1. <i>DETERMINACIÓN DE LA MÁXIMA LONGITUD DE ONDA</i>	64
7.4.5.2. <i>DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL COMPLEJO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO Y NITRITO</i>	65
7.4.5.3. <i>EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO DIAZOTADO</i>	70
7.4.5.4. <i>EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE REDUCCIÓN A TRAVÉS DE LA COLUMNA</i>	71
7.4.5.5. <i>EVALUACIÓN DEL PH DE REDUCCIÓN A TRAVÉS DE LA COLUMNA.</i>	72
7.4.5.6. <i>EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA COLUMNA DE REDUCCIÓN</i>	73
7.5. <i>EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO EMPLEADO</i>	74
7.5.1. <i>CALIBRACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA PATRÓN</i>	74
7.5.1.1. <i>DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRITOS POR REGRESIÓN LINEAL (0.5 A 5.0 UG N-NO₂⁻)</i>	74
7.5.1.2. <i>DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRATOS POR REGRESIÓN LINEAL (2.5 A 25 UG N-NO₃⁻)</i>	78
7.5.2. <i>EXAMEN DE CONTAMINACIÓN DE BLANCOS</i>	81
7.5.2.1. <i>EXAMEN DE CONTAMINACIÓN DE BLANCOS EN LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS</i>	81
7.5.2.2. <i>EXAMEN DE CONTAMINACIÓN DE BLANCOS EN LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS</i>	82
7.5.3. <i>LIMITES DE DETECCIÓN</i>	83
7.5.3.1. <i>LIMITES DE DETECCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS</i>	83
7.5.3.2. <i>LIMITES DE DETECCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS</i>	86
7.5.4. <i>EXACTITUD</i>	90
7.5.4.1. <i>EXACTITUD EN LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS</i>	90
7.5.4.2. <i>EXACTITUD EN LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS</i>	91
7.5.5. <i>PRECISIÓN.</i>	94
7.5.5.1. <i>PRECISIÓN DENTRO DE LOTES</i>	94
7.5.5.2. <i>PRECISIÓN ENTRE LOTES</i>	95

	PÁG.
7.6. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA LA VALIDACIÓN DE DATOS	97
7.6.1. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	97
7.6.1.1. PRE-TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	98
7.6.1.2. DETERMINACIÓN DE NITRITOS POR EL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	98
7.6.1.3. DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS POR EL MÉTODO DE REDUCCIÓN CON CADMIO	98
7.6.1.4. RESULTADOS OBTENIDOS	99
7.6.2. DUPLICADOS DE LAS MUESTRAS	101
7.6.3. RECUPERACIÓN DE UNA ADICIÓN CONOCIDA	102
7.6.4. BLANCOS ANALÍTICOS	104
7.6.5. MUESTRAS DE CONTROL	105
7.7. ELABORACIÓN DE CARTAS DE CONTROL Y VERIFICACIÓN DE DATOS	106
7.7.1. CARTAS DE CONTROL X	106
7.7.2. CARTAS DE CONTROL DE VALORES BLANCOS	107
7.7.3. CARTAS DE CONTROL DE PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN (RR)	108
7.7.4. CARTAS DE CONTROL DE RANGO	109
7.7.5. CARTAS DE CONTROL CUSUM	110
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	111
IX. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	117
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
XI. ANEXOS	124
11.1. ANEXO 1: OTROS VALORES LIMITES PARA EL AGUA SEGÚN LA LEY GENERAL DE AGUAS	125
11.2. ANEXO 2 AGUA DE CALIDAD PARA REACTIVOS	127
11.3. ANEXO 3 DATOS REPORTADOS POR EL EQUIPO	129
11.4. ANEXO 4 ESTANDARIZACIÓN DE LAS SOLUCIÓN MADRE DE NITRITOS	139
11.5. ANEXO 5 TOMA DE MUESTRAS Y PRESERVACIÓN	141
11.6. ANEXO 6 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE REDUCCIÓN	144
11.6. ANEXO 7 ABREVIATURAS USADAS	149

RELACIÓN DE TABLAS

<u>CÓDIGO</u>	<u>DESCRIPCIÓN</u>	<u>PAG.</u>
TABLA 2.1.	ESTADOS DE OXIDACIÓN DEL NITRÓGENO	12
TABLA 3.1	VALORES LIMITES DE NITRATOS PARA LAS DIFERENTES CLASES DE AGUA	17
TABLA 4.1.	LÍMITES DE NITRATO EN EL AGUA DE BEBIDA	21
TABLA 6.1.	VARIACIÓN DE LA PRECISIÓN CON RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN	32
TABLA 6.2.	ACCIONES CORRECTIVAS PARA LA CONTAMINACIÓN DE BLANCOS	40
TABLA 6.3.	MUESTRAS DE CONTROL	45
TABLA 6.4.	FACTORES PARA CALCULAR LAS LÍNEAS SOBRE LAS CARTAS DE CONTROL DE RANGO	49
TABLA 6.5.	RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS CARTAS DE CONTROL	54
TABLA 7.1.	MATERIAL DE VIDRIO EMPLEADO	58
TABLA 7.2.	INSTRUMENTOS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS DE NITRATOS Y NITRITOS	58
TABLA 7.3.	REACTIVOS EMPLEADOS	59
TABLA 7.4.	MUESTRA CONTROL	59
TABLA 7.5.	SOLUCIONES ESTÁNDARES PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN 0.5 a 25 ug N-NO ₂ ⁻ /50 ml	66
TABLA 7.6.	SOLUCIONES ESTÁNDARES PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN 0.1 a 2.5 ug N-NO ₂ ⁻ /50 ml	67
TABLA 7.7.	SOLUCIONES ESTÁNDARES PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN 3 a 25 ug N-NO ₂ ⁻ /50 ml	68
TABLA 7.8.	SOLUCIONES ESTÁNDARES PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN 1.25 a 25 ug N-NO ₃ ⁻ /50 ml	69
TABLA 7.9.	TIEMPO DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO DIAZOTADO	70
TABLA 7.10	TIEMPO DE CONTACTO CON EL AGENTE REDUCTOR (ESTÁNDAR DE 25 ug N-NO ₂ ⁻ /50 ml)	71
TABLA 7.11.	TIEMPO DE CONTACTO CON EL AGENTE REDUCTOR (ESTÁNDAR DE 2.5 ug N-NO ₃ ⁻ /50 ml)	72
TABLA 7.12.	pH DE REDUCCIÓN A TRAVÉS DE LA COLUMNA (ESTÁNDAR DE 2.5 ug N-NO ₃ ⁻ /50 ml)	72
TABLA 7.13.	EFICIENCIA DE LA COLUMNA DE REDUCCIÓN (ESTÁNDAR DE mg N-NO ₃ ⁻ /l y DE mg N-NO ₂ ⁻ /l)	73

<u>CÓDIGO</u>	<u>DESCRIPCIÓN</u>	<u>PAG.</u>
TABLA 7.14.	SOLUCIONES ESTÁNDARES PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN 0.5 a 5 ug N-NO ₂ ⁻ /50 ml	75
TABLA 7.15.	VERIFICACIÓN DE LA PRECISIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN USANDO UN ESTÁNDAR DE CONTROL 1.52 ug N-NO ₂ ⁻ (5 ug N-NO ₂ ⁻ /50 ml)	76
TABLA 7.16.	VERIFICACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN UTILIZANDO ESTÁNDARES DE VERIFICACIÓN 2.5 ug Y 5.0 ug N-NO ₂ ⁻	77
TABLA 7.17.	DATOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN 2.5 A 25 ug N-NO ₃ ⁻ /50 ml	78
TABLA 7.18.	VERIFICACIÓN DE LA PRECISIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN USANDO UN ESTÁNDAR DE CONTROL 5.64 ug N-NO ₃ ⁻ (25 ug N-NO ₃ ⁻)	79
TABLA 7.19.	VERIFICACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN UTILIZANDO ESTÁNDARES DE VERIFICACIÓN 12.5 ug Y 25.0 ug N-NO ₃ ⁻	80
TABLA 7.20.	ANÁLISIS DE LECTURAS DE BLANCOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS (AGUA ULTRAPURA)	81
TABLA 7.21.	ANÁLISIS DE LECTURAS DE BLANCOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS MAS NITRITOS (AGUA ULTRAPURA)	82
TABLA 7.22.	DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN DEL INSTRUMENTO USANDO UN ESTÁNDAR DE 0.3 ug N-NO ₂ ⁻ EN 50 ml (AGUA ULTRAPURA)	84
TABLA 7.23.	DATOS DE LOS BLANCOS ANALÍTICOS PARA EL LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO (AGUA ULTRAPURA)	85
TABLA 7.24.	DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN PRACTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITO	86
TABLA 7.25.	DETERMINACIÓN DEL L.D.I. USANDO UN ESTÁNDAR DE 2.5 ug N-NO ₃ ⁻ EN 50 ml (AGUA ULTRAPURA)	87
TABLA 7.26.	DETERMINACIÓN DEL L.D.I. USANDO UN ESTÁNDAR DE 2.5 ug N-NO ₃ ⁻ EN 50 ml (AGUA ULTRAPURA)	87
TABLA 7.27.	LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO A PARTIR DE BLANCOS POSITIVOS (AGUA TIPO I)	88
TABLA 7.28.	DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO USANDO UN ESTÁNDAR DE 2.5 ug N-NO ₃ ⁻ EN 50 ml (AGUA ULTRAPURA)	89
TABLA 7.29.	DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN PRÁCTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATO	90

<u>CÓDIGO</u>	<u>DESCRIPCIÓN</u>	<u>PAG.</u>
TABLA 7.30.	DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD CON UNA MUESTRA CONTROL DE 10 $\mu\text{g N-NO}_2^-$ (3.04 $\mu\text{g N-NO}_2^-$)	91
TABLA 7.31.	DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD (MUESTRA CONTROL TQC-99)	92
TABLA 7.32.	DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD (MUESTRA CONTROL TQC-97)	93
TABLA 7.33.	VALORES VERDADEROS Y LÍMITES DE ACEPTACIÓN DE LAS MUESTRAS CONTROL QC-99 Y QC-97	94
TABLA 7.34.	DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN DENTRO DEL LOTE (MUESTRA CONTROL QC-99)	95
TABLA 7.35.	DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN ENTRE LOTES (MUESTRA CONTROL QC-99)	96
TABLA 7.36.	RESULTADOS DE LA CANTIDAD DE NITRITO EN LAS MUESTRAS	99
TABLA 7.37.	RESULTADOS DE LA CANTIDAD DE NITRATO Y NITRITO EN LAS MUESTRAS COMO $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$	100
TABLA 7.38.	DUPLICADOS DE LAS MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITO	101
TABLA 7.39.	DUPLICADOS DE LAS MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATO Y NITRITO	101
TABLA 7.40.	RECUPERACIÓN DE UNA ADICIÓN CONOCIDA EN LA DETERMINACIÓN DE NITRITO (PERÍODO PRELIMINAR)	102
TABLA 7.41.	RECUPERACIÓN DE UNA ADICIÓN CONOCIDA EN LA DETERMINACIÓN DE NITRATO Y NITRITO (PERÍODO PRELIMINAR)	103
TABLA 7.42.	RECUPERACIÓN DE UNA ADICIÓN CONOCIDA EN LAS MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITO	103
TABLA 7.43.	RECUPERACIÓN DE UNA ADICIÓN CONOCIDA EN LAS MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATO Y NITRITO	104
TABLA 7.44.	BLANCOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS	104
TABLA 7.45.	BLANCOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS	104
TABLA 7.46.	MUESTRAS CONTROL PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS	105
TABLA 7.47.	MUESTRAS CONTROL PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS	105

RELACIÓN DE FIGURAS

<u>CÓDIGO</u>	<u>DESCRIPCIÓN</u>	<u>PAG.</u>
FIGURA N°2.1.	POTENCIALES ESTÁNDAR DE ELECTRODO EN SOLUCIÓN ÁCIDA PARA LA REDUCCIÓN DE ALGUNOS COMPUESTOS COMUNES QUE CONTIENE NITRÓGENO EN DIVERSOS ESTADOS DE OXIDACIÓN	13
FIGURA N°2.2.	ESTRUCTURA DEL ION NITRATO	13
FIGURA N°2.3.	ESTRUCTURA DEL ION NITRITO	14
FIGURA N°2.4.	ION NITRITO COMO LIGANDO ENLAZADO DIRECTAMENTE A UN ÁTOMO METÁLICO	15
FIGURA N°4.1.	CICLO DEL NITRÓGENO	18
FIGURA N°5.1.	CURVA DE ABSORCIÓN DEL ION NITRATO	25
FIGURA N°6.1.	ESQUEMA DEL PRINCIPIO DE UNA CARTA DE CONTROL	41
FIGURA N°6.2.	ESQUEMA DEL CARÁCTER CÍCLICO QUE TIENEN LAS CARTAS CONTROL PARA LA CORRECCIÓN DE DEFICIENCIAS EN PROCESO ANALÍTICO	42
FIGURA N°6.3.	INFLUENCIA DEL NUMERO DE MEDICIONES REPETIDAS (N) EN EL TAMAÑO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR (SD) DE LA MEDIA	43
FIGURA N°6.4.	CONSTRUCCIÓN DE LAS LÍNEAS CARACTERÍSTICAS DE UN GRÁFICO DE SHEWART DEL VALOR CENTRAL	45
FIGURA N°6.5.	CONSTRUCCIÓN DE UN GRÁFICO DE BLANCOS	46
FIGURA N°6.6	CARTA CONTROL DE PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN NORMALIZADA A 100% DE RECUPERACIÓN	48
FIGURA N°6.7.	LÍNEAS CARACTERÍSTICAS DEL GRÁFICO DE RECORRIDO	49
FIGURA N°6.8.	EJEMPLO DE UN GRÁFICO DE DIFERENCIA EMPLEADO PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO	50
FIGURA N°6.9.	GRÁFICO DE CONTROL DE SUMAS ACUMULATIVAS MOSTRANDO UNA TENDENCIA SIGNIFICATIVA	51
FIGURA N°6.10.	GRÁFICO DE CUSUM MOSTRANDO LA MASCARA EMPLEADA PARA DETECTAR SITUACIONES FUERA DE CONTROL	52
FIGURA N°6.11.	CARTA DE CONTROL CON DATOS FUERA DE CONTROL	53
FIGURA N°6.12.	GRÁFICOS CON SITUACIONES DENTRO DE CONTROL ESTADÍSTICO PERO CON SECUENCIAS DE PUNTOS QUE PONEN DE MANIFIESTO SITUACIONES DE MEDIDA NO DESEABLE	53
FIGURA N°7.1.	COLUMNA DE REDUCCIÓN DE CD-CU	63
FIGURA N°7.2.	ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL COMPLEJO	65
FIGURA N°7.3.	CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRITOS 0.5 a 25ug N-NO ₂ /50ml	66

<u>CÓDIGO</u>	<u>DESCRIPCIÓN</u>	<u>PAG</u>
FIGURA N°7.4.	CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRITOS 0.1 a 2.5 ug N-NO ₂ ⁻ /50ml	67
FIGURA N°7.5.	CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRITOS 3 a 25 ug N-NO ₂ ⁻ /50ml	68
FIGURA N°7.6.	CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRATOS 1.25 a 25 ugN-NO ₃ ⁻ /50ml	69
FIGURA N°7.7.	CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRITOS 0.5 a 5 ug N-NO ₂ ⁻ /50ml	75
FIGURA N°7.8.	CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRITOS CON UN ESTÁNDAR DE CONTROL (EC) DE 1.52 ug N-NO ₂ ⁻ (5 ug N-NO ₂ ⁻)	76
FIGURA N°7.9.	CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRITOS CON DOS ESTÁNDARES DE VERIFICACIÓN (EV) DE 2.5 Y 5.0 ug N-NO ₂ ⁻	77
FIGURA N°7.10.	CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRATOS 2.5 a 25 ug N-NO ₃ ⁻ /50ml	78
FIGURA N°7.11.	CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRATOS CON UN ESTÁNDAR DE CONTROL (EC) DE 5.64 ug N-NO ₃ ⁻ (25 ug N-NO ₃ ⁻)	79
FIGURA N°7.12	CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRATOS CON DOS ESTÁNDARES DE VERIFICACIÓN (EV) DE 12.5 Y 25.0 ug N-NO ₂ ⁻	80
FIGURA N°7.13.	CARTA DE CONTROL DE EXACTITUD PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS	106
FIGURA N°7.14.	CARTA DE CONTROL DE EXACTITUD PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS	106
FIGURA N°7.15.	CARTA DE CONTROL DE BLANCOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS	107
FIGURA N°7.16.	CARTA DE CONTROL DE BLANCOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS	107
FIGURA N°7.17.	CARTA DE CONTROL DE RR PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS	108
FIGURA N°7.18.	CARTA DE CONTROL DE RR PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS	108
FIGURA N°7.19.	CARTA DE CONTROL DE RANGO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS	109
FIGURA N°7.20.	CARTA DE CONTROL DE RANGO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS	109
FIGURA N°7.21.	CARTA DE CONTROL CUSUM PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS	110
FIGURA N°7.22.	CARTA DE CONTROL CUSUM PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS	110

RESUMEN

Los Objetivos primordiales del presente trabajo son:

- Estudio y desarrollo del método de determinación de nitratos y nitritos, mediante la reducción previa con cadmio.*
- Estudio y desarrollo de técnicas de validación como comprobación o control de la calidad del método analítico y su aplicación en muestras reales.*
- Evaluación de la contaminación del río Santa por nitratos y nitritos, como aplicación experimental del método.*

Se realiza el estudio del método analítico mediante la evaluación de parámetros analíticos seleccionados de acuerdo a los estudios bibliográficos consultados. Entre ellos tenemos la evaluación de la linealidad a diferentes concentraciones, evaluación del pH de reducción, del tiempo de reducción, obteniéndose valores óptimos de pH (8.5), de tiempo de reducción a través de la columna (8-10 minutos) y tiempo de formación del compuesto (15-30 minutos), Luego se evalúa los parámetros analíticos para la validación del método, obteniéndose como resultado la curva de calibración con una linealidad de 0.99993, se realizó el estudio de blancos analíticos y la obtención de los límites de detección; obteniéndose como límite de detección del método LDM (0.018 mg/l) y límite de detección práctica LDP (0.030mg/l). Para la evaluación de la exactitud y precisión del método se utiliza muestras de control de la US EPA, obteniéndose una precisión con un coeficiente de variación 3.7 % y un porcentaje de error de 1.3% (%Exactitud de 101.33%).

Después de realizar la validación del método de reducción de cadmio para la determinación de nitratos más nitritos. Se selecciono el río Santa para la evaluación de la contaminación debido a nitritos y nitratos. Se sabe que en el río Santa al igual que todos los ríos del Perú están sujetos a la contaminación por descargas de aguas residuales industriales y domésticas. Se determina 10 puntos de muestreo a lo largo del río y se establece dos fechas de muestreo en los meses de Agosto 2000 y Febrero-Marzo 2001.

Durante el análisis de las muestras se tuvo en cuenta los parámetros analíticos para la validación de datos: Duplicados de muestras, recuperación de una adición conocida, blancos analíticos y muestras de control. La evaluación se efectuó mediante el uso de las cartas de control, que es una herramienta estadística usada para el análisis rutinario de las muestras.

Los Resultados de nitratos y nitritos obtenidos en las muestras fueron menores al valor guía V.G. (11.3 y 0.9 mg/l respectivamente) para las aguas de consumo humano. De los resultados obtenidos para nitratos , el 80% de las muestras son mayores de 0.1 mg/l sobrepasando el límite establecido para aguas TIPO III, según la ley General de Aguas , sólo el restante 20% esta dentro de los límites.

I. INTRODUCCION

Nuestro medio ambiente y nuestra vida dependen de un recurso muy conocido como es el agua, por ser este un elemento de vital importancia, requiere de un estudio para poder utilizarla de manera eficaz.

La ley general de aguas es una norma peruana vigente que clasifica a las aguas de acuerdo a las exigencias de cada uno de los tipos de uso según el grado de aceptabilidad del recurso.

A razón de lo expuesto se realizan numerosos estudios relacionados con los métodos de análisis del agua, sobre todo a los parámetros de calidad del agua, para su implementación, desarrollo y validación. El presente trabajo tiene como objetivo primordial el estudio de método de determinación espectrofotométrica de nitratos y nitritos que son parámetros de interés en la calidad del agua.

La determinación de ion nitrato es difícil debido a los procedimientos relativamente complejos descritos en la literatura, en el presente trabajo se selecciona el método de reducción con cadmio que determina la suma de iones nitritos presentes y nitratos reducidos casi cuantitativamente, por tanto se desarrolla y valida también el método espectrofotométrico para la determinación de nitrito, indispensable para obtener los resultados de nitratos en las muestras.

El método de reducción con cadmio consiste en la reducción casi cuantitativa del ión nitrato a ión nitrito a través de una columna de reducción de cadmio-cobre (Cd-Cu), después de la reducción se sigue el procedimiento colorimétrico para la determinación de nitritos que se basa en la reacción del ion nitrito en condiciones ácidas con la sulfanilamida, que forma un compuesto diazotado, el cual se acopla con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (diclorhidrato de NED) para formar un colorante azo púrpura rojizo. La intensidad del color de este complejo es proporcional a la concentración de nitrito en la muestra. La absorbancia máxima del complejo formado es 540 nm. Finalmente se construye la curva de calibración que obedece la ley de Beer con una serie de estándares de nitritos.

La aplicación del método estudiado en la contaminación a vertimientos domésticos que desembocan en el río Santa, fertilizantes utilizados en la agricultura y las descargas de efluentes mineros en sus aguas, provocan la contaminación de las mismas por metales y nutrientes.

Los nutrientes agrupan a los iones nitratos y nitritos entre otros compuestos como el fósforo, nitrógeno amoniacal, nitrógeno total, etc.; los iones nitritos bastante tóxicos para el ser humano causan una enfermedad conocida como la metahemoglobinemia.

II. NITRATOS Y NITRITOS

2.1. QUÍMICA DEL NITRÓGENO

El nitrógeno constituye el 78% del volumen de la atmósfera terrestre, en ella existe como molécula de N_2 .

Aunque el nitrógeno es un elemento clave en los seres vivos sus compuestos no son tan abundantes en la corteza terrestre, generalmente se encuentran en zonas desérticas como salitre (KNO_3 ó $NaNO_3$)⁽¹⁾.

El nitrógeno es un gas incoloro, inodoro é insípido formado por moléculas de N_2 , su punto de fusión es $-210^\circ C$ y su punto de ebullición normal es $-196^\circ C$.

La Molécula de nitrógeno es muy poco reactiva, debido al fuerte triple enlace entre los átomos de nitrógeno (la energía de disociación de la unión $N \equiv N$ es 941 KJ/mol)

La configuración electrónica del átomo de nitrógeno es:



El nitrógeno exhibe todos los estados de oxidación de +5 a -3, como el nitrógeno ocupa el cuarto lugar en electronegatividad después del flúor, oxígeno y cloro, presenta estados de oxidación positivos solamente en combinación con estos elementos⁽¹⁾

TABLA 2.1. Estados de Oxidación del nitrógeno

+ 5	N_2O_5, HNO_3, NO_3^-
+ 4	NO_2, N_2O_4
+ 3	HNO_2, NO_2^-, NF_3
+ 2	NO
+ 1	$N_2O, H_2N_2O_2, N_2O_2^{\pm}, NF_3$
0	N_2
- 1	NH_2OH, H_2NF
- 2	N_2H_4
- 3	NH_3, NH_4^+, NH_2

En la Figura 2.1. se resume la interconversión de diversas especies comunes de nitrógeno y sus correspondientes potenciales estándar de electrodo.

Los potenciales positivos indican que los óxidos de nitrógeno y los oxianiones mostrados son agentes oxidantes fuertes.

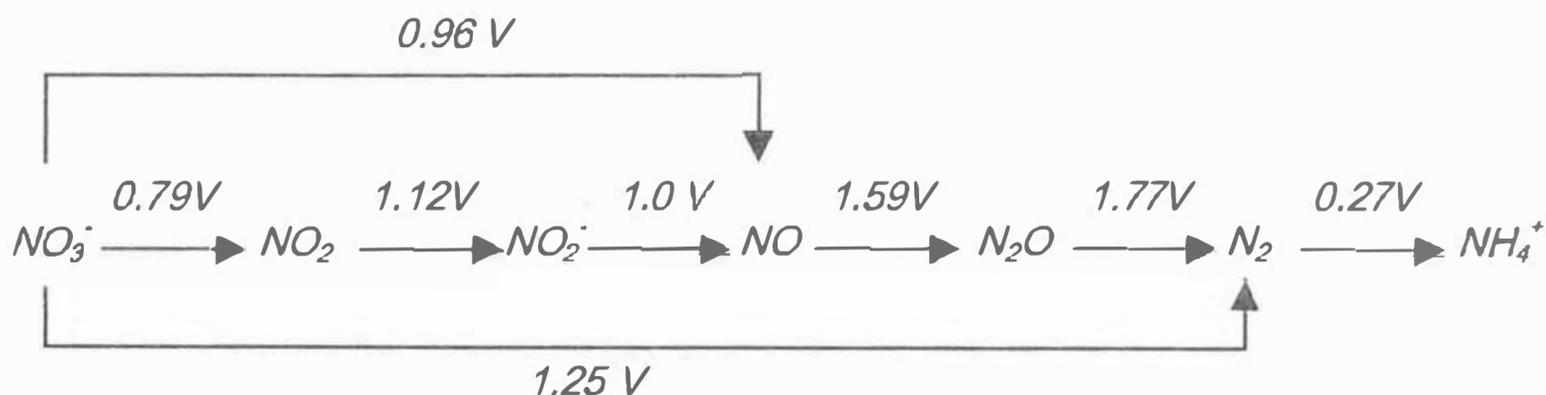


FIGURA N°2.1. Potencial estándar de electrodo en solución ácida, para la reducción de algunos compuestos comunes que contienen nitrógeno en diversos estados de oxidación.

2.2 NITRATOS

La estructura del ion nitrato se muestra en la Figura N°2.2.

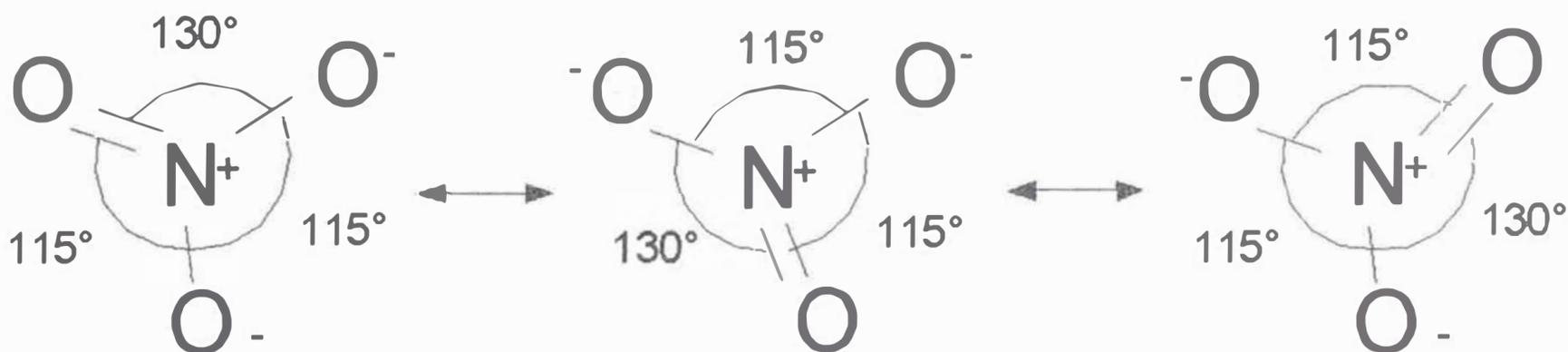


FIGURA N°2.2. Estructura del ion nitrato⁽²⁾

Los nitratos iónicos son estructuralmente completamente diferentes de las sales de tipo $A_n(XO_3)_n$, formadas por otros elementos del grupo V, Contienen al ion nitrato plano equilátero, semejante geoméricamente a los iones BO_3^- y CO_3^{2-} ; en contraste con los iones SO_3^{2-} piramidales y con iones polímeros $(PO_3)_n^{n-}$ de los metafosfatos.

La longitud de enlace N-O del NO_3^- es próxima a 1,22Å en varios nitratos, además de los nitratos normales se conocen sales $M[H(NO_3)_2]$ y $M[H_2(NO_3)_3]$ en las que M es un ion voluminoso como K^+ , Rb^+ y Cs^+ o los iones amonio o arsonio^(1,2).

Nitratos metálicos y nitratos complejos.

Existen varios grupos de compuestos en los que el nitrato está enlazado directamente a uno ó más átomos metálicos, por enlaces que presumiblemente tienen un carácter covalente considerable. Entre los compuestos de nitrato tenemos:

- a) nitratos metálicos volátiles, $M(\text{NO}_3)_n$ $M=\text{Cu, Zn, Hg, Mn, Pb}$. Ejemplo: $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$
- b) nitratos complejos, $[\text{M}(\text{NO}_3)_n]^{m-}$ $M=\text{Al, In, Mn, Fe, Ce, Au}$. Ejemplo: $[\text{Au}(\text{NO}_3)_4]^- \text{K}^+$
- c) compuestos oxinitrato, $\text{MO}_x(\text{NO}_3)_y$ $M: \text{Fe, Ti, Nb, V, Cr, Re}$. Ejemplo: $\text{FeO}(\text{NO}_3)$
- d) complejos de coordinación que tiene $-\text{NO}_3$ como ligando: monodentado, bidentado y puente.

Los nitratos metálicos anhidros o los nitratos iónicos anhidros incluyen los compuestos familiares, solubles en agua de los metales alcalinos y alcalino térreos y de unos cuantos metales de los subgrupos B (AgNO_3 , $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) y de los metales de transición $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$.

Reacciones de reducción en presencia de compuestos metálicos

Martín en 1979⁽³⁾ concluye que la reducción de los iones nitrato y nitritos en algunas condiciones de pH es termodinámicamente posible con metales como el Hierro. Young y colaboradores en 1964 obtuvieron los mejores resultados de reducción (93%) a $\text{pH} = 2.5$ después de 4 a 5 horas, la reacción fue la siguiente.⁽³⁾



A $\text{pH} = 5$ la concentración de nitrato se reduce en un 10 a 20 % después de 1 hora a temperatura ambiente.

Tenemos las siguientes reacciones con el aluminio.



2.3. NITRITOS

La estructura del ion nitrito se muestra en la Figura N°2.3.

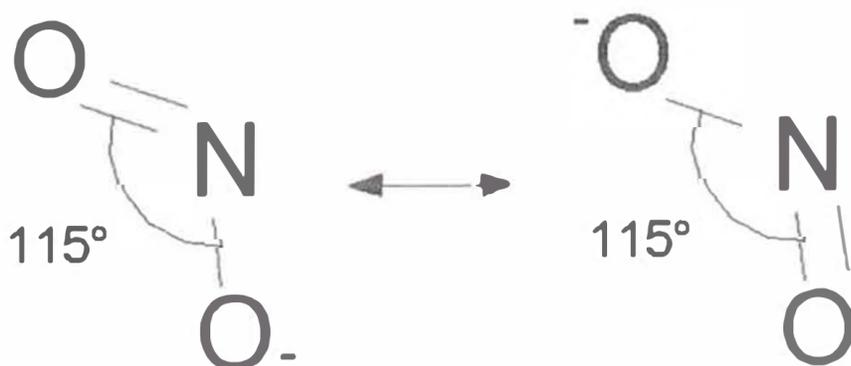


FIGURA N°2.3. Estructura del ion nitrito⁽²⁾

Los nitritos metálicos simples y estables son los de los metales alcalinos, alcalino-térreos y de Zn, Cd, Ag(I) y Hg(I).

Los nitritos iónicos de los metales más electropositivos contienen el ion nitrito, como en el NaNO_2 que tiene la configuración siguiente: ONO , $115,4^\circ$, y N-O , $1,236 \text{ \AA}$.

Los nitritos insolubles más intensamente coloreados de los metales como el Hg son probablemente compuestos esencialmente covalentes, son bien conocidos los nitritos complejos de los metales de transición como: $(\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6])$ y $\text{K}_2\text{Pb}[\text{M}(\text{NO}_2)_6]$ $\text{M} = \text{Fe}, \text{Co}, \text{Ni}, \text{Cu}$).⁽²⁾

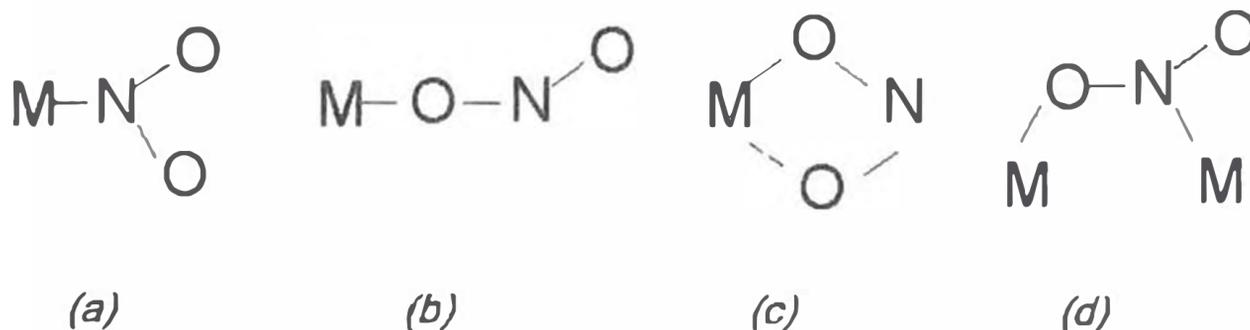


FIGURA N°2.4. Ion nitrito como ligando enlazado directamente a un átomo metálico⁽²⁾

De la Figura N°2.4. el ion nitrito puede funcionar de la siguiente manera:

a) Enlazado a través del nitrógeno como los nitroiones complejos como $[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]^{3-}$

b) Enlazado a través del oxígeno como en $\text{Ni}[(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]_2(\text{ONO})_2$.

c) Como ligando bidentado, como en $[\text{Cu}(\text{bipir})_2(\text{ONO})]\text{NO}_3$

d) Como puente asimétrico entre dos átomos M, formando un puente plano, $(\text{NH}_3)_4\text{CoNH}_2\text{NO}_2\text{Co}(\text{NH}_3)_4$

III. AGUAS SUPERFICIALES

3.1. CARACTERÍSTICAS DEL AGUA

Las características físicas, químicas, biológicas y bacteriológicas del agua son propias de su naturaleza y del contenido de sustancias de diversa índole, así como del ordenamiento de la misma, conformándose un complejo conglomerado que la hace tan peculiar y rica en propiedades.

Dentro de las características físicas del agua cabe destacar su elevado calor específico, altos calores latentes de fusión y evaporación mayores que los de cualquier otra sustancia; todo lo que contribuye a convertirla en un factor importante de equilibrio para regular los cambios de temperatura del medio.

Las propiedades químicas del agua están relacionadas con el contenido de sales disueltas en ella, como por ejemplo el contenido de aniones carbonatos, bicarbonatos é hidróxidos que determinan la acidez y/o la alcalinidad del agua. Entre otros principales aniones

tenemos a los cloruros, sulfatos y nitratos, los cationes como el calcio, magnesio, hierro y otros, que determinan la dureza total. También puede haber materia orgánica en solución o suspensión.

Las propiedades biológicas se circunscriben a la presencia de pequeños animales (como los insectos, etc.), algas, hongos y/o residuos de variada especie que en algunos casos son transmisores de enfermedades.

Por último las características microbiológicas se producen por la presencia de bacterias de diversa índole, siendo algunas patógenas y otras inocuas^(5,6).

3.2. AGUA SUPERFICIAL: Fuentes y Usos

Agua Superficial: agua dulce que discurre o se encuentra sobre la superficie terrestre.

Fuentes de agua superficial

La disponibilidad del agua superficial proviene de diversas fuentes, ríos, lagos, lagunas naturales y embalses.

Usos del agua superficial

El agua es un elemento esencial para la vida, el recurso nos lo brinda la naturaleza y es útil para el consumo propio y para las diferentes actividades económicas y sociales que desarrollamos.⁽⁷⁾

Los usos del agua superficial se pueden agrupar en los siguientes rubros generales:

- a) uso doméstico (bebida, higiene, desagüe, etc.)*
- b) uso agrícola y pecuario (irrigaciones, cultivos sin tierra, ganado, etc.)*
- c) uso piscícola*
- d) uso industrial (producción de mercancía y energía)*
- e) Uso recreativo y otros usos (termal, medicinal)*

3.3. CALIDAD DEL AGUA SUPERFICIAL.

La calidad del agua de fuentes superficiales depende del carácter y área de la cuenca, de su geología y topografía, de la extensión y naturaleza del desarrollo realizado por el hombre, de la época del año y de las condiciones del tiempo.

La calidad del agua definida como la suma de las propiedades físicas, químicas y biológicas de las aguas naturales reviste importancia vital, por cuanto las corrientes contaminadas crean problemas a la salud humana, animal y a las plantas; así como en conductos y demás instalaciones industriales^(5,8).

Críterios y Normas de clasificación.

La Ley General de Aguas (Decreto Ley N° 17752, 1970 Lima, Perú). Aprobada por Decreto Supremo N° 261-69-AP y Decreto Supremo N° 41-70-A es la norma peruana vigente que clasifica a las aguas superficiales según las exigencias de cada uno de los tipos de uso, según el grado de aceptabilidad del recurso.^(5,8)

El artículo N° 81 de dicha ley, clasifica a las aguas de la siguiente manera:

- I. Aguas de abastecimiento doméstico con simple desinfección.*
- II. Aguas de abastecimiento doméstico con tratamiento equivalente a los procesos combinados de mezcla y coagulación, sedimentación, filtración y cloración, aprobados por el Ministerio de Salud.*
- III. Aguas para riego de vegetales de consumo crudo y bebida de animales.*
- IV. Aguas de zonas recreativas de contacto primario (baños y similares).*
- V. Aguas de zonas de pesca de mariscos bivalvos.*
- VI. Aguas de zonas de preservación de fauna acuática y pesca recreacional o comercial.*

El artículo N° 82 define los valores límites para los diferentes parámetros (ver Anexo N° 1), Para el caso de nitrato ver la Tabla 3.1, esta ley no contempla el valor límite para el ion nitrito en las diferentes clases de agua.

TABLA 3.1. Valores límites de nitratos para las diferentes clases de agua

<i>CLASE</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>
<i>Nitratos (mg N-NO₃⁻/l)</i>	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	<i>0.1</i>	<i>N.A</i>	<i>N.A.</i>	<i>N.A.</i>

Nota: N.A. valor no aplicable

IV. CONTAMINACIÓN POR NITRATOS Y NITRITOS EN AGUAS SUPERFICIALES

4.1 FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE AGUAS SUPERFICIALES

Podemos definir como agua contaminada, a aquella que consideramos nociva para el fin al cual se le quiera destinar, dependiendo de estos fines tendremos diferentes tipos de agua contaminada.

Las aguas superficiales están sujetas a diferentes tipos de contaminación:

- a) por descargas de desagües domésticos*
- b) por descargas de residuos industriales (no mineros) y*
- c) por descargas de industrias mineras.*

En el primer caso la mayoría de las poblaciones del Perú descargan sus aguas negras en los cursos de las aguas contaminándolas en mayor o menor grado, según sea el volumen del cuerpo receptor.

La contaminación de los cursos de agua por las industrias en afecta grandemente a las aguas para la piscicultura, debido a los efectos físico-químicos, ya que algunas industrias como curtiembres, fábricas de papel y otras eliminan residuos altamente tóxicos y con alta demanda bioquímica de oxígeno lo que impide el desarrollo de la flora y de la fauna en estas aguas.^(4,7)

La contaminación de las aguas por la industria minera representa un grave problema, por cuanto la eliminación de los residuos líquidos provenientes de los procesos químicos para la obtención de los minerales, son derivados a los cursos de agua y afectan la calidad físico-química de estos, impidiendo el desarrollo de la vida acuática.

4.2 FUENTES DE CONTAMINACION POR NITRATO Y NITRITO

Los nitratos y nitritos son iones presentes en la naturaleza que forman parte del ciclo del nitrógeno (ver Figura N°4.1).

El nitrato se utiliza principalmente en los fertilizantes inorgánicos y el nitrito sódico se utiliza como conservante de alimentos, especialmente en las carnes curadas.

Las concentraciones de nitratos y nitritos suelen ser bajas en las aguas superficiales, pero pueden alcanzar niveles elevados como resultado de escorrentía de tierras agrícolas, la escorrentía de vertederos de basura o la contaminación con desechos humanos o animales^(9,10).

La cloraminación puede dar lugar a la formación de nitritos en el sistema de distribución y la contaminación de nitrito puede aumentar a medida que el agua fluye hacia los extremos del sistema, ver ecuación.⁽¹¹⁾

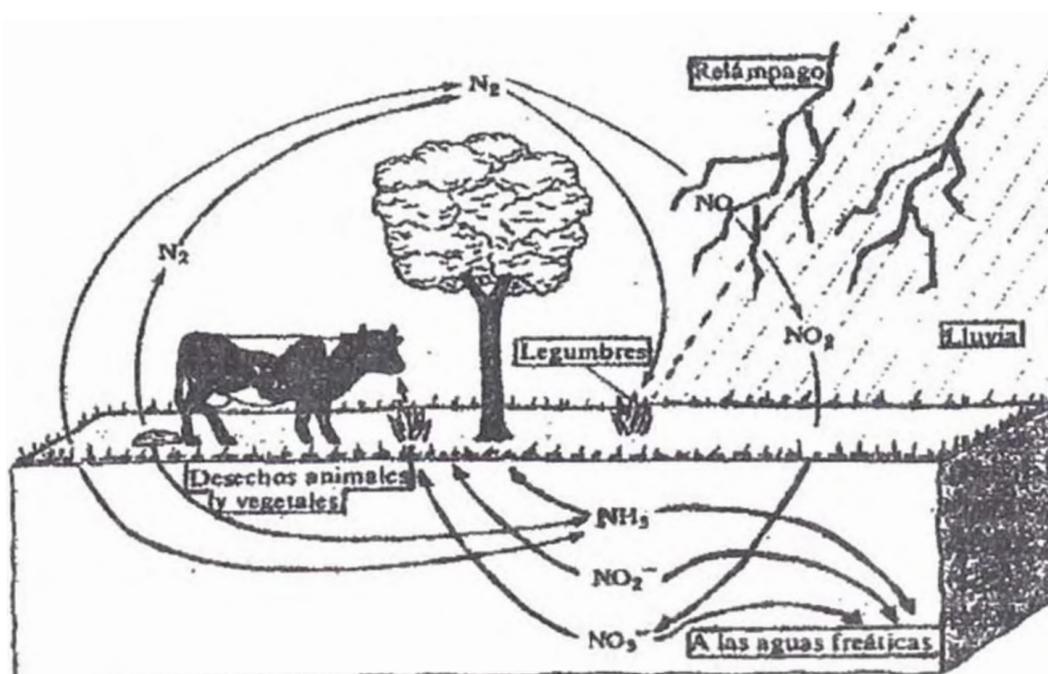
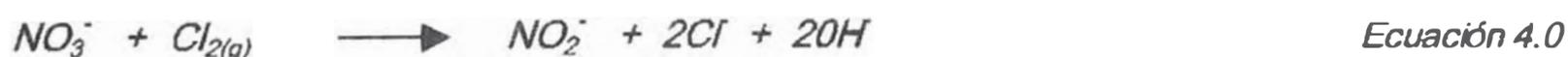


Figura N°4.1. Ciclo del nitrógeno

Entre las fuentes de contaminación por nitratos y nitritos en las aguas superficiales tenemos:

- a) Oxidación de depósitos de materia orgánica.
- b) Fertilizantes químicos
- c) Aguas residuales
- d) Precipitación
- e) Fijación bacteriana del nitrógeno atmosférico.

En las prácticas culturales se incorpora al suelo, materia orgánica (abono orgánico) y fertilizantes nitrogenados, una parte es utilizada por el cultivo y el remanente se distribuye como sigue:

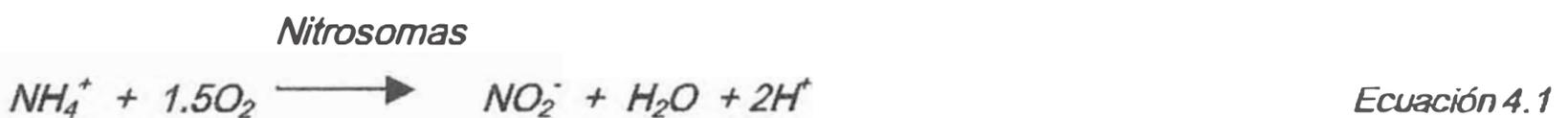
Primero los microorganismos del suelo descomponen la materia orgánica, liberando al nitrógeno en forma de amonio o amoniaco, NH_3 , NH_4^+ (amonificación)

Luego bajo condiciones de buena aereación y temperatura favorable la activación biológica de los nitrosomas oxidan rápidamente al amonio o amoniaco a la forma de nitrito, NO_2^- , entonces las nitrobacterias toman el oxígeno del aire y lo convierten a nitrato, NO_3^- (nitrificación).

Proceso de nitrificación biológica

La nitrificación biológica es realizada por bacterias aeróbicas químicamente litotróficas que oxidan al nitrógeno mineral en presencia de oxígeno. La reacción toma lugar en dos fases:

Fase del nitrito



Fase del nitrato



La fase del nitrito es el estado limitante de la nitrificación, además la velocidad de reacción y el rango en el cual puede ocurrir la nitrificación depende de la concentración de los substratos (O_2 y NH_4^+) y de las condiciones del medio externo, principalmente del pH y temperatura. La influencia de la concentración de los substratos sobre la velocidad de reacción y nitrificación puede ser expresada por la ecuación de Monod.

$$\mu = \mu_{max} * [S_i / (k_i + S_i)] \quad \text{Ecuación 4.3}$$

Donde:

μ_{max} = tasa máxima específica de crecimiento

S_i = concentración del substrato i

K_i = constante de Michaelis – Menden

μ = velocidad de reacción.

Los efectos de la concentración de oxígeno sobre la velocidad de la nitrificación muestra que sobre 1.5 a 2mg/l de O₂, la velocidad de oxidación biológica de NH₄⁺ es estable a valores óptimos (Stankewich 1972), 1mg/l de NH₄⁺ consume 3.55 mg/l de oxígeno)

La temperatura afecta la velocidad de la nitrificación, el nivel óptimo para el crecimiento de la bacteria nitrificante es alrededor de 30°C, debajo de 5°C la reacción se reduce significativamente.

El rango de pH óptimo para el crecimiento de los nitrosomas es entre 7.1 a 8 (Engle y Alexander, 1958), por tanto una alcalinidad baja es necesaria para la nitrificación (1 mg/l de NH₄⁺ consume 11.2 mg/l de HCO₃⁻). A pH menores de 6 no ocurre la nitrificación.⁽⁴⁾

Posteriormente el paso de nitrito a nitrato es más rápido que el paso de amonio a nitrito, debido a que generalmente no hay acumulación de nitrito y consecuentemente el contenido de amoníaco y nitrato puede ser alto en el suelo, a pesar de eso, el nitrito puede acumularse y tener un efecto tóxico.

Finalmente cuando el nitrato es expuesto a condiciones de pobre aireación (reducción) puede ser reducido fácilmente a nitrógeno gaseoso N₂ y se volatiliza a la atmósfera (denitrificación)⁽¹²⁾.

Reducción microbiológica del nitrato

La reducción microbiológica del nitrato es posible en tres diferentes procesos:

- asimilación del nitrato
- amonificación del nitrato
- denitrificación

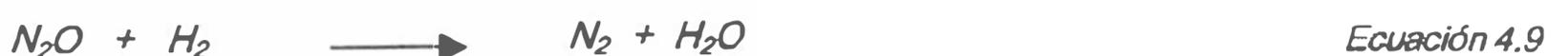
Algunas bacterias aeróbicas y anaerobias son capaces de asimilar el nitrato, en este proceso el nitrato es primero reducido a nitrito y luego a amonio. Para la asimilación del nitrato por ejemplo tenemos la síntesis de aminoácidos, que serán usados para la estructura celular con compuestos de nitrógeno, según la ecuación siguiente:



La amonificación del nitrato depende de las sustancias orgánicas degradables y de las condiciones anaerobias.



En el proceso de denitrificación, la bacteria anaerobia reduce el nitrato a gas nitrógeno (N₂), en ausencia de oxígeno molecular.⁽⁴⁾



4.3 EFECTOS EN LA SALUD POR CONTAMINACIÓN DE NITRATO Y NITRITO

Los valores de las concentraciones límites de nitratos y nitritos, establecidos por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), son:

valor guía de nitrato es de 50 mg NO₃⁻/l (11.29 mg N-NO₃⁻/l) y

el valor guía de nitrito es 3 mg NO₂⁻/l (0.9 mg N-NO₂⁻/l).

Valor Guía: Valor máximo permisible en el agua de bebida

En la Tabla 4.1. se puede observar los límites de nitrato en el agua de bebida de varias agencias.⁽⁴⁾

TABLA 4.1. Límites de nitrato en el agua de bebida

<i>Agencia</i>	<i>Año</i>	<i>mg NO₃⁻/l</i>	<i>mg N-NO₃⁻/l</i>
<i>WHO Europea</i>	<i>1970</i>	<i>100</i>	<i>22.6</i>
		<i>50</i>	<i>11.3</i>
<i>WHO Intemacional</i>	<i>1971</i>	<i>45</i>	<i>10.2</i>
<i>US EPA</i>	<i>1977</i>	<i>44.3</i>	<i>10</i>
<i>Salud y bienestar, Canadá</i>	<i>1978</i>	<i>44.3</i>	<i>10</i>
<i>EC</i>	<i>1980</i>	<i>50</i>	<i>11.3</i>
<i>WHO (Guidelines)</i>	<i>1984</i>	<i>44.3</i>	<i>10</i>

En razón de la posible presencia simultánea de nitrito y nitrato en el agua de bebida la suma de las concentraciones(C) de cada una de ellas en relación con su correspondiente valor guía (VG) no debe ser mayor de 1 ver la ecuación 14⁽¹¹⁾

$$\frac{C_{\text{nitrito}}}{VG_{\text{nitrito}}} + \frac{C_{\text{nitrato}}}{VG_{\text{nitrato}}} \leq 1 \quad \text{Ecuación 4.10}$$

Altas concentraciones de los iones nitratos y nitrito presentes en el agua potable (valores mayores a los valores guía), pueden producir la Metahemoglobinemia que es una enfermedad que afecta a los lactantes^(13,14).

Los nitratos en sí mismos son relativamente inocuos, lo que sucede es que la acidez del jugo gástrico en niños menores de 6 meses es baja, las bacterias reductoras del intestino delgado prosperan, reduciéndose los iones nitratos a nitritos y éstos reaccionan con la

hemoglobina produciendo la metahemoglobina (metHb), cuando el ion ferroso (Fe II) de la hemoglobina es oxidado a ion férrico (Fe III), debido a la producción de metHb disminuye la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre.

Con respecto a los niveles de peligrosidad de la metahemoglobina en el cuerpo humano se tiene las siguientes consideraciones:

Niveles normales de metHb son de 2% para adultos y de menos de 3% para lactantes, a un 10% de metHB se produce cianosis (la piel toma coloración azul), a un 20% empieza la anoxia cerebral y finalmente a un 50%-60% ocasiona la muerte⁽¹²⁾.

Debemos mencionar que tanto los nitratos como los nitritos no son clasificados por U.S.EPA de acuerdo a su carcinogenicidad, sin embargo existe la posibilidad de transformación a productos carcinógenos.

Especialmente se ha demostrado que el nitrito puede reaccionar con aminas y amidas secundarias y carbamatos para formar compuestos N-nitrosos; varios de estos compuestos han sido clasificados como carcinógenos potentes para el ser humano.

Nitrosaminas han sido encontradas que son causantes de tumores en el hígado, esófago, pulmones cavidad oral y nasal, páncreas y tiroides.

Nitrosamidas han sido encontradas que son causantes de tumores en el estómago, intestino delgado, el cerebro, sistema nervioso, huesos y piel^(3,14).

V. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS

5.1. MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS

En la literatura se reportan dos métodos analíticos para la determinación de nitritos en aguas, estos métodos son:

Método colorimétrico

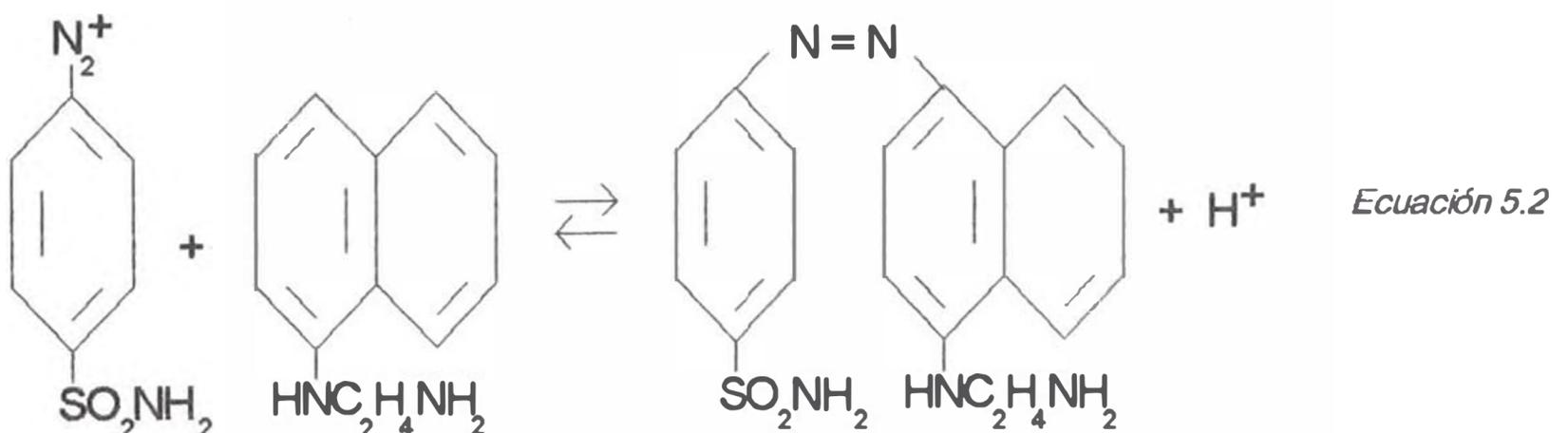
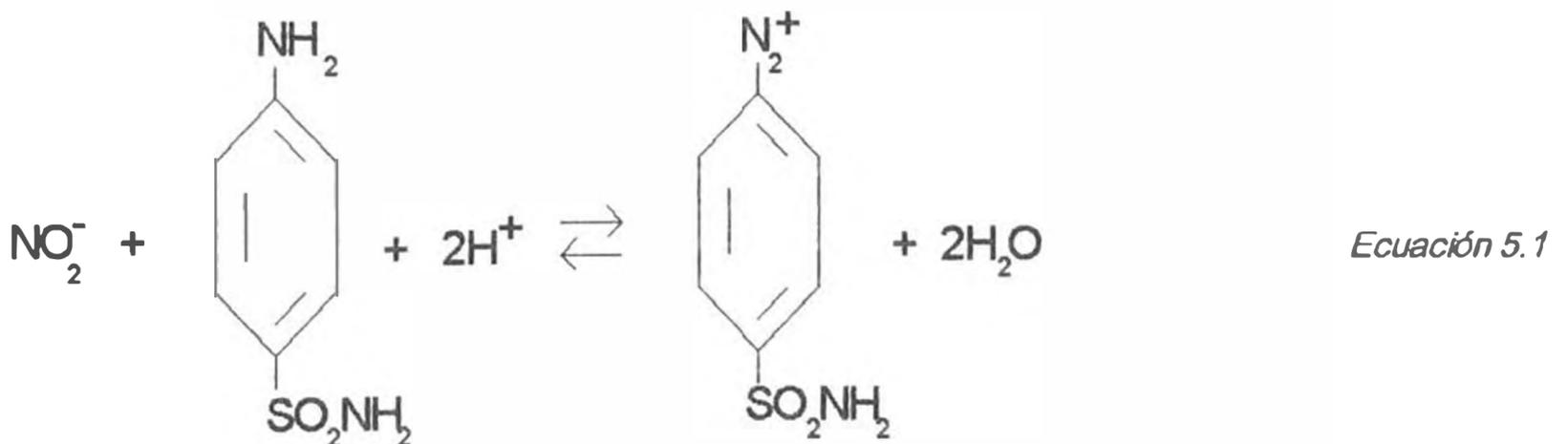
Método de cromatografía iónica

5.1.1. METODO COLORIMETRICO

El método consiste en la reacción del ion nitrito (NO_2^-) con sulfanilamida a pH 2.0 - 2.5, en el que forma un compuesto diazotado (ver Ecuación 5.1) y su copulación con diclorhidro de N-(1-naftil)-etilendiamina (dichlorhidrato de NED) produce un azo colorante púrpura rojizo (ver Ecuación 5.2).

La absorbancia del complejo formado se determina a 540 nm. Luego se prepara una curva de calibración con patrones de nitrito, el sistema obedece la ley de Beer hasta 180 $\mu\text{g N-NO}_2^- / \text{L}$ con un paso de luz de 1 cm. Se puede determinar concentraciones de nitrito en el rango de 0.005 a 0.025 $\text{mg N-NO}_2^- / \text{L}$ con un paso de luz de 5 cm.^(10,15)

Las principales interferencias son: Sb^{+3} , Au^{+3} , Br^{+3} , Fe^{+3} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Ag^+ , PtCl_6^{-2} y VO_3^{-2} , debido a la precipitación en condiciones de la prueba⁽¹⁰⁾.



5.1.2 MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA IÓNICA

El método de cromatografía iónica es una técnica instrumental única que se puede utilizar como la medida secuencial y rápida de aniones como nitritos, nitratos, cloruro, bromuro, fluoruro, sulfato y fosfato.

El método consiste en inyectar una muestra de agua en una corriente de disolvente carbonato – bicarbonato que pasa a través de una serie de intercambiadores de iones.

Los aniones que interesan (NO_2^-) se separan según sus afinidades relativas mediante un intercambiador de baja capacidad fuertemente aniónico. Los aniones separados son dirigidos hacia un intercambiador catiónico fuertemente ácido (supresor de fibra); también puede separarse a través de un supresor de micromembrana bañada en una solución muy ácida de flujo continuo (solución regenerante).

En el supresor los aniones separados se transforman en su forma ácida de alta conductividad, y el disolvente carbonato –bicarbonato se convierte en ácido carbónico débilmente conductor; los aniones separados en sus formas ácidas se miden por conductividad y se identifican por la base de tiempo de retención comparado con los patrones.

La determinación cuantitativa se realiza midiendo la altura del pico o la superficie que está delimitada.^(10,16)

5.2. MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS

La determinación de nitratos es difícil, debido a los procedimientos relativamente complejos y a la elevada probabilidad que se hallen sustancias interferentes.

Los métodos analíticos para la determinación de nitratos reportados en la literatura son los siguientes^(10,15,16)

- *Métodos espectrofotométricos en el rango ultravioleta cercano*
- *Métodos espectrofotométricos en el rango visible*
- *Método del electrodo*
- *Método de cromatografía iónica.*

5.2.1. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS EN EL RANGO ULTRAVIOLETA CERCANO.

Estos métodos por lo general involucran la nitración de compuesto tipo fenol. Entre ellos podemos mencionar dos métodos:

- *Método espectrofotométrico ultravioleta selectivo*
- *Método espectrofotométrico con 2,6-dimetilfenol*

5.2.1.1. MÉTODO ESPECTROFOTÓMETRICO ULTRAVIOLETA SELECTIVO.

Este método se aplica sólo para muestras con bajo contenido en materia orgánica como son las aguas potables.

El método consiste en determinar la absorción Ultravioleta del ion nitrato a 210 nm. Uno de los principales interferentes es la materia orgánica disuelta debido a que puede absorber también a 210 nm. Se puede aplicar un factor de corrección por la absorbancia de materia orgánica realizando una segunda medida a 275 nm ya que el nitrato no absorbe a esta longitud de onda. El factor de corrección se puede establecer por el método de adiciones en combinación con el análisis del contenido original de nitrato por otro método.

La absorción UV a 210 nm para el ion nitrato se muestra en la Figura N°5.1.⁽¹⁷⁾

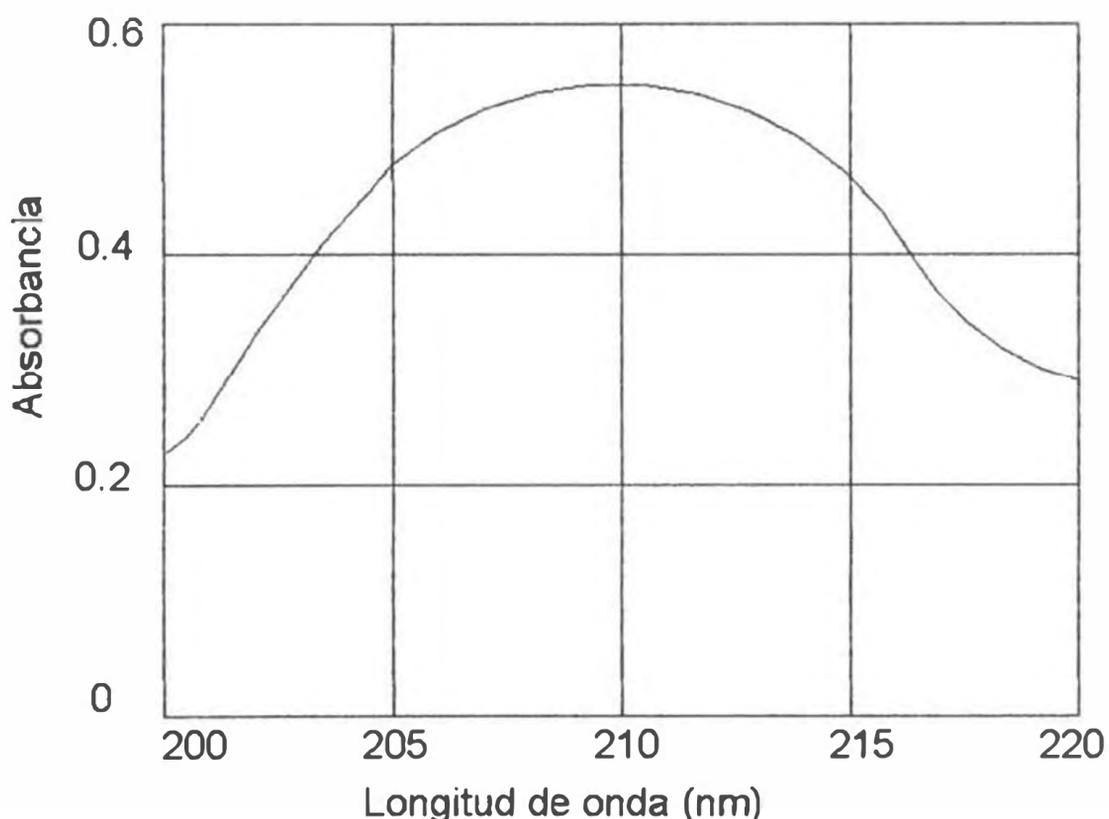


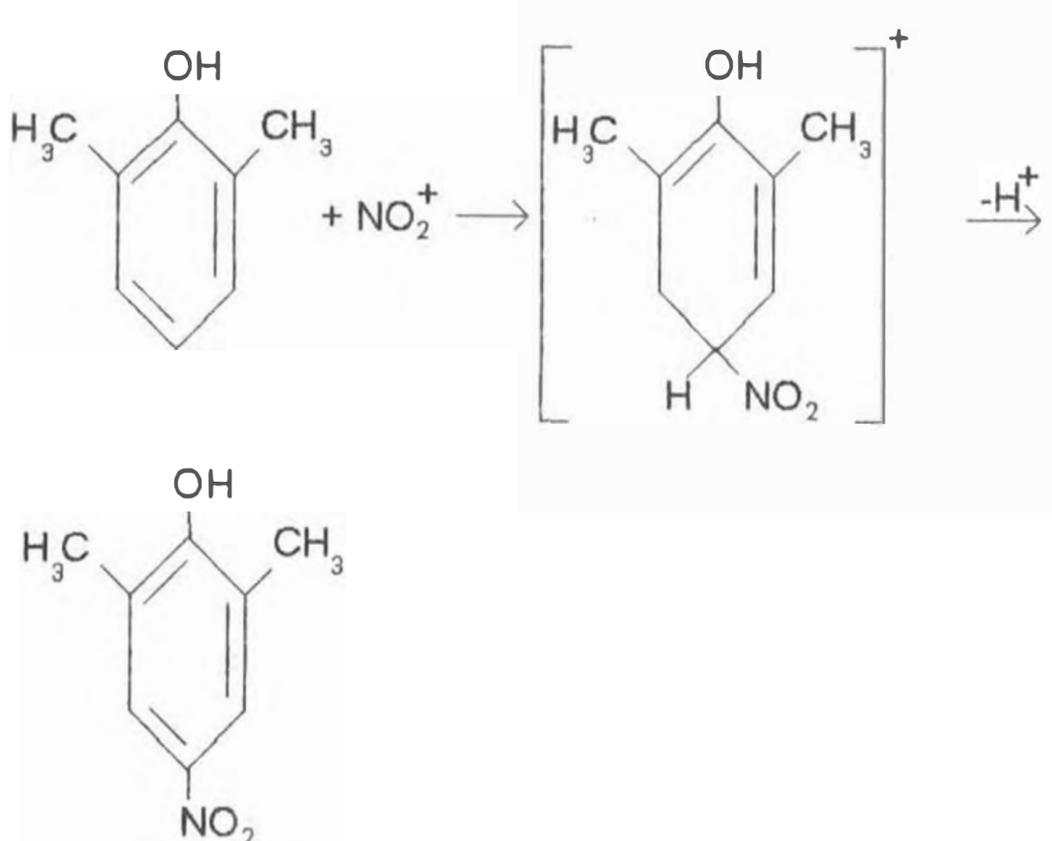
FIGURA N°5.1. Curva de absorción del ion nitrato

5.2.1.2. MÉTODO ESPECTROFOTÓMETRICO CON 2,6 DIMETILFENOL

En medio ácido sulfúrico, el ion nitrato es transformado en ion nitronio según la siguiente ecuación.^(18,19)



El ion nitronio reacciona con el 2-6-Dimetilfenol (disuelto en medio ácido acético concentrado) produciendo un nitro compuesto (ver Ecuación 5.4), el cual tiene una absorbancia máxima entre 295 a 320 nm.



Ecuación 5.4

5.2.2. MÉTODOS ESPECTROFOTÓMETRICOS EN EL RANGO VISIBLE.

Los métodos espectrofotométricos en el rango visible también llamados métodos colorimétricos involucran la reducción de nitrato (NO_3^-) en nitrito (NO_2^-) ó amonio (NH_4^+).

Todos los métodos utilizan un agente reductor como cadmio, zinc, sulfato de hidrazina, etc. De todos estos métodos reportados en la literatura^(10,15,16,19), sólo se describirá el método seleccionado de reducción con cadmio, tema del presente trabajo.

5.2.2.1. MÉTODO COLORIMÉTRICO DE REDUCCIÓN CON CADMIO

El método consiste en la reducción casi cuantitativa del ion nitrato (NO_3^-) en ion nitrito (NO_2^-) en presencia de gránulos de cadmio, malla 20-100 (o tamaño de partículas de granulometría 0.3 a 1.6 mm), tratadas con sulfato de cobre y empacadas en una columna de vidrio. El nitrato reducido más el nitrito presente en la muestra reaccionan con sulfanilamida a pH 2.0 a 2.5 y forma un compuesto diazotado (ver Ecuación 5.1) y su copulación con diclorhidro de N-(1-naftil)-etilendiamina (dichlorhidrato de NED) para forman un azo colorante púrpura rojiza (ver Ecuación 5.2). La absorbancia del complejo formado se determina a 540 nm con un paso de luz de 1 cm. Se prepara una curva de calibración con patrones de nitratos.

Existen métodos automatizados de reducción de cadmio reportados en la literatura^(10,16), como el método 353-2 U.S. EPA 1993, el método 4500- NO_3^- F y 4500- NO_3^- I de APHA-AWWA-WEF. Estos métodos requieren equipos analíticos sofisticados y automáticos.

5.2.3. MÉTODO DEL ELECTRODO SELECTIVO

El electrodo de nitrato es un sensor selectivo que desarrolla un potencial a través de una membrana delgada, porosa e inerte y que se mantiene en posición como un intercambiador iónico líquido, inmiscible con agua.

El electrodo responde a la actividad del ion NO_3^- aproximadamente entre 10^{-5} y 10^{-1} M (0.14 a 1400 mg N- NO_3^- /L).

En este método existe una marcada interferencia de cloruros y bicarbonatos en relación de 1 a 5 y de 1 a 10 respectivamente, estos iones se encuentran generalmente en aguas superficiales, también interfieren los iones NO_2^- , CN^- , S^{2-} , Br^- , I^- , ClO_3^- y el ion ClO_4^- ; estos iones normalmente no se encuentran en niveles significantes en las aguas potables.

Por tanto queda limitada su aplicación para otros tipos de agua donde existe la probabilidad de que estén presentes.

5.2.4. MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA

El método consiste en inyectar una muestra de agua en una corriente de disolvente carbonato – bicarbonato que pasa a través de una serie de intercambiadores de iones.

Los aniones que interesan (NO_3^-) se separan según sus afinidades relativas mediante un intercambiador de baja capacidad, fuertemente aniónico.

Los aniones separados son dirigidos hacia un intercambiador catiónico fuertemente ácido (supresor de fibra); también puede separarse a través de un supresor de micromembrana bañada en una solución muy ácida de flujo continuo (solución regenerante).

En el supresor los aniones separados se transforman en su forma ácida de alta conductividad, y el disolvente carbonato –bicarbonato se convierte en ácido carbónico débilmente conductor., los aniones separados en sus formas ácidas se miden por conductividad y se identifican por la base de tiempo de retención comparado con los patrones.

La determinación cuantitativa se realiza midiendo la altura del pico o la superficie que está delimitada⁽¹⁰⁾.

VI. TECNICAS DE VALIDACION Y CONTROL DE CALIDAD DEL ANALISIS

Criterios Generales de la norma internacional, ISO/DIS 17025 –1999. “requisitos generales para certificar la competencia de los laboratorios de calibración y ensayo”.

6.1. TECNICAS DE VALIDACION

La validación es el procedimiento de la comprobación total de la efectividad de un método analítico, si está libre de errores sistemáticos y aleatorios, no sólo en la calibración del método analítico sino también en el análisis de muestras reales.

Por tanto es conveniente saber qué entendemos por método analítico y cómo éste está relacionado al proceso de medición conducido en el laboratorio.

En química analítica las mediciones son hechas algunas veces por un método directo, pero por razones de conveniencia, usamos más a menudo un método indirecto, basado en principios o leyes fundamentales o empíricas que involucran varias propiedades físicas, químicas y biológicas de la materia, energía y radiación.

6.1.1. MÉTODO Y PROCESO DE MEDICIÓN

*La **medición de un método** se define en base a las especificaciones de un equipo a ser usado, las operaciones a ser realizadas, las condiciones en las cuales son llevadas a cabo dichas operaciones.*

*Un **Proceso de medición** es la realización del método de medición en términos de un instrumento particular, equipo, condiciones, etc.*

El uso de un método oficial no significa que los problemas no ocurrirán, todos los métodos en su realización tienen características que les resta perfección, por lo que es un requisito indispensable que tales características sean conocidas y aceptadas, para el uso que se dé a los resultados del análisis.

El conocimiento de las características del método es esencial para la seguridad del analista, en el desempeño de la técnica del laboratorio que satisface las características de la realización del método al mismo tiempo que se producen los resultados.

Algunas de las organizaciones como Environmental Protection Agency EPA, Methods for water and wastewater examination APHA/ AWWA/ WEF, ASTM., La U.S. Pharmacopeia, Etc. publican métodos estándares u oficiales, haciendo de esta manera conocidos sus procedimientos.

Las organizaciones generalmente no facilitan detalles de sus metodologías, por lo que es muy importante la experiencia de realización de los procedimientos para los laboratorios que usan los métodos y la disponibilidad de toda la información posible.

Los atributos de un método analítico son: confiabilidad, viabilidad, aplicabilidad, especificidad, exactitud, precisión y límites de detección.^(20,21)

- a) **Confiabilidad** es un término bastante general que indica la probabilidad que un método dará un resultado incorrecto debido a algún parámetro no controlado o corregido suficientemente. Por ejemplo un parámetro crítico puede ser la humedad o temperatura que puede controlarse si se establece la relación, pero que puede causar resultados incorrectos si ésta relación no se entiende.
- b) **Viabilidad** es el atributo que comprende:
- 1.- El tiempo requerido para conducir el análisis.
 - 2.- La disponibilidad de la lista de reactivos, normas e instrumentos.
 - 3.- El costo de suministro (suministro de agua, electricidad, gas, etc.) necesario.
 - 4.- Seguridad de reactivos, suministro (compra de reactivos) y procedimientos
- c) **Aplicabilidad** es el atributo de un método que trata de la realización satisfactoria del método al nivel de interés y en la matriz de interés.
- d) **Especificidad** en un método significa que la respuesta medida con el método sólo es debida al compuesto que está siendo medido. La mayoría de métodos rutinarios usa sistemas de detección que son relativamente no específicos. La especificidad se logra por la separación y claridad de los pasos aplicados antes del paso de determinación. Otro acercamiento al incremento de la especificidad es la separación múltiple y/o técnicas de determinación, por ejemplo, columnas de GLC con tipos diferentes de detectores. Una de las técnicas más eficaces para lograr la especificidad es la espectrometría de masa.
- e) **Exactitud** es considerada como el error sistemático (sesgo), la diferencia entre el valor verdadero y el valor medido⁽²¹⁾.
- El Centro de Investigación del Agua define la exactitud como el error total de un resultado, es decir que la exactitud representa los errores aleatorios y sistemáticos combinados de los resultados y se dice que mejora en la medida que el error total disminuye.
- La precisión (que es una medida de error aleatorio) es un componente de la exactitud, entonces se habla de precisión y de error sistemático (los dos componentes de la exactitud) más que de precisión y exactitud.
- Los errores sistemáticos pueden ser constante (absoluto) o proporcional (relativo).
- Un error constante se refiere a un error sistemático, independiente de la verdadera concentración de la sustancia a ser determinada y se expresa en unidades de la concentración. Un error proporcional es un error sistemático que

depende de la concentración del analito y se expresa en unidades relativas (porcentaje).

Las fuentes principales de un error constante son:

- 1.- La selectividad insuficiente, el cual es causada por otro componente que también reacciona para que se obtengan valores falsamente altos.
- 2.- Interferencias, esta fuente de error es debida a la presencia de un componente, el cual no produce en sí mismo una reacción pero si inhibe o refuerza la medición.
- 3.- Inadecuada corrección del blanco.

Los errores proporcionales son causados por errores en la calibración y más específicamente por:

- 1.- Una incorrecta asunción de linealidad sobre el rango de análisis y
- 2.- Diferentes pendientes de las líneas de calibración para la muestra y el estándar.

Dols y Armbrecht representan una evaluación del error sistemático y técnicas para su medida. Ellos recomiendan que el error sistemático o sesgo de un método analítico debe ser medido usando el análisis de regresión de Youden y su incertidumbre evaluada por el intervalo de confianza y la técnica derivada por Mandel y Linining^(21,23)

Currie y Devoe presentan otra aproximación para evaluar el error sistemático. Ellos comparan este acercamiento con la medición de la diferencia experimental entre el verdadero valor y los valores medidos. La aproximación consiste en “el análisis detallado de la estructura del proceso de medición química para inferir límites sobre el error total propagado”.

Un proceso de medición química debe estar bajo control, es decir, los valores centrales y la variabilidad son estables. Cuando un proceso de medición química es estable, sus componentes pueden ser analizados. El primer componente es la validez de la muestra. Algunos de los problemas que pueden afectar a la muestra son: contaminación, heterogeneidad e inestabilidad. En análisis de trazas, el blanco puede ser un problema debido a su tamaño y a su variabilidad.

Los pasos de medición pueden muchas veces ser fuentes de error: el sesgo del operador, la calibración y la resolución del instrumento son algunos de los más comunes. La evaluación y reportes de datos también pueden producir error o incertidumbre^(21,23)

De manera práctica la exactitud puede ser expresada como el porcentaje de recuperación que se obtiene al aplicar el ensayo luego de agregar a la muestra cantidades conocidas de analito⁽¹⁵⁾

$$\text{Exactitud } \%E = \frac{\bar{X} - X_{MRC}}{X_{MRC}} \times 100 \quad \text{Ecuación 6.1}$$

Donde:

\bar{X} es el valor promedio de determinaciones repetidas de un material de referencia certificado

X_{MRC} es el valor del material de referencia certificado

Material de Referencia Certificado (MRC)

Es aquel que tiene uno o más parámetros certificados por el procedimiento de una técnica validada y va acompañada de un certificado de trasabilidad u otro documento de una identidad certificadora (por ejemplo NIST, BCR ver Anexo 7, glosario de términos). Un MCR es la herramienta con la cual se determina la exactitud de un procedimiento analítico⁽¹⁵⁾.

En caso de no contar con un MCR la exactitud puede ser evaluada a partir de otro tipo de muestra control, como una solución estándar ó muestra sintéticas.

f) **Precisión** es la medida del error aleatorio. La medida de precisión puede ser expresada en términos de la desviación estándar y la varianza, a veces expresada como un porcentaje y referida como el coeficiente de variación. Hay diferentes componentes de precisión. Algunos de los más importantes son los siguientes:

- 1.- Del analista, este componente cubre al mismo analista que usa el mismo método, en el mismo material, en el mismo día o en los días diferentes.
- 2.- Entre analistas, este componente cubre a diferentes analistas en el mismo laboratorio y material. El componente de precisión (error) entre analistas es normalmente mayor que dentro del analista.
- 3.- Entre laboratorios, el error sistemático del laboratorio se vuelve una parte del error aleatorio para el método.

La precisión varía con relación a la concentración del compuesto medido. A concentraciones bajas se obtiene, una precisión más baja (Horwitz et al. obtuvieron los datos de la Tabla 6.1. de varios estudios colaborativos)

TABLA 6.1. Variación de la precisión con respecto a la concentración

<i>Nivel del compuesto(partes por)</i>	<i>Coefficiente de Variación (%)</i>
100	2
1 000	8
1 000 000	16
1 000 000 000	32

De manera práctica la precisión puede determinarse como la desviación estándar (Ecuación 6.2) o como el coeficiente de variación (C.V.) también llamada porcentaje de la desviación estándar relativa (%RSD) (Ecuación 6.3)^(15,20):

$$Sd = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x)^2}{n - 1}} \quad \text{Ecuación 6.2}$$

$$C.V. = \frac{Sd}{x} * 100 \quad \text{Ecuación 6.3}$$

Donde:

x = valor promedio

x_i = valores individuales

n = número de muestras

Sd = desviación estándar de las muestras

C.V. = coeficiente de variación

g) Límites de detección es uno de los términos más importantes que se utilizan para describir el desarrollo de un método o un instrumento.

Se define como la concentración más baja detectable de un analito por encima del ruido instrumental de un procedimiento y dentro de un límite declarado de aceptación.

Puede representarse en formas diferentes dependiendo de los requerimientos, ellos son:

Límite de detección del instrumento

Límite de detección del método

Límite de detección práctico

Límite de cuantificación

1) Límite de detección del instrumento (LDI)

El LDI es la concentración más baja del analito que un sistema de medición puede detectar y que es estadísticamente diferente de la respuesta obtenida del ruido instrumental⁽¹⁵⁾.

El LDI puede ser usado para indicar la sensibilidad absoluta de las técnicas analíticas y/o instrumentales.

El LDI es obtenido por la adición del analito al blanco (agua Tipo I, ver los tipos de agua para uso del laboratorio en el Anexo N 2) o un solvente orgánico para dar una concentración final de cinco veces el LDI estimado. Se calcula la desviación estándar de siete o más medidas de la solución en el instrumento^(10,15)

El LDI a un nivel de confianza del 95% se calcula de la siguiente ecuación:

$$LDI = t_{(n-1)} * Sd \text{ para } n \geq 7 \quad \text{Ecuación 6.4}$$

Donde:

n es el número de muestras

Sd desviación estándar, (n mayor o igual a siete)

$t_{(n-1)}$ es la distribución de t Student para $n-1$ grados de libertad a un nivel de confianza del 95%

2) Límite de detección del método (LDM)

El LDM es la concentración más baja del analito en el sustrato ideal (agua tipo I), que un método puede ser capaz de detectar y que es estadísticamente diferente de la respuesta obtenida de un blanco corrido a través del método completo, incluyendo la técnica de extracción química y/o pretratamiento de la muestra⁽¹⁵⁾.

Cuando el análisis de los blancos se repiten y muestran una respuesta positiva para el analito, el LDM es obtenido entonces por la siguiente ecuación:

$$LDM = Bk + t_{n-1} * Sd_b \text{ para } n \geq 7 \quad \text{Ecuación 6.5}$$

Donde:

Bk es la señal promedio de los blancos

n es el número de muestras

Sd_b desviación estándar de los blancos, (n mayor o igual a siete)

$t_{(n-1)}$ es la distribución de t Student para $n-1$ grados de libertad a un nivel de confianza del 95%

Cuando el análisis repetitivo del blanco no muestra una respuesta positiva, (blancos no positivos) entonces se debe preparar una muestra sintética con una concentración de cinco veces el LDM que se ha estimado y se debe determinar el LDM según la Ecuación 6.4.

Para métodos que requieran concentración y pretratamiento, el LDM se determina seleccionando un tamaño de muestra estándar (por ejemplo 1 l de agua) y extrayendo, concentrando y reduciendo la muestra a un volumen determinado (por ejemplo 1 ml para HPLC o CG).

3) **Límite de detección práctico (LDP)**

LDP es la mínima concentración del analito en una matriz real que un método puede detectar y es estadísticamente diferente de la respuesta obtenida de un blanco corrido a través de todo el método. Se calcula de la misma manera que el LDM (Ecuación 6.5). Para un método determinado y analito específico el LDP variara con diferentes matrices de muestras, debido a que estas afectan la reproducibilidad, los blancos y los niveles de interferencia. El LDP es siempre igual o mayor que el LDM, pero nunca menor.

4) **Límite de cuantificación (LC)**

LC es el nivel sobre el cual se pueden obtener resultados analíticos con un determinado grado de confianza. El LC es obtenido de la siguiente ecuación:

$$LC = \bar{S}_{BK} + 10 Sd \quad \text{Ecuación 6.6}$$

Donde:

\bar{S}_{BK} es el promedio de lectura de los blancos

Sd es la desviación estándar de las repeticiones

Esto define el nivel sobre el cual se puede cuantificar y también una región entre el LDM y el LC donde la detección es posible pero la cuantificación no. Una vez que se determina que el método tiene atributos aceptables, es aconsejable ejecutar una prueba de desigualdad, en la que se selecciona siete factores. Los cambios de los factores deben ser del tipo o tamaño que se espera que ocurra en el laboratorio normal. Por ejemplo pueden usarse muchos reactivos diferentes o variaciones pequeñas en las concentraciones de los reactivos; puede usarse factores diferentes siempre que las instrucciones no sean específicas. Por ejemplo, mezclas y también puede variarse el tiempo de espera. Estos procedimientos darán alguna indicación acerca de las partes críticas de un procedimiento^(10,25)

6.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS

Hay clasificaciones de los métodos basadas en posiciones científicas, en algunos casos se han diseñado métodos para ser usados en las determinaciones de un compuesto específico en una sustancia específica. Por ejemplo los métodos USP para productos farmacéuticos que están etiquetados como especificaciones USP.⁽²¹⁾ En otros casos los métodos son seleccionados para ser usados sólo después de intensivos estudios de desempeño y son clasificados por APHA AWWA WEF como: propuestos, generales, estándar y especializados^(19,16).

McFarren y colegas⁽²¹⁾ han propuesto un método para la clasificación de métodos, basado en el error total determinado con la siguiente fórmula.

$$\text{Error total} = \frac{(\text{valor absoluto del error de la media} + 2St) * 100}{\text{valor verdadero}} \quad \text{Ecuación 6.7}$$

Donde:

St = desviación estándar de la muestra control.

Los métodos que tienen un error total menos del 25 % serían considerados excelente, y aquellos con un error total entre 25 a 50 % serían considerados aceptables, mientras que aquellos con un error total mayor de 50% serían considerados inaceptables.

6.1.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación de un método analítico es un proceso por el cual se determina y se evalúa sus características, atributos o figuras de mérito para que cumplan los requerimientos de la aplicación deseada⁽²²⁾.

La validación es requerida para un método nuevo (Propuesto) o para uno conocido (Estándar) que sea capaz de dar resultados reproducibles y confiables cuando se emplea diferentes analistas, equipos análogos, en el mismo o en diferente laboratorio.

El propósito de la validación es de identificar y esquematizar el procedimiento y demostrar que es adecuado para el objetivo que fue desarrollado⁽¹⁵⁾. El tipo de programa de validación depende enteramente del método en particular y sus posibles aplicaciones.

6.1.4. CALIBRACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN

La calibración y estandarización del sistema analítico es el proceso por el cual la exactitud del valor verdadero o los valores asignados de los estándares de calibración, son usados para establecer la respuesta del instrumento analítico para las siguientes medidas analíticas⁽¹⁵⁾

- *Estándar de control o muestra control*
- *Estándar de verificación*
- *Blancos de calibración*

6.1.4.1. ESTÁNDAR DE CONTROL (EC)

Es el estándar que se analiza durante la calibración y se emplea para verificar la exactitud de la calibración.

El EC es preparado de stock certificados o de stock intermedios, que son de fuentes diferentes que los usados para preparar los estándares de calibración⁽¹⁵⁾

6.1.4.2. ESTÁNDARES DE VERIFICACIÓN (EV)

Es el estándar que se corre después de la calibración inicial y es usado para verificar la estabilidad (precisión) de la calibración inicial. Normalmente, el estándar equivalente se encuentra en el punto medio del rango de calibración del analito respectivo, este se selecciona y analiza con una frecuencia de 10 a 20 muestras.

6.1.4.3. BLANCOS DE CALIBRACIÓN (BC)

Es el volumen de agua o solvente libre de analito y se emplea el mismo procedimiento usado para la preparación de los estándares de calibración.

El blanco de calibración contiene los mismos reactivos utilizados en los estándares, y es usado como cero de calibración.

El blanco de calibración se mide conjuntamente con los estándares de verificación para monitorear la contaminación.

Las calibraciones estándares se miden en el instrumento analítico en las mismas condiciones que las usadas para las muestras^(15,23)

6.1.4.4. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN POR REGRESIÓN LINEAL

Las curvas de calibración para el análisis mediante espectrofotometría UV-Visible pueden ser lineales o no. En la mayoría de casos cuando la curva es lineal se aplica la Ley de Beer. Para definir la mejor curva de calibración que representa la relación entre absorbancia (y) y concentración (x), se emplea cálculos de regresión lineal.

Normalmente se requiere de tres a seis soluciones estándar de calibración para definir adecuadamente la curva, la curva debe incorporar un estándar de concentración baja del analito que no exceda 10 veces el límite de detección del método.

Se debe establecer un monitoreo de la exactitud y estabilidad de calibración usando controles y estándares de verificación anteriormente ya definidos. Se debe usar normalmente un intervalo de confianza del 95% para recalibrar o reestandarizar el sistema si el valor está fuera de este intervalo⁽¹⁵⁾.

Para estimar si los puntos experimentales se ajustan a una línea recta empleamos el Coeficiente de Correlación Momento Producto (r) definido por:

$$r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} \quad \text{Ecuación 6.8}$$

Se recomienda no emplear curvas de calibración con una linealidad (r) inferior a 99.5% o coeficiente de linealidad $r^2 = 0.990$.⁽²⁰⁾

6.1.5 VALIDACIÓN DE RESULTADOS.

La validación de los resultados es el proceso con que se establece que la ejecución del método se encuentra bajo el estándar de calidad establecidos.

La aprobación de los resultados es un proceso continuo y es un control de calidad directo del resultado analítico que viene a ser el producto final de los laboratorios.

La verificación de los resultados no se limita a realizar un trabajo antes de empezar un análisis si no que también incluye la verificación de la calidad y medición mientras las muestras se están analizando.

Es importante recordar que validación de resultados es un proceso que debe planificarse antes del análisis y debe llevarse a cabo con el análisis. No se debe aprobar ningún resultado si se ejecuta el control al siguiente día o a la siguiente semana⁽²³⁾.

Los resultados pueden ser validados ejecutando simultáneamente: muestras de control, recuperación, duplicado de muestra y análisis de blancos

a) **Muestra de Control**

Una muestra de control en una estándar de suministro externo. Cuando sea posible se debe utilizar materiales estándares de referencia. Proporcionados por NIST, EPA, ASTM u otras entidades adecuadas.

En el caso de no contar con un material estándar de referencia, se puede utilizar materiales internos de referencia, preparándose estos de forma independiente de los estándares usados para la calibración

La muestra control debe permanecer estable durante un periodo de tiempo y debe ser analizada en cada serie de análisis⁽²⁴⁾.

b) **Recuperación**

Es la capacidad de un método para determinar todos los analitos de interés que están contenidos en una muestra o fijados en una matriz interferente.

Se emplea adiciones conocidas del analito para verificar la ausencia de efectos de matriz. Realizar la adición conocida entre 5 y 50 veces la concentración del LDM.

No debe emplearse adiciones conocidas del analito por encima de la amplitud lineal demostrada^(15 19)

La recuperación se calcula en porcentaje según la ecuación siguiente:

$$\% \text{ recuperaci3n de adici3n} = \frac{(C_{m+a} - C_m) * 100}{C_a} \quad \text{Ecuaci3n 6.9}$$

Donde:

C_{m+a} = Concentraci3n final de la muestra despu3s de la adici3n.

C_m = Concentraci3n de la muestra original.

C_a = Concentraci3n conocida de adici3n a3adido a la muestra.

Las pruebas de recuperación se desarrollan con una frecuencia del 5% de la cantidad de muestras analíticas o un número de muestras menores que 20 para pruebas inorgánicas o de 10 muestras para pruebas orgánicas.

Es necesario asegurarse que la concentración de la adición esté entre 1 y 10 veces la concentración de la muestra original, y como es imposible predecir la concentración inicial de la muestra la magnitud de adición, como una regla, es establecida a un nivel de 20% de la curva de calibración.

c) **Duplicado de la muestra**

El análisis del duplicado debe llevarse a cabo desde el inicio del procedimiento analítico, los duplicados proporcionan una medida de validación de los resultados pero se debe tener cuidado al usarlos sin son la única forma de la validación de los resultados.

La precisión del dato generado para la muestra se determina como la diferencia del porcentaje relativo %RPD de la siguiente ecuación⁽¹⁵⁾:

$$\%RPD = \frac{(x_1 - x_2)}{\bar{x}} * 100 \qquad \text{Ecuación 6.10}$$

Donde:

% RPD = Diferencia del porcentaje relativo.

x_1 = Concentración 1 de la muestra.

x_2 = Concentración 2 de la muestra.

x = Concentración promedio de la muestra

Tenemos duplicados de la muestra dentro de lote, entre lotes y duplicados de muestreo (blancos viajeros, blancos de campo y blancos de equipo). Por lo menos el 5% de muestras analizadas dentro de un lote son duplicadas. Las mediciones de duplicados dentro lotes mide la repetibilidad del procedimiento del laboratorio para un determinado lote(serie) de muestras analizadas al mismo tiempo. Los duplicados entre lotes miden la reproducibilidad del procedimiento del laboratorio entre varios lotes (series) de muestras analizadas en diferente periodo de tiempo.

Con los duplicados de muestreo se obtiene una medición de precisión de muestreo.

d) Blancos analíticos

Los blancos analíticos detectan el grado de contaminación de la muestra de cuatro fuentes diferentes:

- Medio ambiente
- Reactivos usados en el análisis
- Aparatos empleados en el análisis
- El tipo de análisis desarrollado

Idealmente, para el método de blancos analíticos se requiere que la concentración del analito sea menor que el límite de detección del método (LDM).

En la Tabla 6.2 se describe las acciones correctivas requeridas para situaciones diferentes^(15,19).

TABLA 6.2. Acciones correctivas para la contaminación de blancos

SITUACIÓN	ACCIÓN CORRECTIVA
<i>Fuente de contaminación conocida pero cuantificable</i>	<i>Minimizar la fuente, restando los blancos de la muestra.</i>
<i>Fuente de contaminación conocida pero aleatoria</i>	<i>Minimizar la fuente, sin restar los blancos de la muestra.</i>
<i>Fuente de contaminación desconocida pero cuantificable</i>	<i>Investigar la fuente, restando los blancos de las muestras.</i>
<i>Fuente de contaminación desconocida pero aleatoria.</i>	<i>Investigar la fuente, sin restar los blancos de las muestras.</i>

6.2. CARTAS DE CONTROL

6.2.1. DEFINICIÓN DE CARTA DE CONTROL

Una carta de control se puede definir como el gráfico que representa los valores de las mediciones realizadas a una muestra de control, introducida en análisis de rutina, con una frecuencia preestablecida, para evidenciar deficiencias en el proceso analítico e imponer las acciones correctivas pertinentes, tan pronto como sea posible. En esta definición hay dos palabras claves para el trabajo con cartas de control: la necesidad de disponer de muestras de control y el hecho de que haya que definir una frecuencia característica de introducción de la muestra de control para que el proceso sea eficaz.

Las cartas de control de calidad fueron desarrolladas por Shewhart en 1931, fueron usadas para el control de calidad de productos industriales. Dada su gran utilidad, se fueron incorporando después en numerosos ámbitos productivos, así como en los laboratorios de análisis^(10,15,23,25).

6.2.2. PRINCIPIO DE UNA CARTA DE CONTROL

El principio fundamental de una carta de control es la representación visual de la "calidad" usando como bases:

La cantidad deseada (valor esperado de un resultado de análisis para muestras control) y

Los límites (ver Figura N°6.1)

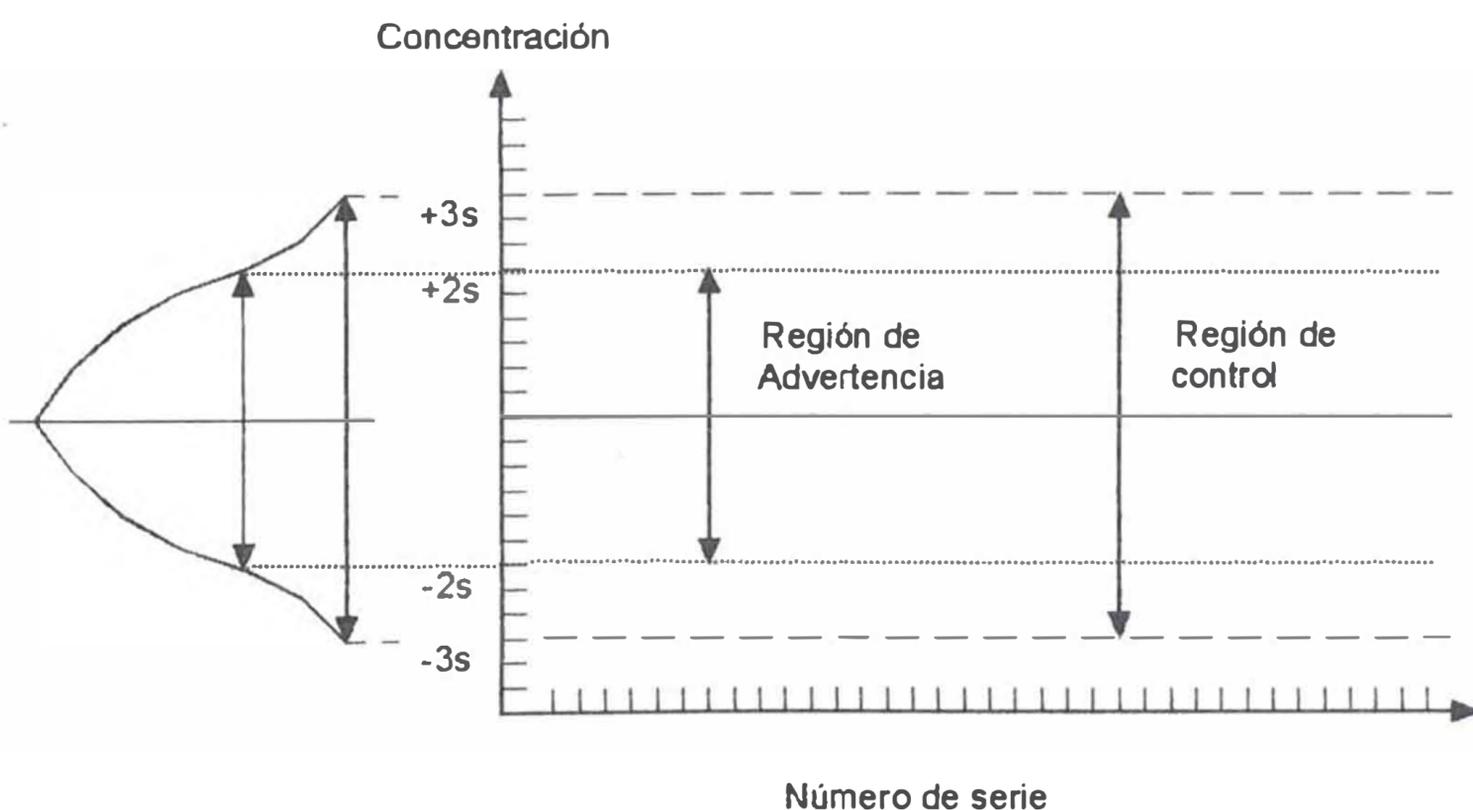


FIGURA N°6.1 Esquema del principio de una carta de control

Para distinguir entre los límites arriba mencionados, los clasificaremos en

- Límites de advertencia, los que si se han excedido, aún a veces proporcionan resultados tolerables (95% del intervalo de confianza)
- Límite de control, los cuales si se han excedido, requieren inmediata acción (99% del intervalo de confianza)

En la Figura N°6.1. se ha incorporado también la curva de distribución en el eje de las ordenadas, mostrando la equivalencia entre dicha curva y el propio gráfico. Suele ser habitual que la región de advertencia corresponda a un 95 % aproximado de nivel de confianza, mientras que la región de control corresponde a un nivel de confianza del 99 % aproximadamente. Las cartas de control tienen un carácter de regulación cíclica del proceso que se requiere controlar (en este caso el proceso analítico). El esquema cíclico se muestra en la Figura N° 6.2.

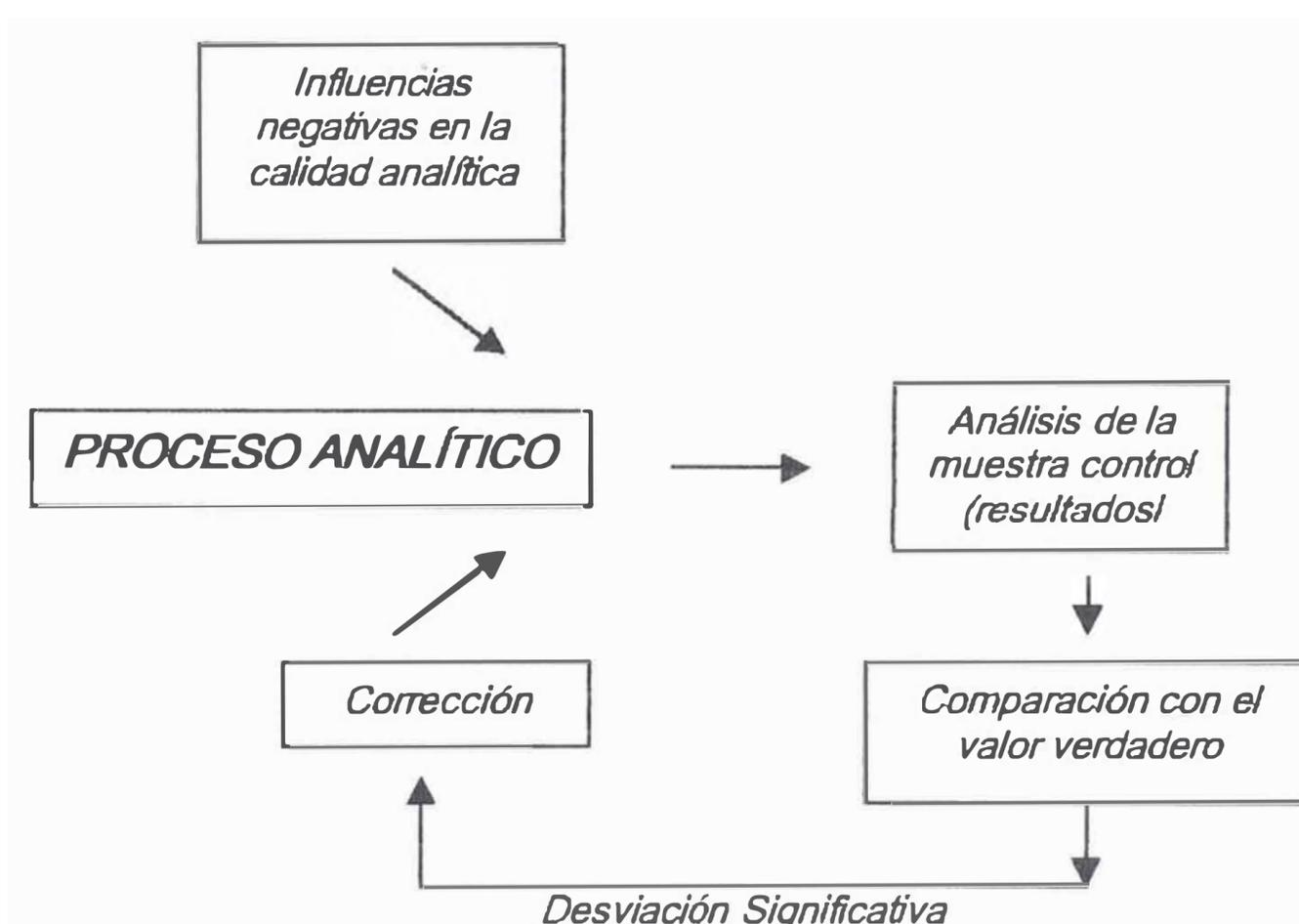


FIGURA N°6.2. Esquema de carácter cíclico que tienen las cartas control para la corrección de deficiencias en proceso analítico

6.2.3. PERIODO PRELIMINAR (concepto para la preparación del control de calidad rutinario)

Se denomina así al período previo en el que se construyen las cartas de control, que después se emplearán en el trabajo de rutina

Los objetivos del periodo preliminar son:

- La recolección de datos estadísticos característicos para la preparación de una carta control
- La prueba de confiabilidad preliminar del proceso analítico

Para el periodo preliminar se aconseja una secuencia de 20 días consecutivos de trabajo o series de análisis para confeccionar con seguridad el gráfico correspondiente.

Las muestras de control se introducen, para la construcción de cartas de control correspondiente, generalmente por duplicado, pudiendo ser estas muestras:

- a) muestras blanco
- b) soluciones estándar, una de concentración alta y otra baja, dentro del rango establecido
- c) muestra natural de matriz y concentración similar a las muestras.
- d) muestra natural fortificadas (muestra LFM, Laboratory Fortified Matrix sample)

Para registrar cambios dentro de una serie de análisis en un día determinado, los dos análisis de un determinado duplicado deben ser llevados a cabo con el mayor tiempo posible de diferencia entre estos.

Estos análisis de manipuleo especial de la muestra control durante el periodo preliminar deberán ser llevados a cabo con los mismos cuidados que una muestra normal debería recibir. Manipuleo especial de la muestra control durante el periodo preliminar de análisis de rutina falsearía el mensaje de la carta control.

El periodo preliminar de 20 días de trabajo o series de análisis resulta una estadística suficientemente segura para los análisis de varianza y para el establecimiento de los límites de control y advertencia. Whitehead justifica el numero de $n = 20$ análisis para el periodo preliminar.

Para el caso de $n > 20$ análisis repetidos, la desviación estándar de la media disminuye lentamente (ver Figura N°6.3). Una disminución del periodo preliminar a 10 a 6 series (conceptos mínimo absoluto de acuerdo a recomendaciones de Whitehead (WHO)) es sólo aceptable si el límite de control puede ser verificado por otras medias externas.

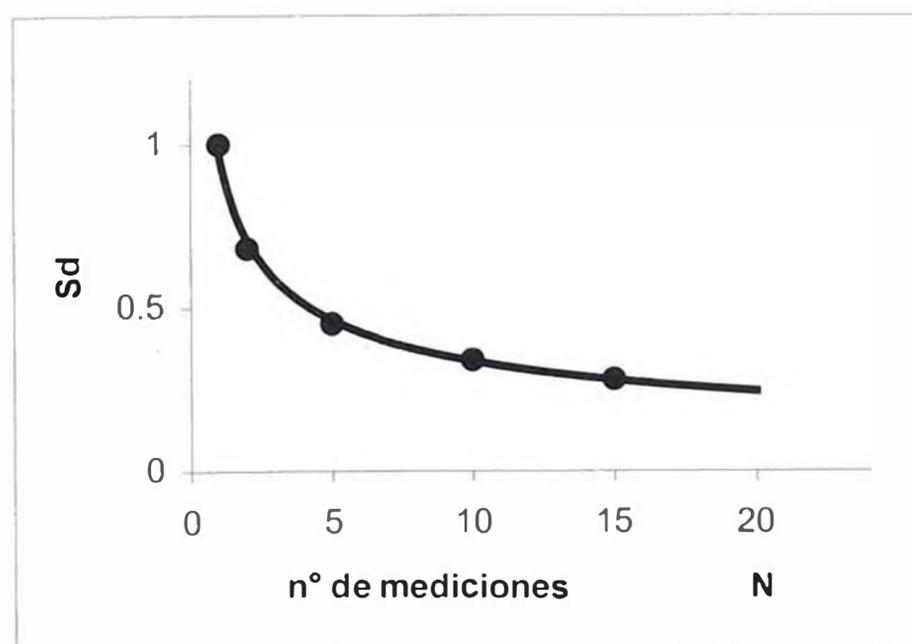


FIGURA N°6.3. Influencia del número de mediciones repetidas (N) en el tamaño de la desviación estándar (Sd) de la media.

6.2.4. TIPOS DE CARTA CONTROL Y SUS APLICACIONES

Los siguientes tipos de carta control son usados en el aseguramiento de calidad analítica

- Cartas Shewhart (o convencionales) como *x*-carta y cartas de tasas de recuperación
- *R*-cartas y cartas de desviación estándar
- Cartas de Diferencia
- Cartas Cusum

6.2.4.1. CARTAS SHEWHART

Son las más habituales y conocidas en los laboratorios químicos, además permiten ser utilizadas con distintas finalidades. La aplicación de las cartas de control en la confiabilidad de la calidad está basada en la suposición de los resultados obtenidos están distribuidos normalmente.

En la Figura N°6.1. se muestra la construcción de la carta control, usando los límites de control y advertencia en el rango de $+3s$ y $+2s$ respectivamente, donde s representa la desviación estándar.

Límite de control superior	$LCS = x + 3s$
Límite de control inferior	$LCI = x - 3s$
Límite de advertencia superior	$LAS = x + 2s$
Límite de advertencia inferior	$LAI = x - 2s$

La carta Shewhart es aplicada en la confiabilidad de la calidad analítica en tres formas diferentes:

- A. Carta de control *x*
- B. Carta de control de blancos
- C. Carta de tasa de recuperación

A. Carta control *x* (o carta de exactitud)

La carta control *x* sirven principalmente para validar la precisión de un proceso analítico, ya que los cambios sistemáticos como las tendencias pueden ser detectados, la exactitud puede ser monitoreada en un rango limitado.

La elección de una muestra control depende de la confiabilidad de la calidad en cuestión y no tiene influencia en la construcción de la carta control.

En la Tabla 6.3. se describe las muestras control para una carta *x*

TABLA 6.3. Muestras de control

<i>Muestra</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
<i>Solución estándar pura</i>	<ul style="list-style-type: none"> - fácil de preparar en la concentración deseada. - apropiada para la validación de una calibración previa. 	<ul style="list-style-type: none"> - no es representativa para muestras de rutina, el efecto en la matriz no puede ser detectado - los errores sistemáticos aparecerán en la calibración, los cuales no pueden ser detectados.
<i>Muestra sintética</i>	<i>Puede ser preparada por el analista tanto como sea necesario</i>	<i>Preparación complicada para varias matrices complejas. La muestra debe ser estable en el tiempo</i>
<i>Muestra de referencia</i>	<i>Más económica que un material de referencia certificado.</i>	<i>Contenido de matriz y analito no puede ser representativo</i>
<i>Muestra de referencia certificada</i>	<i>Una muestra independiente con un valor conocido</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Relativamente costoso y cubre sólo una cierta matriz - El contenido del analito no es necesariamente representativo, puede ser usado para monitorear instrumentos de medición

En la Figura N°6.4. se muestra una carta de control \bar{x} . Se someten n alicuotas de la muestra de control al proceso analítico, obteniéndose el valor medio (\bar{x}) y la desviación estándar (s). El valor medido define la línea central del gráfico, que constituye la mejor estimación del valor central de la variable medida. Alrededor de esta línea se localizan los límites entre los que pueden oscilar (definidos en la sección 6.2.4.1)

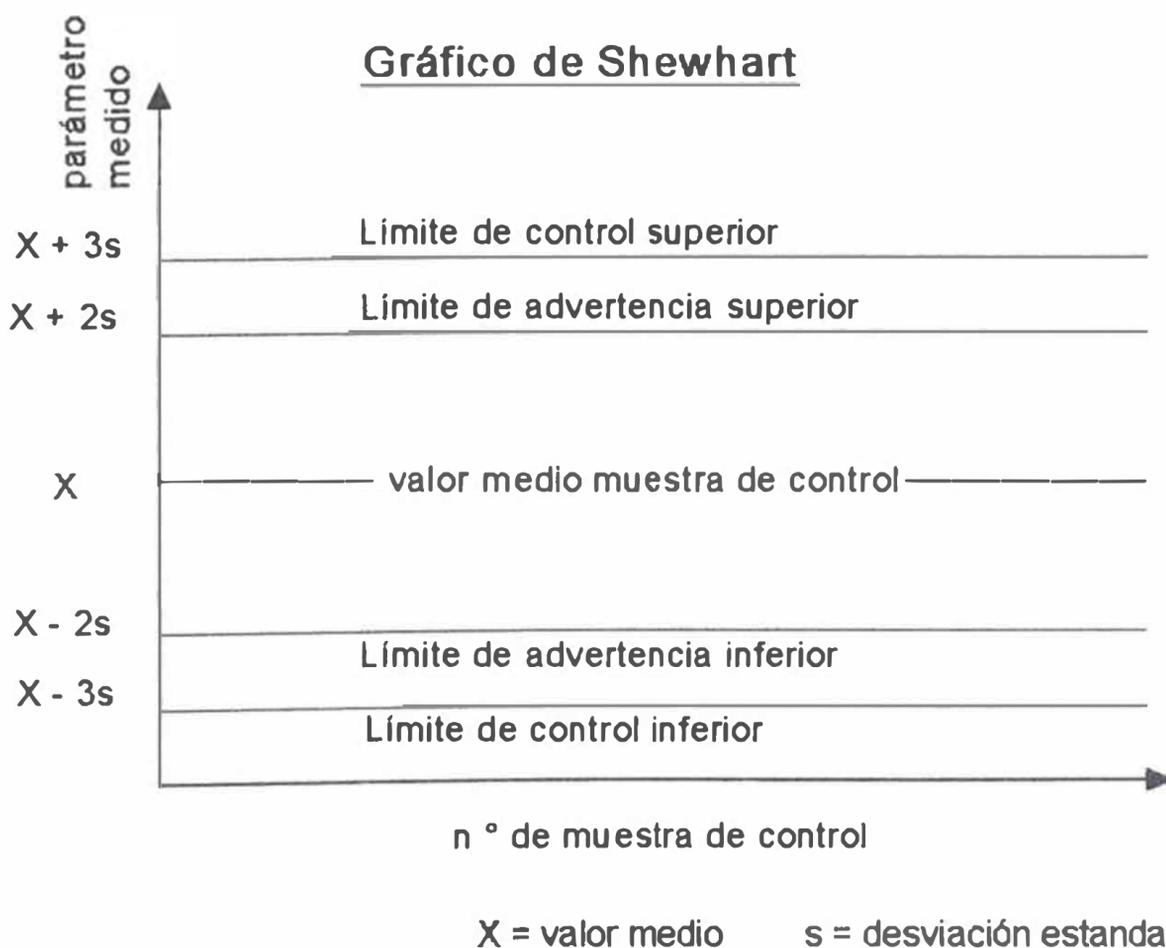


FIGURA N°6.4. Construcción de las líneas características de un gráfico de Shewart del valor central

B. Cartas de control de valores blancos

Las cartas de control de valores blancos es una aplicación especial de la carta x y permite llevar a cabo un control sobre los reactivos, disolventes y el sistema de medición usado. En este caso, se representa valores medidos de la señal y no de resultados o concentraciones.

Las determinaciones simultáneas del valor blanco deben ser requeridas para cada análisis, de no ser así se determina un mínimo de dos valores blancos por serie de análisis, donde uno es determinado al inicio y el otro al final de la serie. El promedio aritmético de n valores blancos individuales por serie de análisis puede ser usado para mantener la carta de control de valores blancos. Los límites son determinados según los mismos principios que las cartas de control x , usando los resultados de los análisis realizados en el período preliminar. En la Figura N°6.5. se muestra un ejemplo de construcción de una carta de control de blancos.

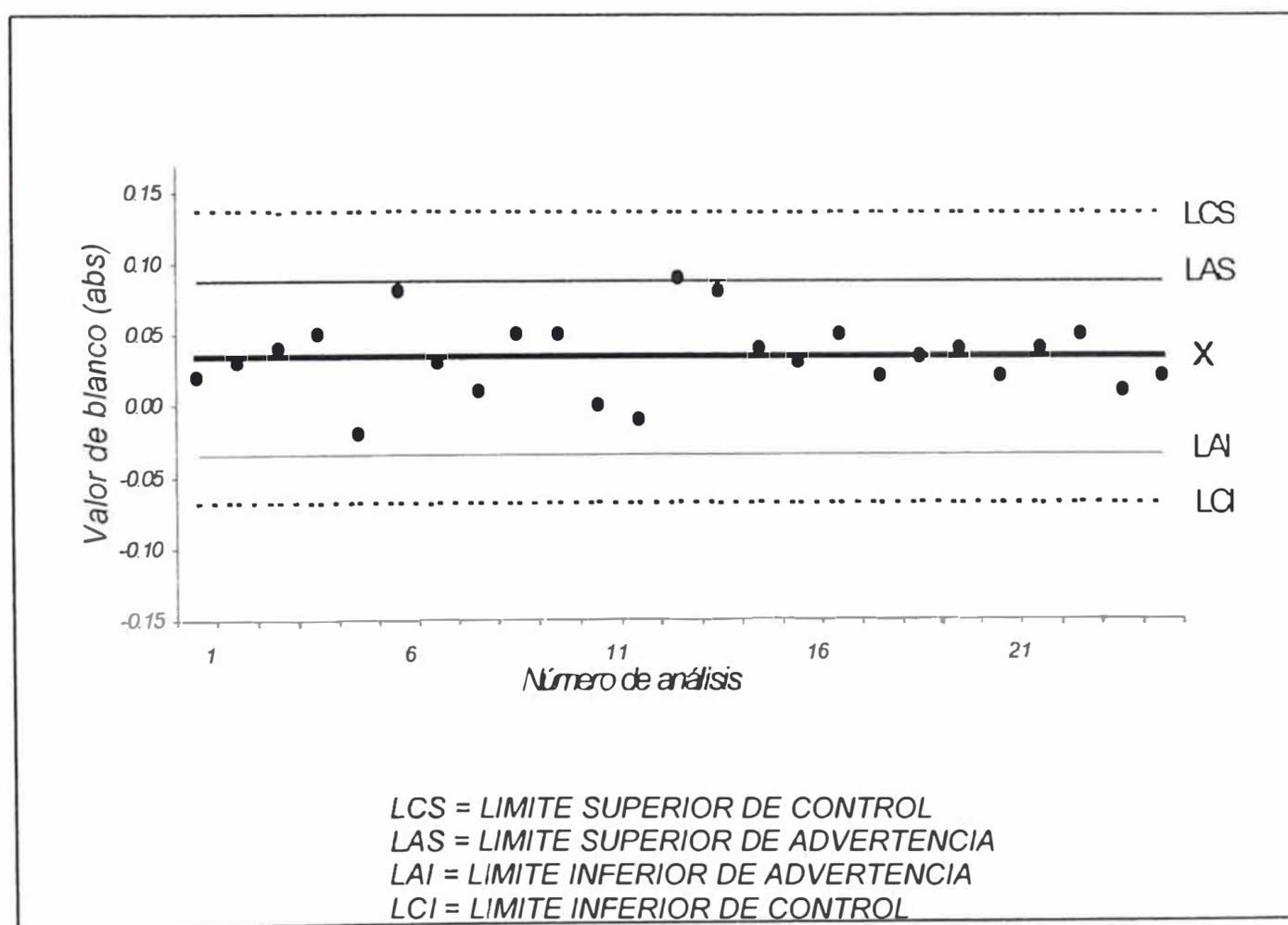


FIGURA N °6.5. Construcción de un gráfico de blancos

C. Carta control de porcentaje de recuperación

El proceso analítico puede ser probado debido a influencias de matriz determinando la tasa de recuperación (RR), de una muestra adicionado el analito de interés. Sin embargo el RR sólo detecta errores sistemáticos proporcionales a la matriz dependiente. Los errores sistemáticos constantes no son detectados. El porcentaje de recuperación es calculado de la Ecuación 6.9 (ver sección 6.1.5.b)

C.1. Establecimiento de la concentración y la cantidad adicionada

La cantidad adicionada o concentración adicionada influye decisivamente en el valor informacional del análisis de recuperación, una cantidad insuficientemente adicionada conducirá a una insignificante diferencia entre la muestra adicionada y la muestra sin adición; según la literatura se recomienda una concentración adicionada la cual represente por lo menos el valor del análisis de la muestra, sin exceder el límite de rango superior del proceso analítico (todo el trabajo debe estar dentro del rango lineal).

La sustancia adicionada debe:

- tener una solubilidad parecida*
- reaccionar en forma similar*
- estar en el mismo estado de oxidación*
- añadirse preferiblemente como sólido o como disolución muy concentrada.*

Se debe evitar:

- un cambio significativo en la matriz de la muestra.*
- un error de adición, como errores de dilución.*

Si cambia el volumen de la muestra después de la adición por más de 0.5 %, este volumen debe ser considerado, cuando se calcula el porcentaje de recuperación(RR)

Es absolutamente necesario mantener una carta de control de porcentaje de recuperación para cada tipo de matriz, (agua de bebida, agua residual, agua superficial, sangre, orina, muestras de tejido, extractos de plantas, etc)

C.2. Construcción de una carta de control de porcentaje de recuperación (RR)

Las cartas de control RR son equivalentes en sistema y criterio de decisión a las cartas x.

El promedio del porcentaje de recuperación RR y su desviación estándar S_{RR} , son calculados después del periodo preliminar

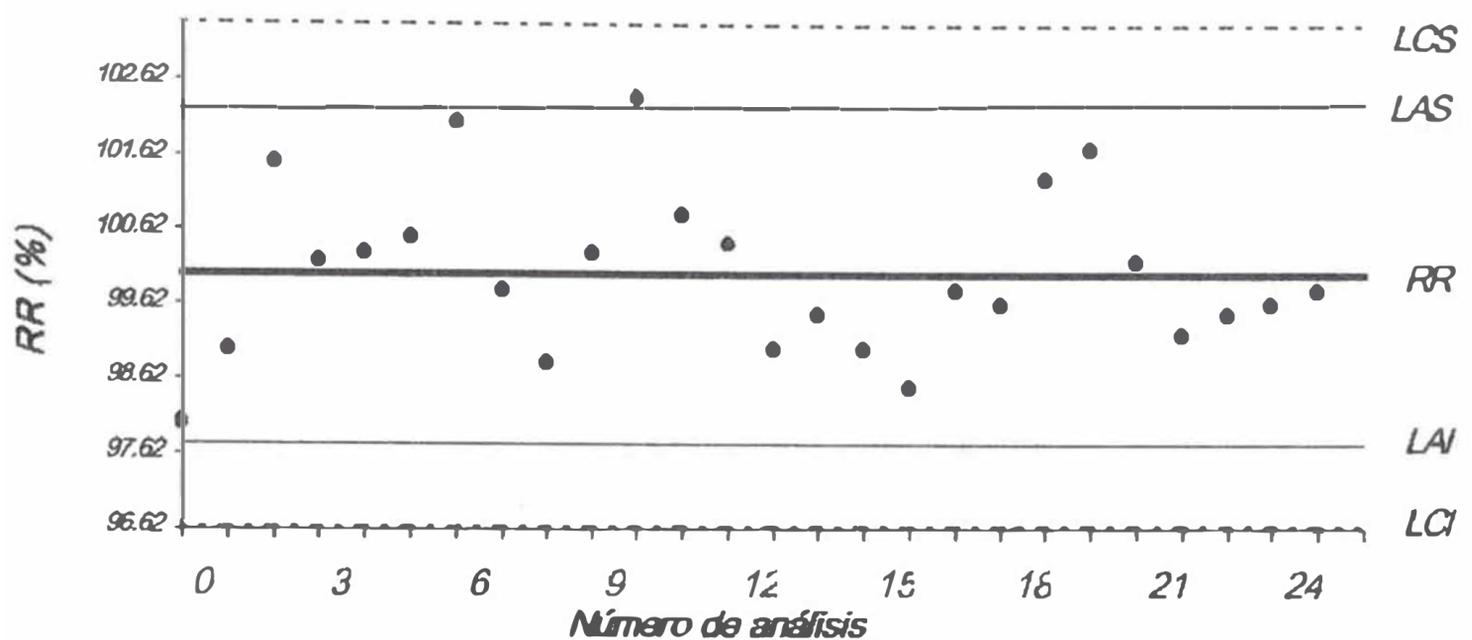
Los límites de control y advertencia están en el rango de $+ 3 s$ y $+ 2 s$, respectivamente (ver Figura N°6.6.).

$$LCS = RR + 3 S_{RR}$$

$$LCI = RR - 3 S_{RR}$$

$$LAS = RR + 2 S_{RR}$$

$$LAI = RR - 2 S_{RR}$$



LCS = Límite superior de control LAS = Límite superior de advertencia
LAI = Límite inferior de advertencia LCI = Límite inferior de control
RR = valor promedio de la tasa de recuperación

FIGURA N° 6.6. Carta Control de porcentaje de recuperación, normalizado a 100 % de recuperación.

6.2.4.2. CARTAS R (cartas de control de rango o cartas de precisión)

Las cartas de control R sirven para todos los propósitos de control de precisión

Construcción de una carta de control R

Para construir la línea centro y los límites de control y advertencia como en la Figura 6.7., se utilizo las siguientes ecuaciones:

$$R = D_2 s \quad \text{Ecuación 6.11}$$

Límites de control (LC)

$$LC = R \pm 3s(R) = D_4 R \quad \text{Ecuación 6.12}$$

y Límites de advertencia

$$LA = R \pm 2s(R) = R \pm 2/3 (D_4 R - R) \quad \text{Ecuación 6.13}$$

Donde:

R promedio del rango

D₂ factor para convertir *s* al rango (*D₂* = 1.128 para duplicados ver Tabla N 6.4)

S(R) = desviación estándar del rango

D₄ = factor para convertir el rango promedio a *3s(R)* (*D₄* = 3.267 para duplicados ver Tabla N 6.4)

TABLA 6.4 Factores para calcular las líneas sobre las cartas de control de rango⁽¹⁰⁾

# de observaciones N	Factor para la línea centro D₂	Factor para los límites de control D₄
2	1.128	3.267
3	1.693	2.575
4	2.059	2.282
5	2.326	2.115
6	2.534	2.004

En este caso, las líneas control y advertencia inferiores no tienen ningún interés práctico, ya que indicaría una precisión mejor que la establecida como objetivo de calidad.

Las líneas que establecen situaciones fuera de control son las líneas de control y advertencia superior, que son las que se muestran en el gráfico de la Figura N°6.7. La línea de advertencia superior corresponde a un nivel de confianza de 95 %, mientras que la línea de control superior se establece para un 99% de nivel de confianza.

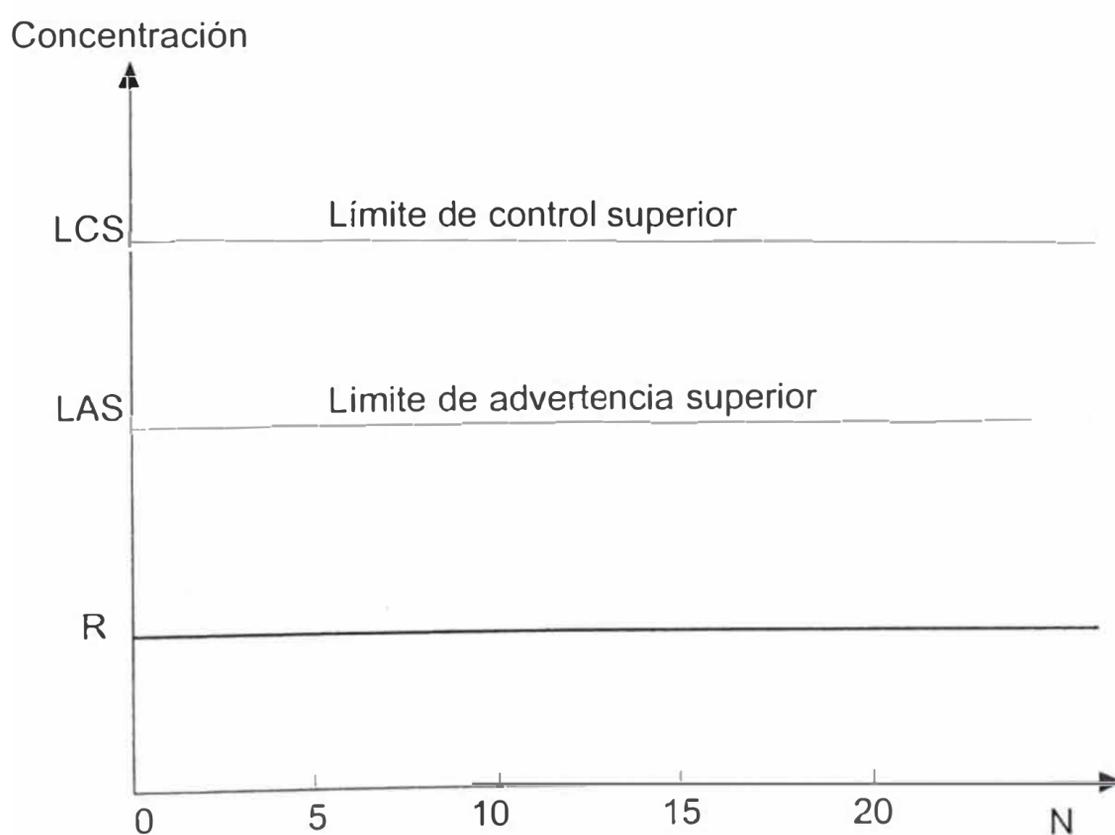


FIGURA N° 6.7. Líneas características del gráfico de recorrido.

6.2.4.3. CARTAS DE CONTROL DE DIFERENCIA

A diferencia de los gráficos de recorrido, éstos incluyen el signo de la diferencia. Su objetivo es la detección de errores sistemáticos que puedan aparecer durante una serie de análisis. La muestra de control por cada serie de análisis se introduce por duplicado al principio y al final de la serie. Entre estas dos determinaciones debe tener lugar el mayor número posible de análisis de muestras reales. Lo que se representa en el gráfico es la diferencia de los valores de la muestra control con su signo correspondiente, siendo el valor central igual a cero (ver Figura N° 6.8)

El cálculo de los límites se determina calculando la desviación estándar de las diferencias, usando la Ecuación 6.2 (de la sección 6.1.1.f)

Entonces se tiene:

$$\text{Media} = 0$$

$$\text{Límites de Advertencia} = + 2Sd$$

$$\text{Límites de control} = -+ 3Sd$$

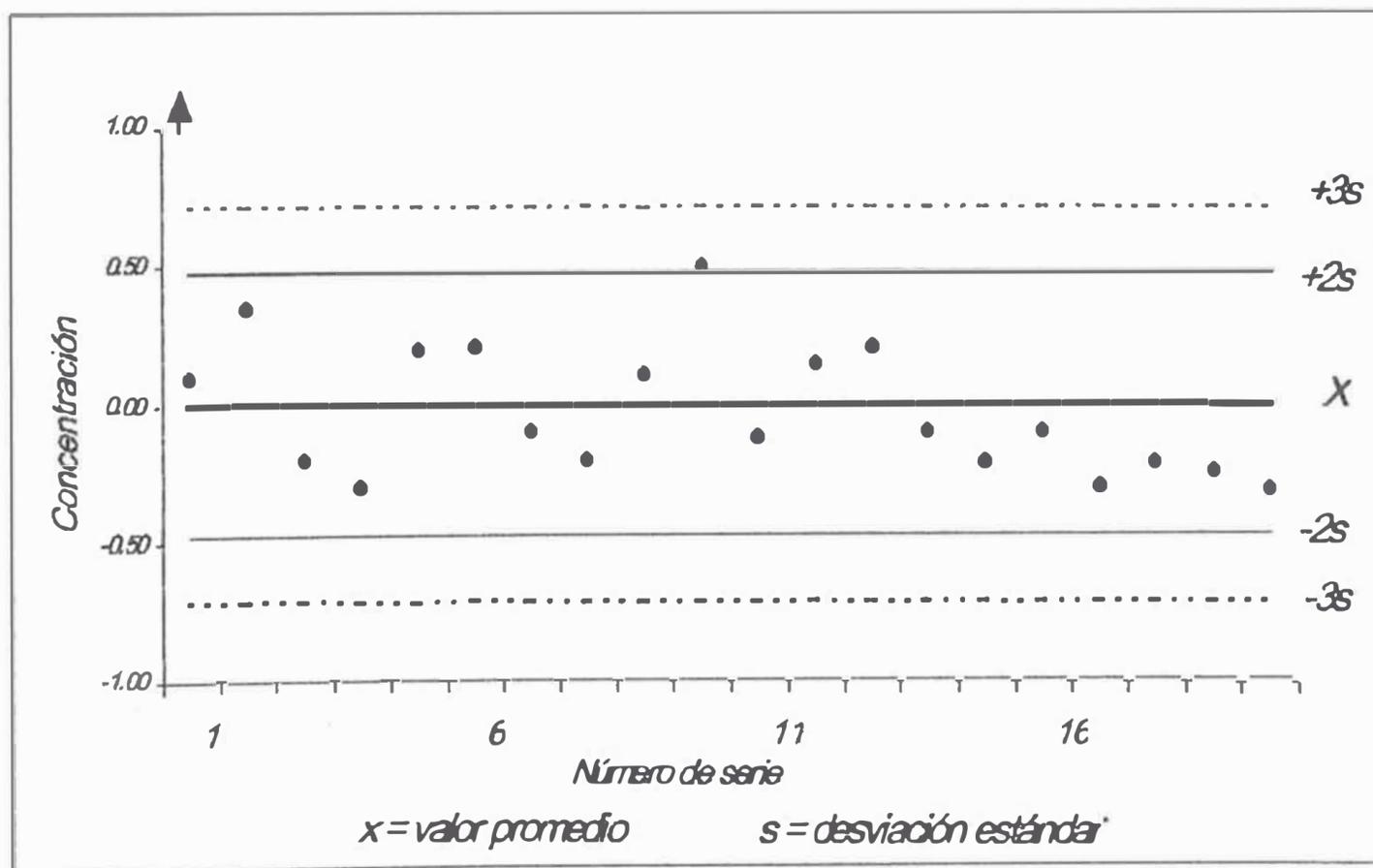


FIGURA N°6.8. Ejemplo de un gráfico de diferencia empleado para el control de calidad interno

6.2.4.4. CARTAS DE CONTROL CUSUM

En estos gráficos se representa la suma acumulativa C_i de diferencias entre los valores observados X_i y el valor medio determinado previamente (0).

$$C_1 = X_1 - 0$$

$$C_2 = C_1 + (X_2 - 0)$$

$$C_3 = C_2 + (X_3 - 0)$$

$$C_n = C_{n-1} + (X_n - 0)$$

Los valores de C_i deben oscilar alrededor del cero, tal como se muestra en la Figura N°6.9. Ello indica la presencia de errores aleatorios únicamente. Si existe algún error sistemático, se suma a cada valor de C_i , por lo que éste se aleja sucesivamente del valor central. La posición del cambio de pendiente indica el momento del cambio en la calidad de los resultados generados.

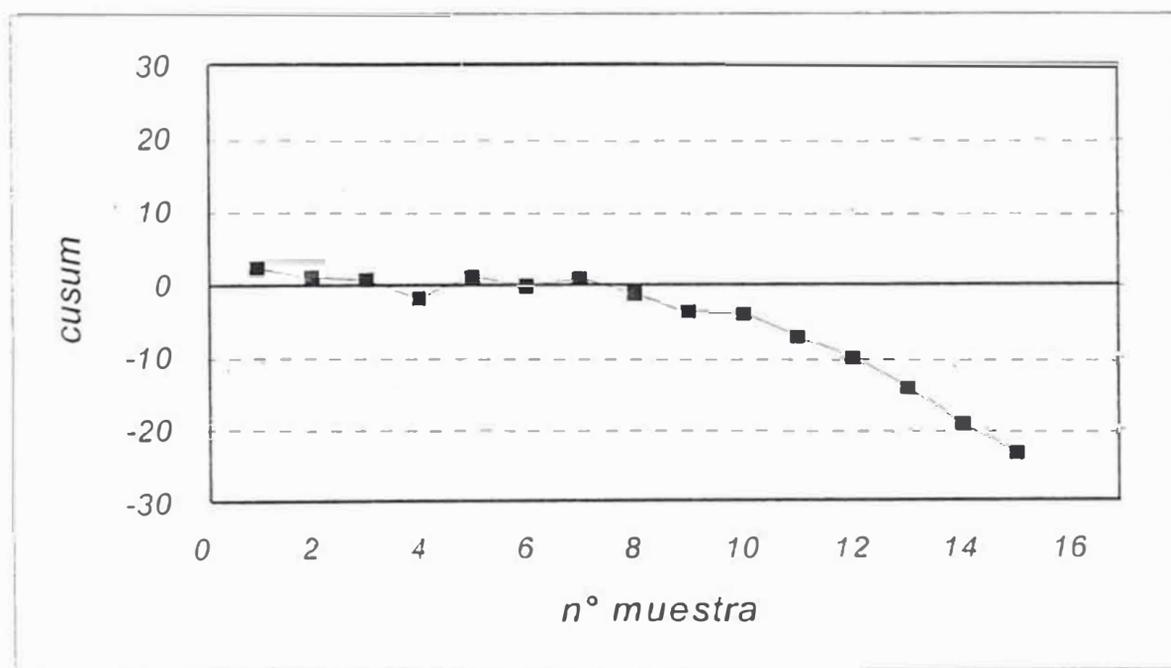


FIGURA N°6.9. Gráfico de control de sumas acumulativas, mostrando una tendencia significativa

Los Límites se establecen mediante una plantilla en forma de V o parábola, de tal manera que la bisectriz del ángulo sea paralela al eje horizontal del gráfico, ver Figura N°6.10. Las unidades en este eje se separan una distancia σ/\sqrt{n} . Esta distancia d , sirve para situar el vértice de la plantilla, el cual se sitúa a una distancia $2d$ del punto más reciente del gráfico cusum, es a partir de este último punto donde se considera significativa la tendencia detectada (proceso fuera de control estadístico). Normalmente se emplea plantilla con un ángulo de $\theta = 30^\circ$. El gráfico de cusum permite detectar con mayor sensibilidad las tendencias fuera de control, por lo que se deben usar en lugar de las cartas de control de Shewhart del valor central, cuando se quiere un control más estricto del proceso analítico.

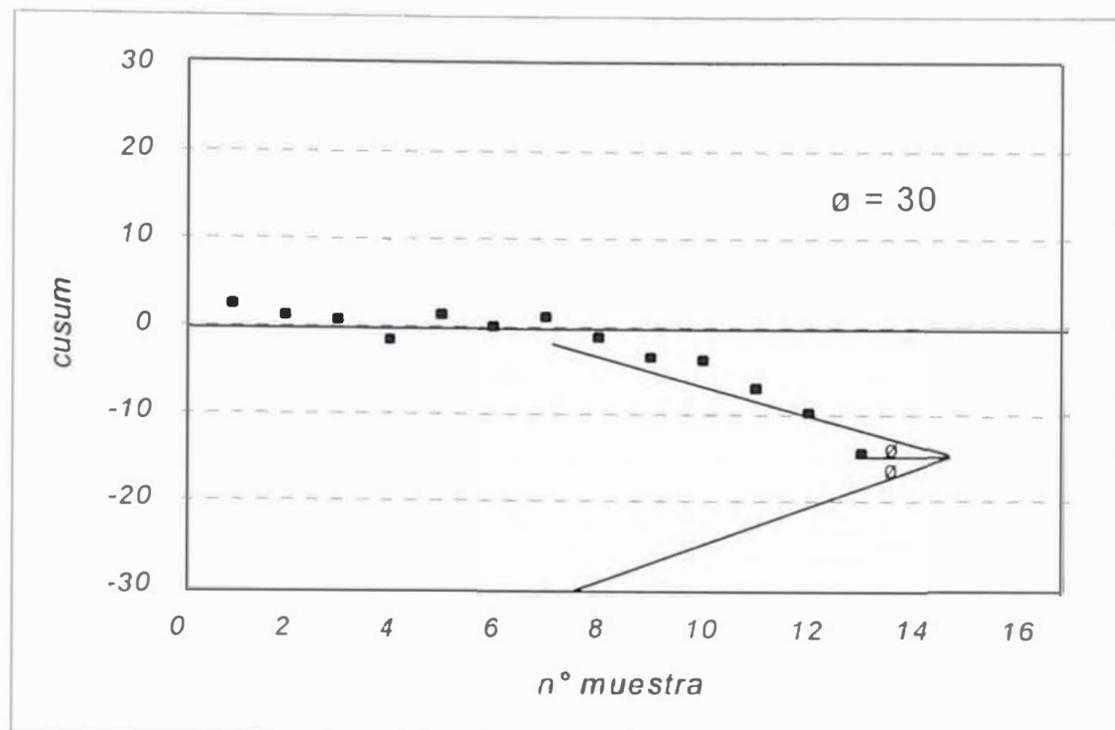


FIGURA N°6.10. Gráfico de cusum mostrando la máscara empleada para detectar situaciones fuera de control

6.2.5. EVALUACIÓN DE LAS CARTAS DE CONTROL

La evaluación de las cartas de control están sujetas a ciertas reglas, basadas en parámetros estadísticos. Se inspecciona la gráfica de manera visual proporcionando inmediatamente información sobre las situaciones “fuera de control” que se definen a continuación (ver Figura N°6.11).

6.2.5.1 Excedencia de los límites de control ($\pm 3Sd$)

Si un resultado excede el límite de control establecido, en este caso se debe repetir el análisis inmediatamente, si este resultado excede el límite de control, discontinuar el análisis y corregir el problema.

6.2.5.2 Excedencia de los límites de advertencia ($\pm 2Sd$)

Si dos de tres resultados consecutivos exceden el límite de advertencia, repetir el análisis. Si el próximo resultado está debajo del límite de advertencia, continuar el análisis, en caso contrario evaluar y corregir el problema.

6.2.5.3 Excedencia de una desviación estándar ($\pm 1Sd$)

Si cuatro de cinco puntos consecutivos exceden $+ 1Sd$ o están en orden creciente o decreciente, analice otra muestra. Si el próximo punto es menor de $1Sd$ o cambia de orden, continuar el análisis, en caso contrario evaluar y corregir el problema.

6.2.5.4 Tendencia alrededor de la línea central.

Si siete resultados consecutivos están del mismo lado de la línea central, discontinuar el análisis y corregir el problema.

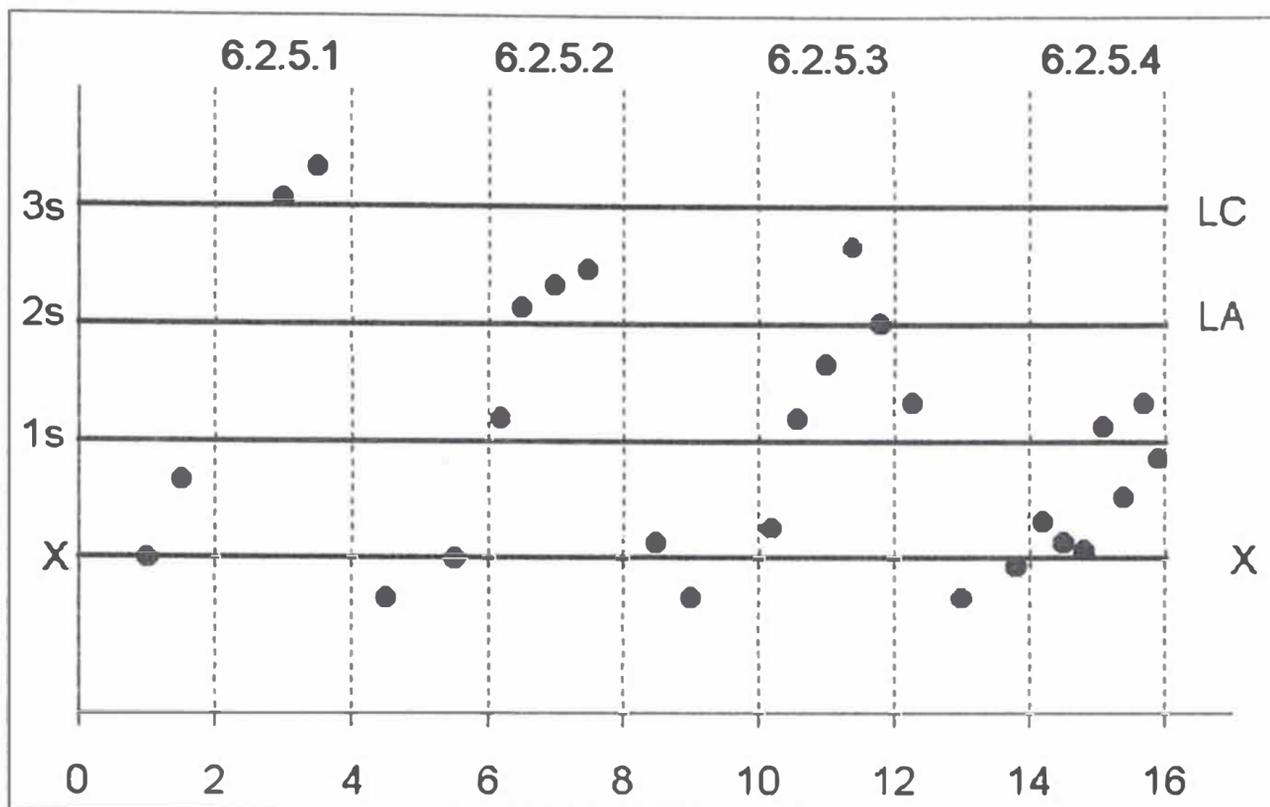


FIGURA N°6.11. Carta de Control con datos fuera de control

Existen situaciones que no son consideradas fuera de control, pero la secuencia de puntos sugieren influencias que no son aleatorias y, por tanto no deseable, que conducirán a situaciones "fuera de control". En la Figura N°6.12. se ilustra algunos de estos casos.

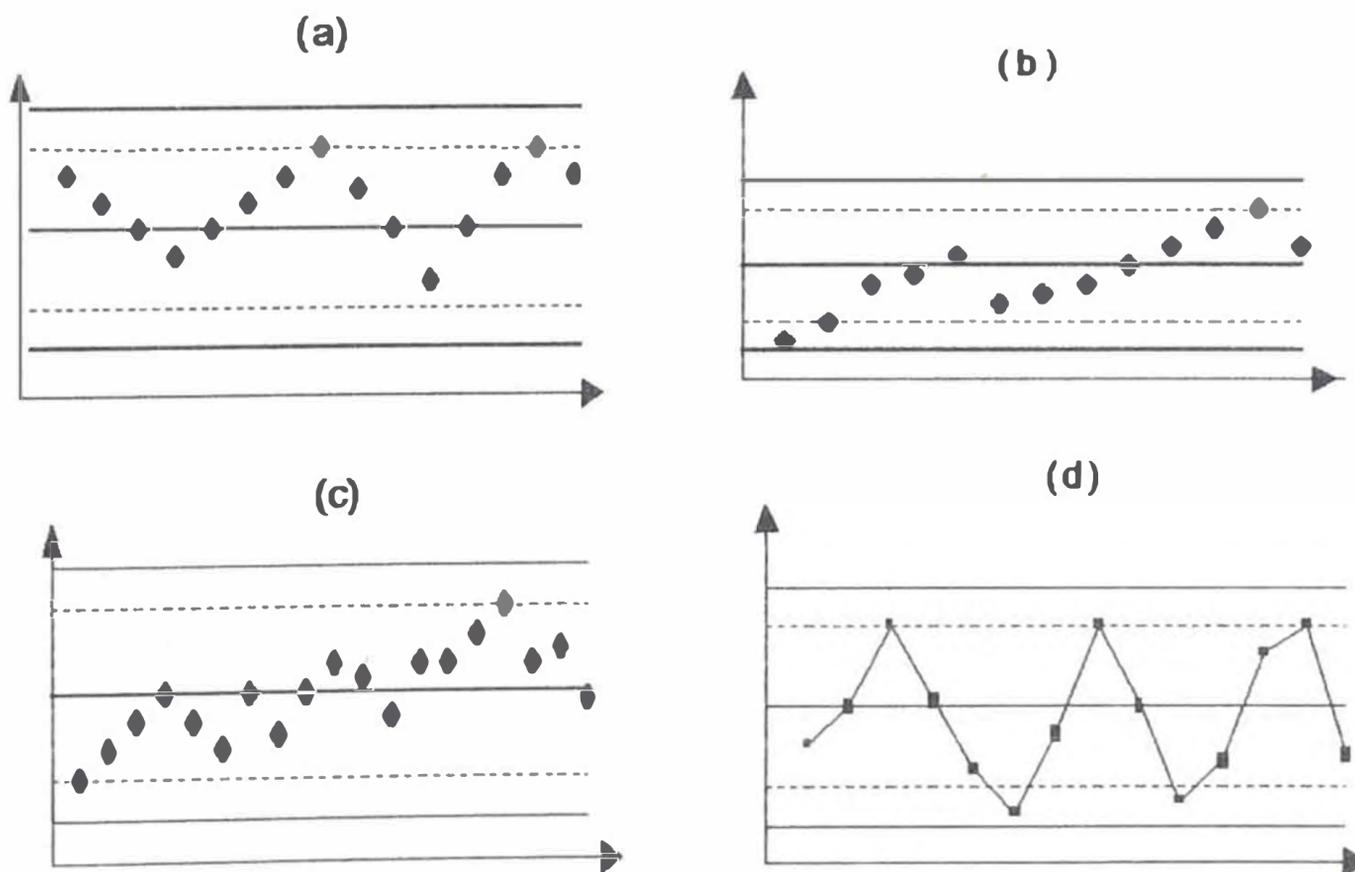


FIGURA N°6.12. Gráficos con situaciones dentro de control estadístico, pero con secuencias de puntos que ponen de manifiesto situaciones de medida no deseable.

6.2.6. RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS CARTAS DE CONTROL

En la Tabla 6.5 se muestra en forma resumida y comparativa las diferentes características de las cartas de control.

TABLA 6.5. Resumen de las características de las cartas de control

Tipo de Carta	Cálculos	Qué detecta	Análisis necesarios
Carta \bar{x}	Valor medio y desviación estándar; límites de aviso y actuación en el período preliminar	Errores de mayor magnitud (desviación de media), errores sistemáticos (tendencias, cambios en la media), errores aleatorios (dispersión de los valores individuales), generalmente para el control de la precisión	Análisis de muestra control a intervalos regulares de tiempo.
Carta de control de blancos	Media y desviación estándar, límites de advertencia y de control en el período preliminar	Control de los valores de blancos, errores en medidas instrumentales y desviaciones debidas a los reactivos	Al menos dos blancos en los intervalos establecidos.
Carta de control de Recuperación	Media \bar{R} , desviación estándar, límites de advertencia y control en el período preliminar, cálculo de \bar{R} a partir de los resultados de los análisis de control	Errores sistemáticos proporcionales	Al menos un análisis de cada muestra de control (fortificada y no fortificada) o muestra real.
Carta control R (recorrido)	Rango medio, desviación estándar y límites de control en el período preliminar; rango a partir de los análisis de control	Incertidumbre	Al menos dos determinaciones para las muestras reales en intervalos establecidos
Cartas de control de diferencia	Diferencia media, desviación estándar y límites de control en el período preliminar; diferencias obtenidas en los análisis de las muestra control	Desviaciones en los instrumentos de medida	Al menos dos determinaciones por cada muestra de control en intervalos establecidos al principio y al final de cada serie.
Cartas de control cusum	Valor de referencia y desviación estándar en el período preliminar; distancia del vértice y ángulo de la máscara; cálculo de las sumas acumulativas	Falta de exactitud; derivas	Muestra de control analizado en intervalos establecidos

VII. ESTUDIO EXPERIMENTAL

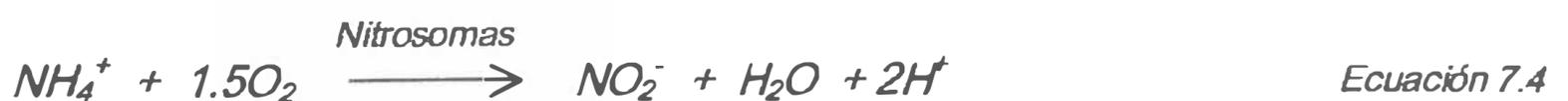
7.1. ANTECEDENTES

Como se menciona en el capítulo IV de contaminación de aguas, la mayoría de las poblaciones del Perú descargan sus aguas negras a los ríos contaminándola, representando esta una fuente importante de contaminación por compuestos nitrogenados (nitratos, nitritos, etc.). Los efluentes de la minería es otra fuente de contaminación importante de compuestos nitrogenados en las aguas de los ríos, sobre todo en las industrias mineras auríferas donde usan el proceso de cianuración para la liberación del metal, y posterior destrucción de cianuro con peróxido o por oxidación aeróbica según las siguientes ecuaciones ⁽²⁸⁾ :

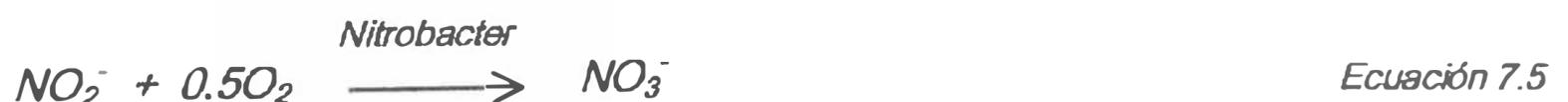


Posteriormente en un medio aeróbico el ion amonio es oxidado a nitrito y finalmente a nitrato según las ecuaciones siguientes:

Fase del nitrito:



Fase del nitrato:



Existen varios Estudios y Proyectos de contaminación de agua superficial realizados en nuestro país en los últimos veinte años ^(29,30,31), en los cuales están considerados los iones nitratos y nitritos como parámetros de calidad del agua.

Los Estudios de mayor información de contaminación de agua superficial son los realizados por INRENA a las Vertientes del Pacífico y Atlántico ⁽²⁹⁾.

7.2. OBJETIVOS

- *Desarrollo y validación de la metodología analítica para la determinación conjunta de nitratos y nitritos en aguas superficiales.*
- *Evaluación de la de Contaminación por nitratos y nitritos del agua superficial del río Santa.*
- *Evaluación y verificación de los datos obtenidos para las muestras mediante el uso de cartas de control elaboradas en un periodo preliminar.*

7.3. METODOLOGIA DE ESTUDIO

La metodología de estudio abarca la elección del método analítico a emplearse y su validación, para la aplicación del método, la zona de estudio, la recolección de la muestra (para la toma de muestra y preservación ver Anexo N° 5) y el lugar de ejecución de los análisis.

ELECCION DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE NITRITOS

Para la determinación de nitritos se elige el método colorimétrico descrito en el capítulo V. sección 5.1.1.(página 23). Se descarta el uso del otro método debido a que se requiere de un cromatógrafo de iones.

ELECCION DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE NITRATOS

Para la determinación de nitratos se elige el método colorimétrico de reducción con Cadmio descrito de igual manera en el capítulo V. sección 5.2.2.1. (página 26) que determina la suma de los iones nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) reducido.

Entre las ventajas mas importantes se tiene:

- *Aplicación a todo tipo de agua (potable, superficial, salina y residual)*
- *Determinación de concentraciones por debajo de 0.1 mg N- NO_3^- /L (LDM = 0.01), que otros métodos no pueden determinar excepto el método de cromatografía iónica que puede determinar niveles de hasta de 0.0001 mg N- NO_3^- /L.*
- *Determinación de nitratos más nitritos.*
- *Prolongación del tiempo de almacenamiento hasta 28 días, por preservación con 1ml de ácido sulfúrico concentrado por litro de muestra.*

Una de las desventajas, una de las desventajas importantes del método es el uso de Cadmio que es un agente carcinógeno, pero sus condiciones de uso no son extremas como en otros métodos en los cuales se emplean agentes también carcinógenos y en condiciones drásticas como el método de sulfato de brucina de la EPA (método 352.1), que varios laboratorios del Perú y América Latina actualmente lo usan.

ELECCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

El área de estudio es el agua superficial del río Santa, el cual tiene agua todo el año por provenir sus fuentes de los glaciares y de las lagunas de la Cordillera Blanca.

Desde el punto de vista hidrológico, la cuenca del Santa es la más importante en la Costa del Perú, por tener el río un caudal de agua importante durante todo el año. En la época de precipitaciones éste aumenta hasta 20 veces el caudal que lleva en la época de sequía.

El río Santa se encuentra ubicado en la parte Nor-central del Perú, y abarca casi íntegramente el departamento de Ancash. Conformar uno de los principales valles longitudinales del Perú, con un área de 12200 Km².

El río Santa hace un recorrido de unos 294 Km. Desde su nacimiento en la Laguna Conococha, situada a 4080 msnm. de altura, hasta su desembocadura en el mar a 0.0 msnm. a 12 Km. . de la ciudad de Chimbote.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestra fueron tomadas del margen derecho del río Santa, contracorriente de 15 a 20 cm de la superficie.

El estudio abarca 10 estaciones de muestreo establecidas en dos fechas de muestreo (Octubre 2000 y Marzo 2001)

La técnica de recolección y preservación de la muestra se explica en el Anexo N°5.

LUGAR DE EJECUCION DE LOS ANALISIS

Los análisis realizados para el presente trabajo se ejecutan en el Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Del Ambiente (CEPIS)

7.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

7.4.1. ELECCION DEL MATERIAL DE VIDRIO, INSTRUMENTOS Y REACTIVOS EMPLEADOS.

7.4.1.1. MATERIAL DE VIDRIO EMPLEADO.

Todo el material de vidrio volumétrico empleado son de clase A, y sus especificaciones se indican en la Tabla 7.1.

TABLA 7.1. Material de vidrio empleado

TIPO DE VIDRIERIA	CAPACIDAD (ml)	LIMITE DE ERROR (%)	ESPECIFICACION
<i>Frascos volumétricos</i>	50	0.06	<i>Calibración volumétrica con agua destilada y corrección de la temperatura TC*</i>
	100	0.08	
	500	0.15	
	1000	0.30	
<i>Pipetas</i>	1	0.006	<i>Calibración volumétrica con agua destilada y corrección de la temperatura TD*</i>
	2	0.006	
	4	0.010	
	5	0.010	
	10	0.020	
	25	0.025	
	100	0.080	
<i>Columna de reducción</i>	50 ml	<i>Diámetro interno 3.0 cm , 25 cm de largo (ver Figura N° 7.1 en la sección 7.4.4)</i>	

TC frascos volumétricos contienen un determinado volumen⁽²⁷⁾.

TD Pipetas, vierten un determinado volumen cuando el vaciado se efectúa en forma vertical⁽²⁷⁾.

7.4.1.2. INSTRUMENTOS EMPLEADOS.

Los instrumentos usados y sus especificaciones se indican en la Tabla N° 7.2.

TABLA 7.2. Instrumentos empleados en el análisis de nitratos y nitritos

Equipo	Marca	Modelo	Especificación
<i>Balanza analítica</i>	<i>Sartorius</i>	<i>BP221S</i>	<i>Sensibilidad : 0.1 mg</i>
<i>Espectrofotómetro UV/visible</i>	<i>Hewlett Packard</i>	<i>8452A</i>	<i>Detector con arreglo de diodos con 2nm de resolución desde 190 – 820 nm Ruido instrumental <0.0002 UA⁽¹⁷⁾</i>

Nota.- UA: unidad de absorbancia

7.4.1.3. REACTIVOS EMPLEADOS.

En la Tabla 7.3. se señala los reactivos preparados empleados y sus características

TABLA 7.3. Reactivos empleados

<i>Reactivo</i>	<i>Formula</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>Marca , grado</i>
<i>Cadmio metálico</i> <i>Malla 20-100</i>	<i>Cd</i>	<i>112.40</i>	<i>Merck, G.R.</i>
<i>Acido clorhídrico</i>	<i>HCl 37%</i>		<i>Merck, G.R.ACS.</i>
<i>Sulfato de cobre</i>	<i>CuSO₄.5H₂O 99.0%</i>	<i>249.69</i>	<i>Merck, G.R, ACS. ISO</i>
<i>Nitrato de potasio</i>	<i>KNO₃ 99.0%</i>	<i>101.11</i>	<i>Merck, G.R. ISO</i>
<i>Acido fosfórico</i>	<i>H₃PO₄ 85%</i>	<i>98</i>	<i>Merck, G.R.ACS</i>
<i>Sulfanilamida</i>	<i>C₆H₉N₂O₂S 99.0%</i>	<i>172.21</i>	<i>Merck, G.R.</i>
<i>Diclorhidrato de N-(1-naftil-etilendiamina)</i>	<i>C₁₂H₁₆Cl₂N₂ 90% referente a la sustancia anhidra</i>	<i>259.18</i>	<i>Merck, G.R.</i>
<i>Cloruro de amonio</i>	<i>NH₄Cl 99.8%</i>	<i>53.49</i>	<i>Merck, G.R. ACS.ISO</i>
<i>Etilendiaminotetracético disódico</i>	<i>[CH₂N(CH₂COOH)CH₂COONa]₂.2H₂O 99.0%</i>	<i>372.24</i>	<i>Merck, G.R.</i>
<i>Nitrito de sodio</i>	<i>NaNO₂ 99.0%</i>	<i>69</i>	<i>Merck, G.R.ACS</i>

Nota.- G.R.: grado reactivo para análisis.

7.4.1.4. MUESTRAS CONTROL EMPLEADAS.

En la Tabla 7.4. se señala los reactivos preparados empleados y sus características

TABLA 7.4. Muestra control

<i>Muestra control</i>	<i>Especificación</i>
<i>Estándar de NO₃⁻ 1000 ppm</i>	<i>Solución 500 ml Merck lote 90368397</i>
<i>Estándar de NO₂⁻ 1000 ppm</i>	<i>Titrisol Merck lote: 90389112</i>
<i>Ampolla Nutrientes 1</i>	<i>QC-97 U.S. Environmental Protection Agency</i>
<i>Ampolla Nutrientes 1</i>	<i>QC-99 U.S. Environmental Protection Agency</i>

Nota:

Ampolla Nutrientes 1 es muestras de evaluación (performance evaluation PE) usada para la preparación de soluciones en el laboratorio, para determinaciones de nitrógeno amoniacal, nitrógeno nitrato y fósforo ortofosfato. Aproximadamente cada ampolla contiene 21 ml.

7.4.2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Nota: agua ultrapura es el agua tipo I (agua destilada y desionizada ver proceso de purificación en el Anexo N° 2).

a) Gránulos de cadmio-cobre:

Se lava 50 g de gránulos de cadmio de malla 50 – 100 nuevos o usados con 100 ml de HCl 6N y luego se lava con agua ultrapura por lo menos 10 veces. Se añade 100 ml de solución de sulfato de cobre al 2% y se agita por rotación durante 5 minutos o hasta que el color azul se desvanezca parcialmente. Se decanta y se repite la agitación con solución de sulfato de cobre al 2% hasta que empiece a formar un precipitado coloidal marrón, se lava con agua ultrapura cuidadosamente, para eliminar todo el cobre precipitado (por lo menos 10 veces).

b) Ácido clorhídrico (HCl 6 N)

En un vaso de 1 litro se agregan 500 ml de agua ultrapura y 500 ml de HCl concentrado.

c) Solución de sulfato de cobre 2%:

Se disuelve 20g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua ultrapura y se diluye con la misma agua hasta alcanzar un volumen de 1000 ml.

d) Solución madre de nitrato (100 ug N-NO_3^- /ml)

Se seca una cantidad suficiente de nitrato de potasio (KNO_3) a 105 °C durante 24 horas. Luego se disuelven 0,7218 g en agua ultrapura y se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar 1 000 ml, en un frasco volumétrico de 1 litro.

Se agregan 2 ml de cloroformo (CHCl_3) para conservar la solución.

Nota: Esta solución permanece estable durante seis meses.

e) Solución patrón de nitrato (10 ug N-NO_3^- /ml)

Con una pipeta se transfieren 100,0 ml de solución madre de nitrato a un frasco volumétrico de 1 l, y se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 1 000 ml. Se agregan 2 ml de CHCl_3 para conservar la solución.

Nota: Esta solución permanece estable durante seis meses.

f) Reactivo de color

Se añade a 80 ml de agua ultrapura, 10 ml de ácido fosfórico a 85% y 1 g de sulfanilamida. Después de disolver completamente la sulfanilamida, se añade 0.1 g de diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina.

Se mezcla para disolver y se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 100 ml.

Nota: La solución permanece estable durante un mes, cuando se conserva en un frasco oscuro de polietileno a 4 °C.

g) Solución de cloruro de amonio- EDTA

Se disuelve 13 g de NH_4Cl y 1,7 g de EDTA en 900 ml de agua ultrapura, se ajusta el pH a 8,5 con NH_4OH concentrado y se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 1000 ml, en un frasco volumetrico de 1000 ml.

h) Solución diluida de cloruro de amonio- EDTA:

Se pipetea 600 ml de solución de NH_4Cl -EDTA en un frasco volumétrico de 1000 ml y se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 1 000 ml.

i) Solución madre de nitrito (250 $\mu\text{g N-NO}_2^-/\text{ml}$)

Se disuelve 1,232 g de NaNO_2 en agua ultrapura y se diluye hasta alcanzar un volumen de 1 000 ml, en un frasco volumétrico de 1 litro. Se conserva la solución con 1 ml de CHCl_3 .

Nota: : La solución permanece estable durante tres meses, cuando se conserva en un frasco oscuro. Dado que NO_2^- se oxida fácilmente en presencia de humedad, se debe mantener el reactivo de NaNO_2 bien tapado para evitar la entrada de aire, se debe estandarizar diariamente; ver Anexo N° 4

j) Solución intermedia de nitrito (10 $\mu\text{g N-NO}_2^-/\text{ml}$)

Se pipetea 20,00 ml de la solución madre de nitrito en un frasco volumétrico de 500 ml y se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 500 ml.

Nota: Esta solución se prepara diariamente.

k) Solución patrón de nitrito (1,0 $\mu\text{g N-NO}_2^-/\text{ml}$)

Se pipetea 50,00 ml de la solución intermedia de nitrito en un frasco volumétrico de 500 ml y se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 500 ml.

Nota: Esta solución se prepara diariamente.

l) Solución patrón de nitrito (0.1 $\mu\text{g N-NO}_2^-/\text{ml}$)

Se pipetea 10,00 ml de la solución intermedia de nitrito en un frasco volumétrico de 1000 ml y se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 500 ml.

Nota: Agua ultrapura o agua tipo I (destilada y desionizada ver proceso de purificación en el Anexo N° 2).

7.4.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS CONTROL

a) Solución estándar de nitrato de 10 mg NO₃⁻/l (10 ug NO₃⁻/ml).

Se pipetea 10,00 ml de estándar de nitrato de 1000 ppm en un frasco volumétrico de 1000 ml y se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 1000 ml.

b) Solución estándar de nitrato de 0.1 mg NO₃⁻/l (0.1 ug NO₃⁻/ml).

Se pipetea 10,00 ml de la solución estándar de nitrato de 10 ppm en un frasco volumétrico de 1000 ml y se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 1000 ml.

c) Solución estándar de nitrito de 10 mg NO₂⁻/l (10 ug NO₂⁻/ml)

Se pipetea 10,00 ml de estándar de nitrato de 1000 ppm en un frasco volumétrico de 1000 ml y se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 1000 ml.

d) Solución estándar de nitrito de 1 mg NO₂⁻/l (1 ug NO₂⁻/ml)

Se pipetea 10,00 ml de estándar de nitrato de 100 ppm en un frasco volumétrico de 100 ml y se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 100 ml.

e) Solución estándar de nitrito de 0.1 mg NO₂⁻/l (0.1 ug N- NO₂⁻/ml)

Se pipetea 10,00 ml de la solución estándar de nitrato de 10 ppm en un frasco volumétrico de 1000 ml y se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 1000 ml.

f) Muestra control QC-97

Se abre la ampolla y se pipetea 10 ml de solución en un frasco volumétrico de 1000 ml y se diluye con agua ultrapura hasta un volumen de 1000 ml.

Nota: se añade 1 ml de H₂SO₄ concentrado para preservar, la solución es estable 28 días.

g) Muestra control QC-99

Se abre la ampolla y se pipetea 10 ml de solución en un frasco volumétrico de 1000 ml y se diluye con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 1000 ml.

Nota: se añade 1 ml de H₂SO₄ concentrado, para preservar. La solución es estable 28 días.

7.4.4. DESARROLLO DEL MÉTODO ELEGIDO

El desarrollo del método de reducción con cadmio para la determinación conjunta de los nitratos y nitrito involucra tres pasos:

- preparación de la columna de reducción
- reducción de nitrato a nitrito
- medición colorimétrica UV-Visible

a) Preparación de la columna de reducción

Se construye la columna como se indica en la Figura N°7.1. columna de reducción (Figura 4500-NO₃⁻:1 APHA/AWWA/WEF)⁽¹⁰⁾

Se inserta un tapón de lana de vidrio en la base de la columna de reducción y se llena con agua ultrapura.

Se coloca suficiente cantidad de gránulos de Cu-Cd para producir una columna de 18.5 cm de largo.

Nota : se debe mantener el nivel del agua por encima de los gránulos de Cu-Cd, para evitar que quede aire atrapado

Se lava la columna con 200 ml de solución diluida de NH₄Cl-EDTA, y se recoge a una tasa de 7-10 ml/min.

Se activa la columna pasando a través de ella 100 ml de solución compuesta por 25% de solución patrón de 1,0 mg N-NO₃/L mas 75% de solución de NH₄Cl-EDTA, y se recoge a una tasa de 7-10 ml/min.

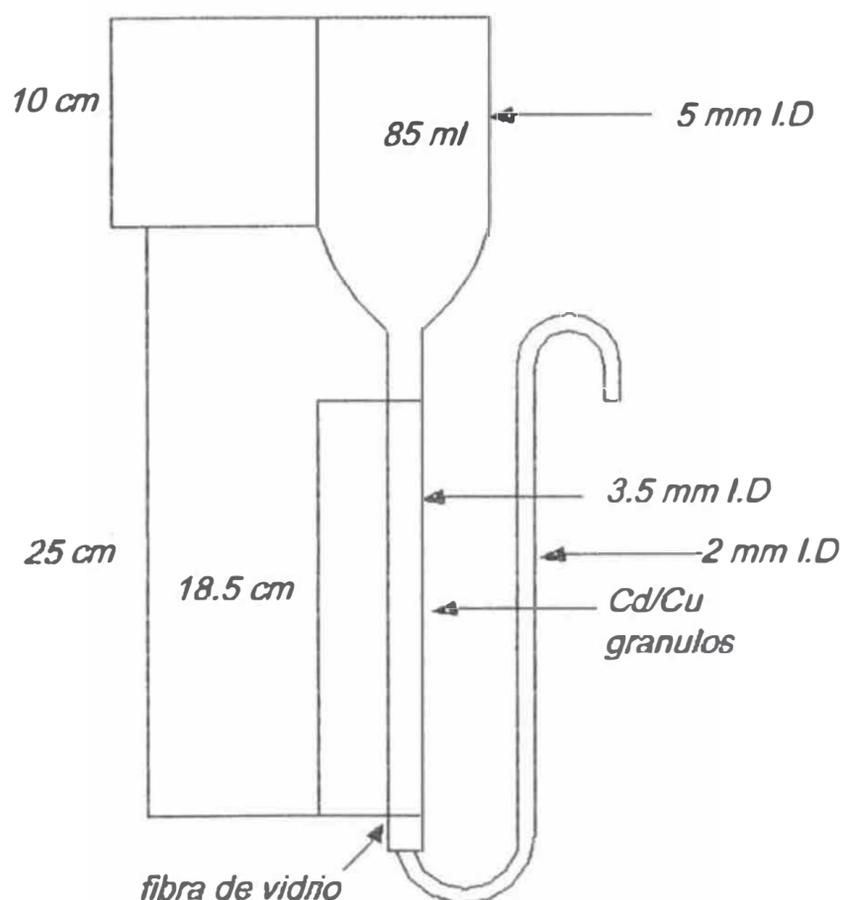


FIGURA N°7.1. Columna de reducción de Cd-Cu

b) Reducción de nitratos a nitritos

Se pipetea 25 ml de muestra o una porción diluida con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 25 ml, en un frasco volumétrico de 100 ml, se añade 75 ml de solución diluida de cloruro de amonio-EDTA.

Se vierte la muestra preparada en la columna y se recoge en una probeta de 50 ml, a una tasa de 7-10 ml/min (de 7 –10 minutos tiempo total de contacto).

Se desecha los primeros 25 ml, y se reúne el resto en el frasco volumétrico inicial de la muestra.

Nota: No es necesario lavar la columna entre muestras.

c) Medición colorimétrica UV-visible.

En un frasco volumétrico de 50 ml o vaso de 100 ml, se vierte 50 ml de solución de muestra reducida y se añade 2 ml de reactivo de color, se homogeniza la solución.

Nota: después de la reducción no debe esperarse más de 15 minutos para la adición de reactivo de color.

Después de 15 minutos, pero antes de los 30 minutos, se mide la absorbancia de la muestra a 540 nm con una celda de 1 cm; se utiliza el blanco de reactivo como solución de referencia .

7.4.5. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS DEL MÉTODO ELEGIDO

En la determinación de nitratos y nitritos se evalúan los siguientes parámetros

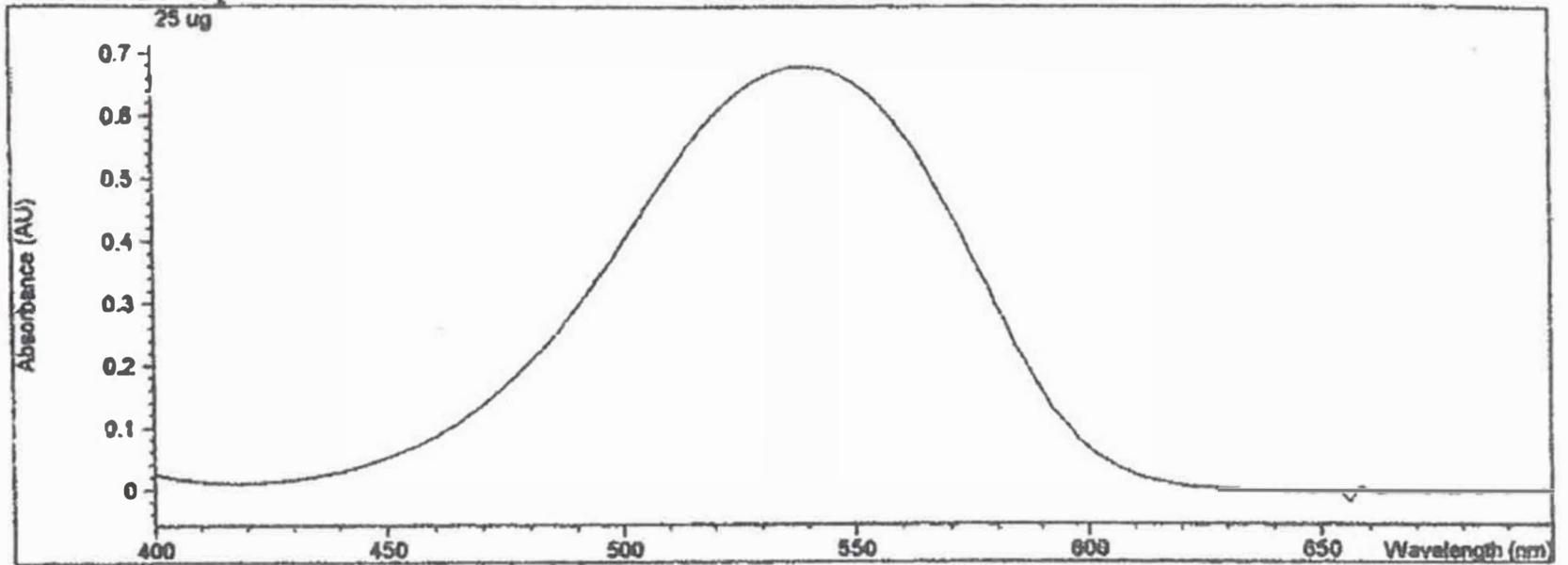
- Determinación de la máxima longitud de onda
- Determinación de la linealidad del complejo a diferentes concentraciones
- Evaluación del tiempo de formación del complejo
- Evaluación del tiempo de reducción a través de la columna
- Evaluación del pH de reducción a través de la columna
- Evaluación de la eficiencia de la columna de reducción

7.4.5.1.DETERMINACIÓN DE LA MÁXIMA LONGITUD DE ONDA

Para la determinación de la máxima longitud de onda se utilizó la solución patrón de nitrito de 25 ug preparada según (7.4.2.k), se adicionó 2 ml de reactivo de color preparado según (7.4.2..f), se agita la solución y después de 10 minutos se realiza la medida espectrofotométrica de las absorbancias del complejo, en el rango de 400 a 600 nm, determinándose la máxima longitud de onda a 540 nm, que corresponde al pico máximo de absorbancia del complejo (Fig. N° 7.2)

<i>Celda</i>	<i>Paso de luz de 1 cm</i>
<i>Nombre del solvente</i>	<i>Agua</i>
<i>Concentración</i>	<i>25 ug</i>
<i>Función</i>	<i>Absorbancia</i>
<i>Rango de longitud de onda</i>	<i>300 a 700 nm</i>
<i>Tiempo de integración</i>	<i>1 segundo</i>

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<540nm>
1	25 µg	0.67876

FIGURA N°7.2. Espectro de Absorción del complejo

7.4.5.2.DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL COMPLEJO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO Y NITRITO

En la literatura se reporta el rango de concentraciones adecuadas para la determinación de los nitritos de 0.005 a 1.00 mg N-NO₂⁻/l, para los nitratos de 0.01 a 1.00 mg N-NO₃⁻/l. Se preparan las siguientes curvas de calibración:

a) Curva de calibración de nitritos en el rango de 0.5 a 25 ug N-NO₂⁻ (0.01 a 0.5 mgN-NO₂⁻/l)

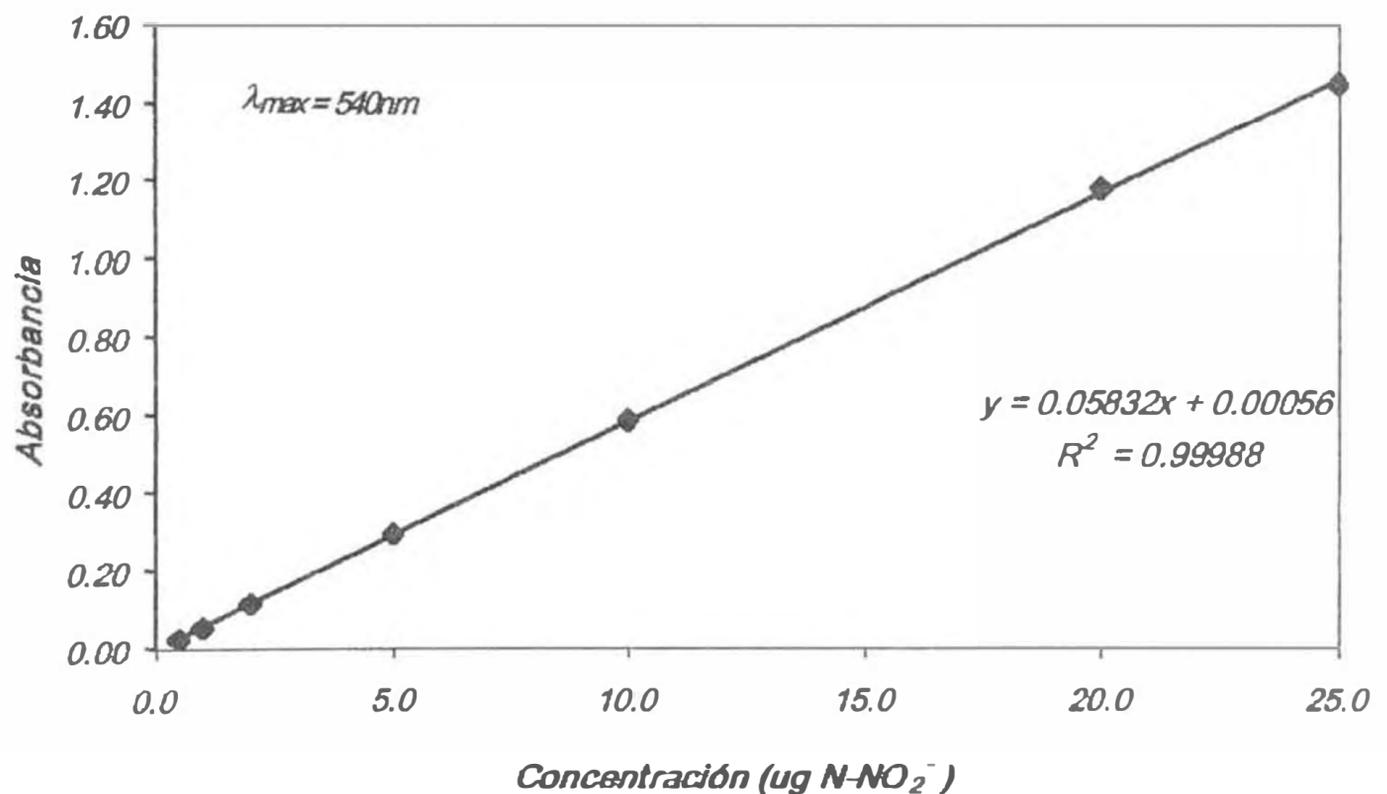
Se determino la curva de calibración preparando estándares de calibración como se indica en la Tabla 7.5.. a partir del estándar de nitrito (preparado según 7.4.2.1) en frascos volumétricos de 50 ml.

En la Figura N° 7.3. se muestra la curva de calibración

TABLA 7.5. Soluciones estándares para la curva de calibración 0.5 a 25 ug N-NO₂⁻

N°	Volumen de estándar añadido (ml)	Cantidad absoluta de N-NO₂⁻ (ug/50ml)	Absorbancia
1	0.5	0.5	0.02650
2	1.0	1.0	0.05620
3	2	2	0.11591
4	5	5	0.29662
5	10	10	0.58611
6	20	20	1.17680
7	25	25	1.44920

Figura N ° 7.3. Curva de calibración de nitritos 0.5 ug a 25 ug N-NO₂⁻ /50 ml



Se dividió el rango de calibración preparando las siguientes curvas de calibración:

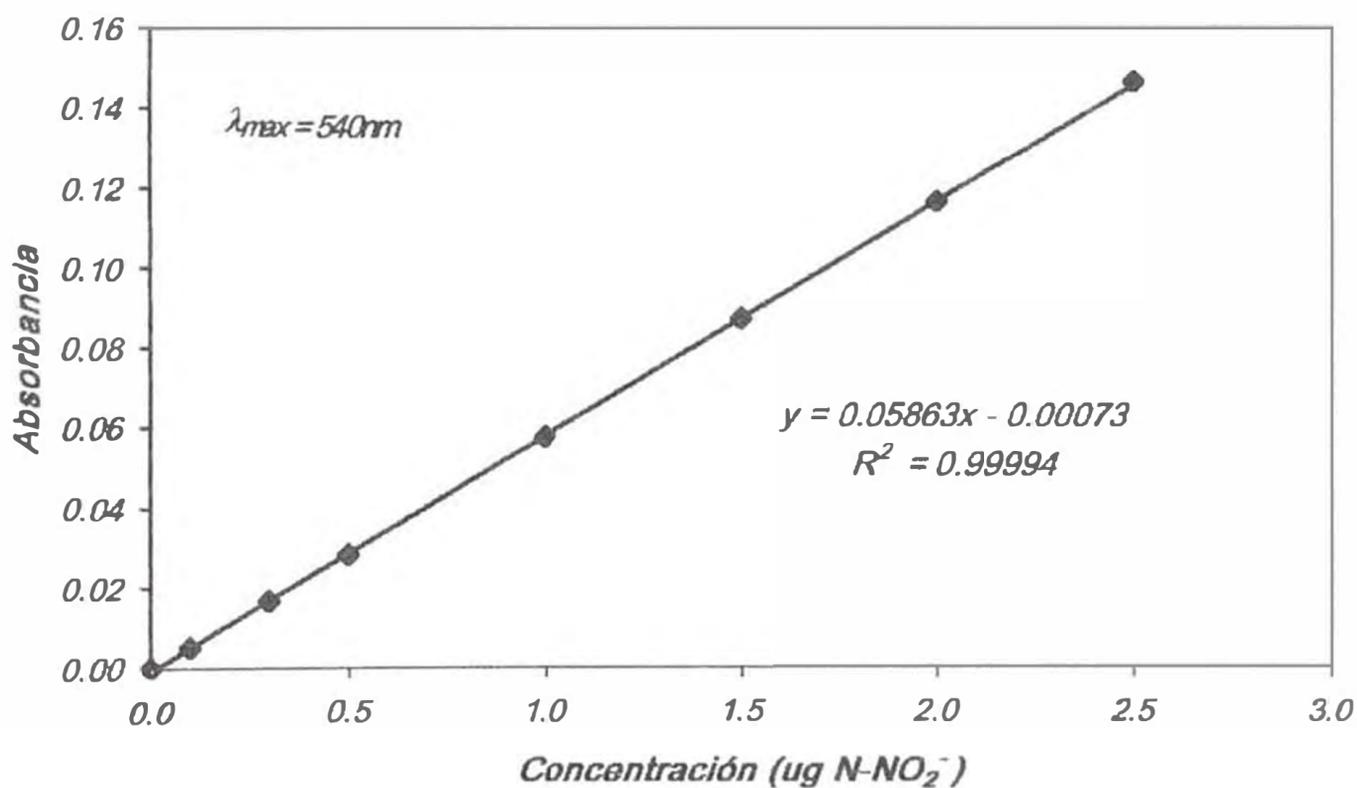
b) Curva de calibración de nitritos en el rango de 0.1 a 2.5 ug N-NO₂⁻ (0.005 a 0.05 mg N-NO₂⁻/l)

A partir de la solución patrón de nitrito preparado según 7.4.2.k, se determinó la curva de calibración preparando los siguientes estándares de calibración en frascos volumétricos de 50 ml, ver los estándares en la Tabla 7.6.. En la Figura N°7.4. se muestra la curva de calibración.

TABLA 7.6. Soluciones estándares para la curva de calibración
0.1 a 2.5 $\mu\text{g N-NO}_2^-$

N°	Volumen de estándar añadido (ml)	Cantidad absoluta de N-NO_2^- ($\mu\text{g}/50\text{ ml}$)	Absorbancia 540 nm
1	1	0.1	0.00526
2	3	0.3	0.01658
3	5	0.5	0.02810
4	10	1.0	0.05761
5	15	1.5	0.08711
6	20	2.0	0.11633
7	25	2.5	0.14627

Figura N °7.4. Curva de calibración de nitritos
0.1 μg a 2.5 $\mu\text{g N-NO}_2^-/50\text{ ml}$



c) Curva de calibración de nitritos en el rango de 3 a 25 $\mu\text{g N-NO}_2^-$ (0.06 a 0.5 $\text{mg N-NO}_2^-/l$)

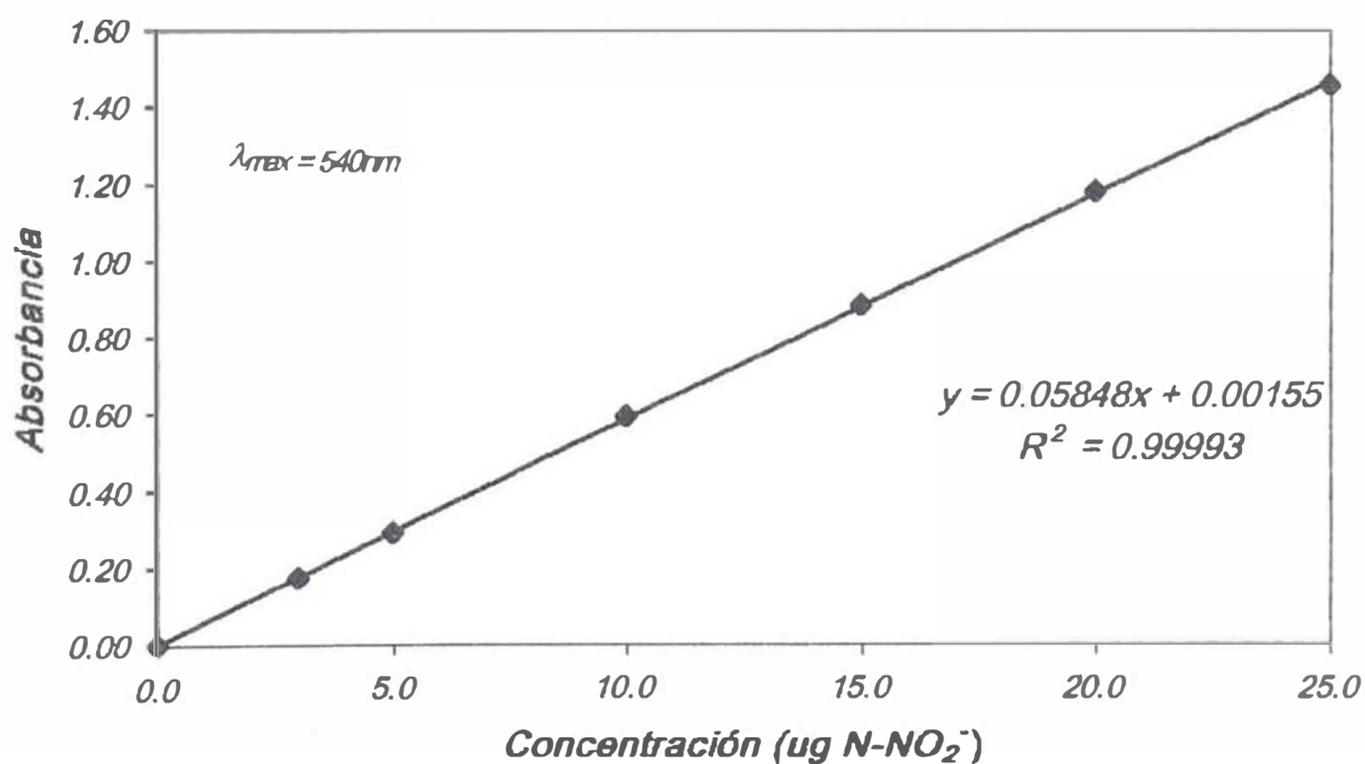
A partir de la solución patrón de nitrito preparado según 7.4.2.k, se determinó la curva de calibración preparando los siguientes estándares de calibración en frascos volumétricos de 50 ml, ver estos estándares en la Tabla 7.7.

En la Figura N°7.5. se muestra la curva de calibración con su respectivo coeficiente de correlación.

TABLA 7.7. Soluciones estándares para la curva de calibración de 3 a 25 ug N-NO₂⁻/50ml

N°	Volumen de estándar añadido (ml)	Cantidad absoluta de N-NO ₂ ⁻ (ug/50 ml)	Absorbancia
1	3	3	0.17406
2	5	5	0.29178
3	10	10	0.59323
4	15	15	0.88113
5	20	20	1.17550
6	25	25	1.45690

Figura N°7.5. Curva de calibración de nitritos 3 ug a 25 ug N-NO₂⁻/50 ml.



d) Curva de calibración de nitratos en el rango de 1.25 a 25ug N-NO₃⁻

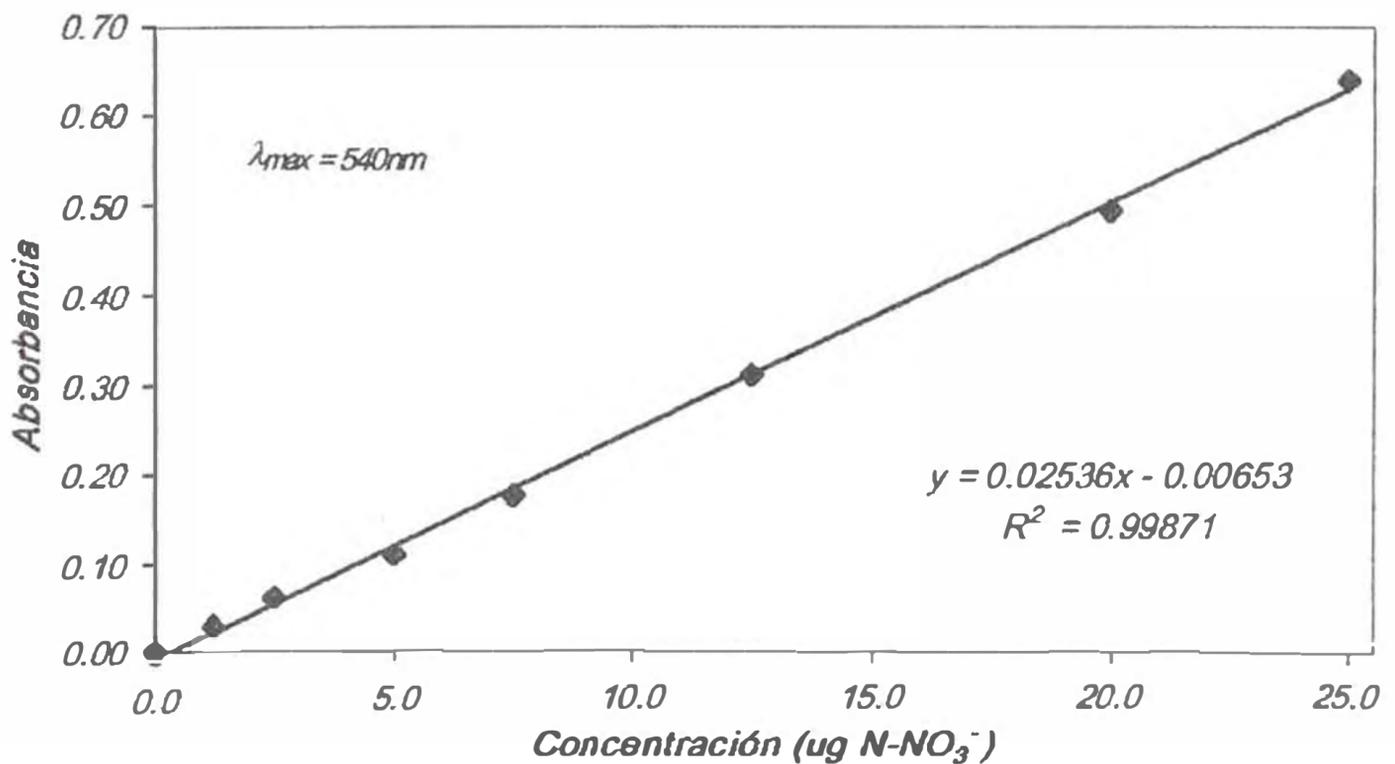
A partir de la solución patrón de nitrato preparado según 7.4.2.e, se preparan los siguientes estándares de calibración en frascos volumétricos de 50 ml, ver Tabla 7.8. de los estándares preparados se tomo 25 ml en una frascos volumétrico de 100 ml, se adiciona 75 ml solución de EDTA-cloruro de amonio preparado según 7.4.2.h, se pasa a través de la columna de

reducción a una tasa de 8 ml por minuto, se eliminan los primeros 25 ml, de la solución restante se toma 50 ml en un frasco volumétrico de 50 ml y se adiciona 2 ml de reactivo de color; después de 10 minutos se lee la absorbancias de complejo diazotado formado y se construye la curva de calibración ver Figura N° 7.6.

TABLA 7.8. Soluciones estándares para la curva de calibración 1.25 a 25 ug N-NO₃⁻/50ml.

N°	Volumen de estándar añadido (ml)	Cantidad absoluta de N-NO ₂ ⁻ (ug/50 ml)	Absorbancia
1	0.5	1.25	0.0309
2	1.0	2.5	0.0624
3	2.0	5.0	0.1096
4	3.0	7.5	0.1737
5	5.0	12.5	0.3096
6	8.0	20.0	0.4932
7	10.0	25.0	0.6380

Figura N °7.6. Curva de calibración de nitratos 1.25 ug a 25 ug N-NO₃⁻/50 ml



7.4.5.3. EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO DIAZOTADO

Este estudio se realiza con un estándar de 25 ug N-NO₂⁻, al cual se añade 2 ml de reactivo de color. Midiéndose los valores de absorbancia del complejo en 30 minutos, en el espectrofotómetro UV-visible.

Se observa que a partir de los 15 minutos la absorbancia presenta una mínima variación hasta 23 minutos (Tabla 7.9).

TABLA 7.9 Tiempo de formación del complejo diazotado (estabilidad)

Nº	Tiempo (minutos)	Absorbancia	Nitritos como N-NO ₂ ⁻ (ug/50 ml)
1	1	0.5662	22.45
2	3	0.5963	23.64
3	5	0.6155	24.40
4	7	0.6263	24.83
5	9	0.6325	25.08
6	11	0.6372	25.26
7	13	0.6409	25.41
8	15	0.6425	25.48
9	16	0.6425	25.48
10	17	0.6426	25.48
11	18	0.6422	25.46
12	19	0.6418	25.46
13	20	0.6412	25.44
14	21	0.6410	25.43
15	22	0.6424	25.42
16	23	0.6409	25.41
17	24	0.6325	25.08
18	25	0.6321	25.06
18	26	0.6320	25.06
20	27	0.6307	25.01
21	28	0.6271	24.86
22	30	0.6261	24.82

7.4.5.4 EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE REDUCCIÓN A TRAVÉS DE LA COLUMNA

La evaluación del tiempo de reducción a través de la columna es importante por dos motivos:

- a) El tiempo de contacto con el agente reductor
- b) La oxidación del nitrito debido al oxígeno del aire, especialmente a concentraciones bajas (menores a 0.1 mg N-NO₂⁻/L).

Para este estudio se preparan dos soluciones estándar, una de concentración baja (2.5 ug N-NO₃⁻) y otra de concentración alta (25 ug N-NO₃⁻), a partir de la solución patrón preparada según 7.4.2.e.

Se pasan ambos estándares a través de la columna de reducción desde un tiempo de contacto desde 5 hasta 15 minutos, obteniéndose los resultados de la Tabla 7.10, para la concentración de 25 ug y la Tabla 7.11., para la concentración de 2.5 ug N-NO₃⁻.

TABLA 7.10. Tiempo de contacto con el agente reductor (estándar de 25 ug N-NO₃⁻/50 ml)

N°	Tiempo de contacto (minutos)	Absorbancia 540 nm	Concentración (ug N-NO₃⁻/50 ml)
1	5	0.6864	25.39
2	6	0.6874	25.43
3	7	0.6893	25.50
4	8	0.6928	25.63
5	9	0.6858	25.32
6	10	0.6574	24.32
7	11	0.6554	24.18
8	12	0.6548	24.13
9	13	0.6528	24.05
10	14	0.6518	24.01
11	15	0.6473	23.95

**TABLA 7.11. Tiempo de contacto con el agente reductor
(estándar de 2.5 ug N-NO₃⁻/50 ml)**

<i>N°</i>	<i>Tiempo de contacto (minutos)</i>	<i>Absorbancia 540 nm</i>	<i>Concentración (ug N-NO₃⁻/50 ml)</i>
1	5	0.0599	2.511
2	6	0.06100	2.559
3	7	0.06050	2.540
4	8	0.06020	2.524
5	9	0.05906	2.474
6	10	0.06060	2.518
7	11	0.05725	2.394
8	12	0.05684	2.377
9	13	0.05282	2.200
10	14	0.05141	2.138
11	15	0.05029	2.080

7.4.5.5 EVALUACIÓN DEL pH DE REDUCCIÓN A TRAVÉS DE LA COLUMNA.

En la literatura se reporta un pH de 8.5^(15,19), por lo que se evalúa el pH entre 8.3 a 8.7 con un tiempo de contacto de 8 minutos,

En la Tabla 7.12. se muestran los resultados obtenidos para un estándar de 2.5 ug N-NO₃⁻.

**TABLA 7.12. pH de reducción a través de la columna
(estándar de 2.5 ug N-NO₃⁻/50 ml.)**

<i>N°</i>	<i>PH</i>	<i>Absorbancia (540 nm)</i>	<i>Concentración (ug N-NO₃⁻/50 ml)</i>
1	8.3	0.0656	2.761
2	8.4	0.0616	2.584
3	8.5	0.0608	2.551
4	8.6	0.0765	2.626
5	8.7	0.0660	2.782

7.4.5.6. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA COLUMNA DE REDUCCIÓN

Para evaluar la eficiencia de la columna de reducción se compara varios estándares de nitrito con estándares de nitrato a la misma concentración⁽¹⁶⁾.

Se calcula la eficiencia de la columna de reducción con la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia \%} = \frac{\text{mg de N-NO}_3^- \text{ reducido}}{\text{mg de N-NO}_2^- \text{ comparado}} \times 100 \quad \text{Ecuación 7.6}$$

Según la literatura⁽¹⁶⁾ el porcentaje de eficiencia debe ser mayor de 75 %.

En la Tabla N° 7.13. se muestran los resultados obtenidos del porcentaje de eficiencia.

TABLA 7.13. Eficiencia de la columna de reducción (estándar de mg N-NO₃⁻/l y mg N-NO₂⁻/l)

N°	mg N-NO ₃ ⁻ /l reducido	mg N-NO ₂ ⁻ /l comparado	Eficiencia de la columna (%)
1	0.890	1.000	89.00
2	0.208	0.210	99.05
3	2.425	2.500	97.00
4	2.353	2.500	94.12
5	0.187	0.200	93.50
6	0.194	0.200	97.00
7	0.910	1.000	91.00
8	2.470	2.500	98.80
9	0.176	0.200	88.00
10	0.181	0.200	90.50
11	0.174	0.200	87.00

7.5. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO EMPLEADO

La validación del método empleado se realiza a través de la evaluación de los siguientes parámetros:

- *Calibración y estandarización de la curva patrón*
- *Examen de contaminación de blancos*
- *Límites de Detección*
- *Exactitud*
- *Precisión*

7.5.1.. CALIBRACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA PATRÓN

Después de haber evaluado la linealidad de absorbancia del complejo a diferentes concentraciones de nitritos y nitratos, se determina la mejor línea recta por regresión lineal (que cumpla la ley de Beer), Se halla el coeficiente de correlación y la linealidad, aceptando un coeficiente de correlación (r^2) de por lo menos 0.990.

Se determinan las siguientes curvas de calibración:

7.5.1.1. Determinación de la curva de calibración de nitritos por regresión lineal (0.5 a 5.0 ug N-NO₂⁻/50 ml)

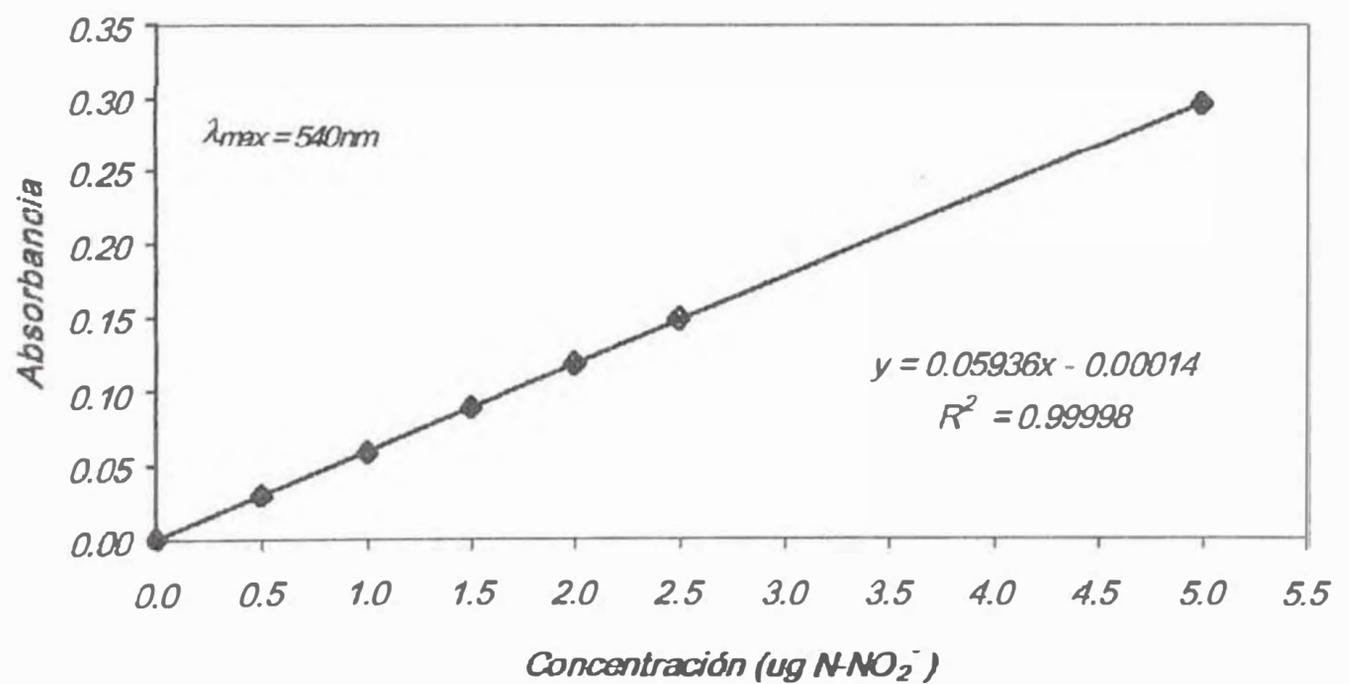
De los datos obtenidos en la literatura se encuentra que normalmente las aguas superficiales tienen concentraciones debajo de 0.1 mg N-NO₂⁻/l⁽⁴⁾ . entonces se prepara la curva de calibración de 0.5 a 5.0 ug (equivalentes a 0.01 a 0.1 mg N-NO₂⁻/l). evaluándose la linealidad, es decir el cumplimiento de la ley de Beer hasta 25 ug N-NO₂⁻.

A partir de la solución patrón de nitritos de 1.0 mg N-NO₂⁻/l (preparado según 7.4.2.1) se prepara soluciones de concentraciones entre 0.5 a 5.0 ug N-NO₂⁻ (equivalentes a 0.01 a 1.0 mg N-NO₂⁻/l), Tabla 7.14. con las cuales se construye la curva de calibración de la Figura N° 7.7, registrándose la absorbancia vs. la concentración en el espectrofotómetro UV-visible y a una longitud de onda de 540 nm. Esta curva se utiliza en todo el proceso de evaluación de los parámetros analíticos del método espectrofotométrico empleado para la determinación de nitritos.

TABLA 7.14. Soluciones estándares para la curva de calibración 0.5 a 5 ug N-NO₂⁻/50ml

<i>Estándar</i>	<i>Volumen de estándar añadido</i>	<i>Cantidad absoluta de N-NO₂⁻ (ug/50 ml)</i>	<i>Absorbancia</i>
<i>St 1</i>	<i>5</i>	<i>0.5</i>	<i>0.02935</i>
<i>St 2</i>	<i>10</i>	<i>1.0</i>	<i>0.05853</i>
<i>St 3</i>	<i>15</i>	<i>1.5</i>	<i>0.08879</i>
<i>St 4</i>	<i>25</i>	<i>2.0</i>	<i>0.11888</i>
<i>St 5</i>	<i>25</i>	<i>2.5</i>	<i>0.14903</i>
<i>St 6</i>	<i>50</i>	<i>5.0</i>	<i>0.29634</i>

Figura N ° 7.7. Curva de calibración de nitritos 0.5 ug a 5.0 ug N-NO₂⁻ /50 ml



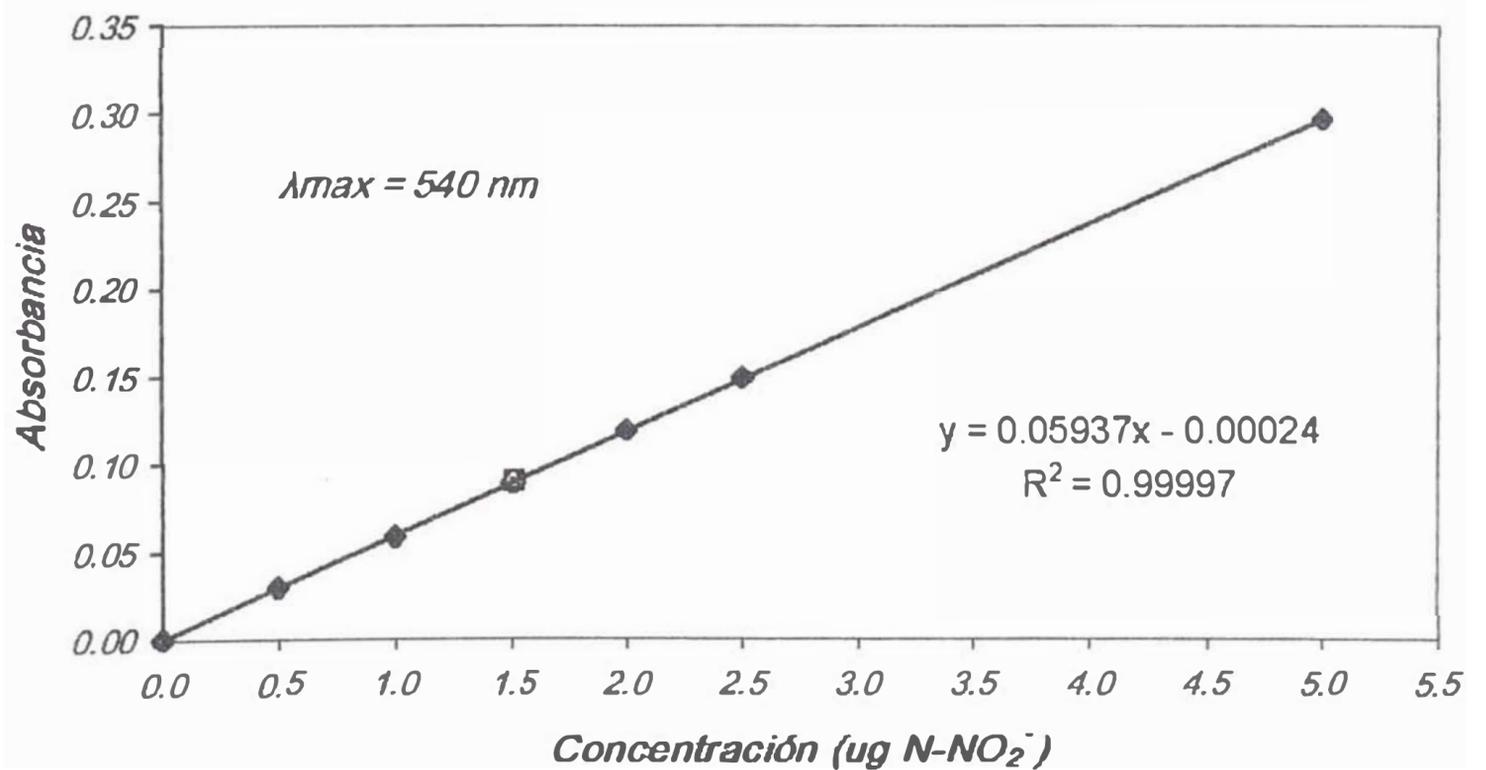
Para verificar la precisión de la calibración^(10,16) se trabaja con un estándar de control de 1.52 ug N-NO₂⁻ (5 ug NO₂⁻), preparado a partir de una fuente diferente a los estándares de la curva de calibración (muestra control de 1ug NO₂⁻/1ml preparada según 7.4.3.e Se determino la concentración de esta muestra por duplicado con el método desarrollado, se obtiene los resultados descritos en la Tabla 7.15.

TABLA 7.15. Verificación de la precisión de la curva de calibración usando un estándar de control 1.52 ug N-NO₂⁻ (5ug NO₂⁻)

Estándar	Cantidad absoluta de N-NO ₂ ⁻ (ug/50 ml)	Absorbancia
St 1	0.5	0.02935
St 2	1.0	0.05853
St 3	1.5	0.08879
St 4	2.0	0.11888
St 5	2.5	0.14903
St 6	5.0	0.29634
EC	1.52	0.08948
EC	1.52	0.08995

Con los datos de la Tabla 7.15., se construye la curva de calibración (Figura N°7.8), relacionando la absorbancia vs. la concentración en el espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 540 nm..

Figura N ° 7.8. Curva de calibración de nitritos con un estándar de control (EC) de 1.52 ug N-NO₂⁻ (5ugNO₂⁻)



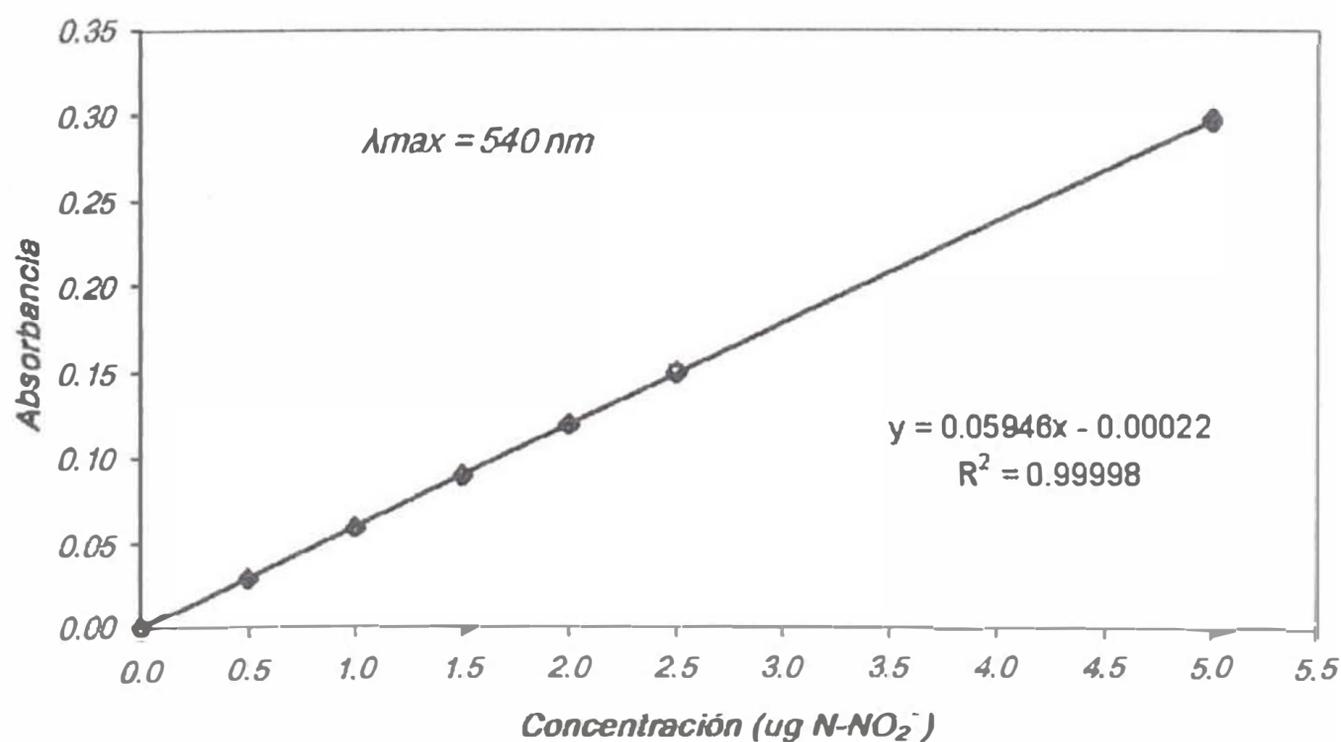
De acuerdo a la literatura para verificar la estabilidad de la curva de calibración (Figura N°7.7.), se determina la concentración de dos estándares de verificación de concentración conocida de 2.5 ug y 5.0 ug N-NO₂⁻ (preparados a partir de 7.4.2.1), que fueron analizadas a un tiempo posterior a la obtención de la curva de calibración, se obtiene los resultados indicados en la Tabla 7.16.

TABLA 7.16. Verificación de la estabilidad de la curva de calibración utilizando estándares de verificación 2.5 ug y 5.0 ug N-NO₂⁻

<i>Estándar</i>	<i>Cantidad absoluta de N-NO₂⁻ (ug/50 ml)</i>	<i>Absorbancia</i>
<i>St 1</i>	<i>0.5</i>	<i>0.02935</i>
<i>St 2</i>	<i>1.0</i>	<i>0.05853</i>
<i>St 3</i>	<i>1.5</i>	<i>0.08879</i>
<i>St 4</i>	<i>2.0</i>	<i>0.11888</i>
<i>St 5</i>	<i>2.5</i>	<i>0.14903</i>
<i>St 6</i>	<i>5.0</i>	<i>0.29634</i>
<i>EV</i>	<i>2.5</i>	<i>0.14865</i>
<i>EV</i>	<i>5.0</i>	<i>0.29756</i>

Con los datos de la Tabla N° 7.16. se construye una nueva curva de calibración Figura N° 7.9.

Figura N °7.9. Curva de calibración de nitritos con dos estandares de verificacion (EV) de 2.5 y 5.0 ug N-NO₂⁻



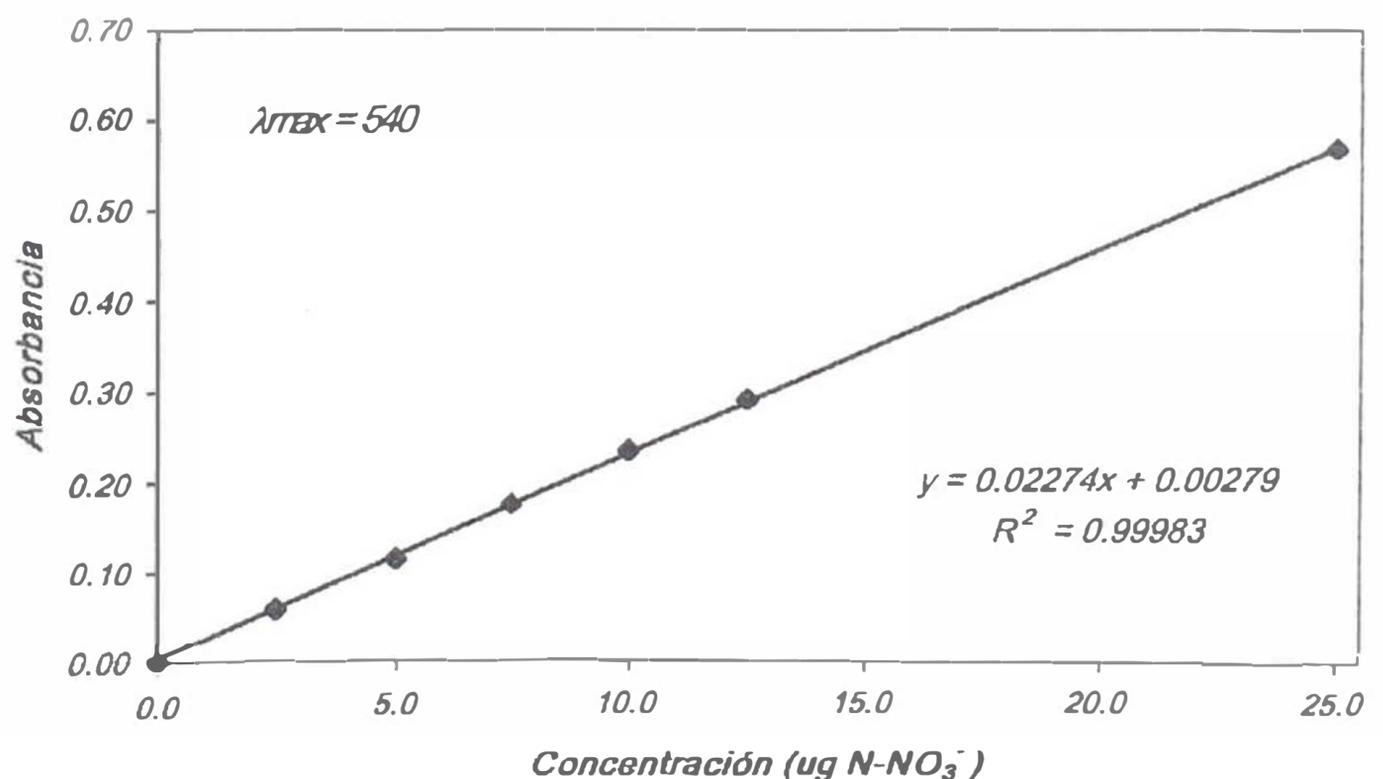
7.5.1.2. Determinación de la curva de calibración de nitratos por regresión lineal (2.5 a 25.0 ug N-NO₃⁻)

A partir de la solución patrón de nitratos de 10 mg N-NO₃⁻/l (preparado según 7.4.2.e.), se preparan soluciones de concentraciones entre 2.5 a 25.0 ug N-NO₃⁻ (equivalentes a 0.1 a 1.0 mg N-NO₃⁻/l), Tabla 7.17 y se desarrollan los pasos indicados en la sección 7.4.5. registrándose la absorbancia vs. la concentración en el espectrofotómetro UV-visible y a una longitud de onda de 540 nm. Con los datos obtenidos se construye la curva de calibración de la Figura N° 7.10. Esta curva se utilizó en todo el proceso de evaluación de los parámetros analíticos del método espectrofotométrico empleado para la determinación de nitratos y nitritos.

TABLA 7.17. Datos para la curva de calibración 2.5 a 25 ug N-NO₃⁻/50 ml

<i>Estándar</i>	<i>Volumen de estándar añadido</i>	<i>Cantidad absoluta de N-NO₃⁻ (ug/50 ml)</i>	<i>Absorbancia</i>
<i>St 1</i>	<i>1.0</i>	<i>2.5</i>	<i>0.06000</i>
<i>St 2</i>	<i>2.0</i>	<i>5.0</i>	<i>0.11488</i>
<i>St 3</i>	<i>3.0</i>	<i>7.5</i>	<i>0.17377</i>
<i>St 4</i>	<i>4.0</i>	<i>10.0</i>	<i>0.23372</i>
<i>St 5</i>	<i>5.0</i>	<i>12.5</i>	<i>0.28966</i>
<i>St 6</i>	<i>10.0</i>	<i>25.0</i>	<i>0.56870</i>

Figura N° 7.10. Curva de calibración de nitratos 2.5 ug a 25 ug N-NO₃⁻/50 ml



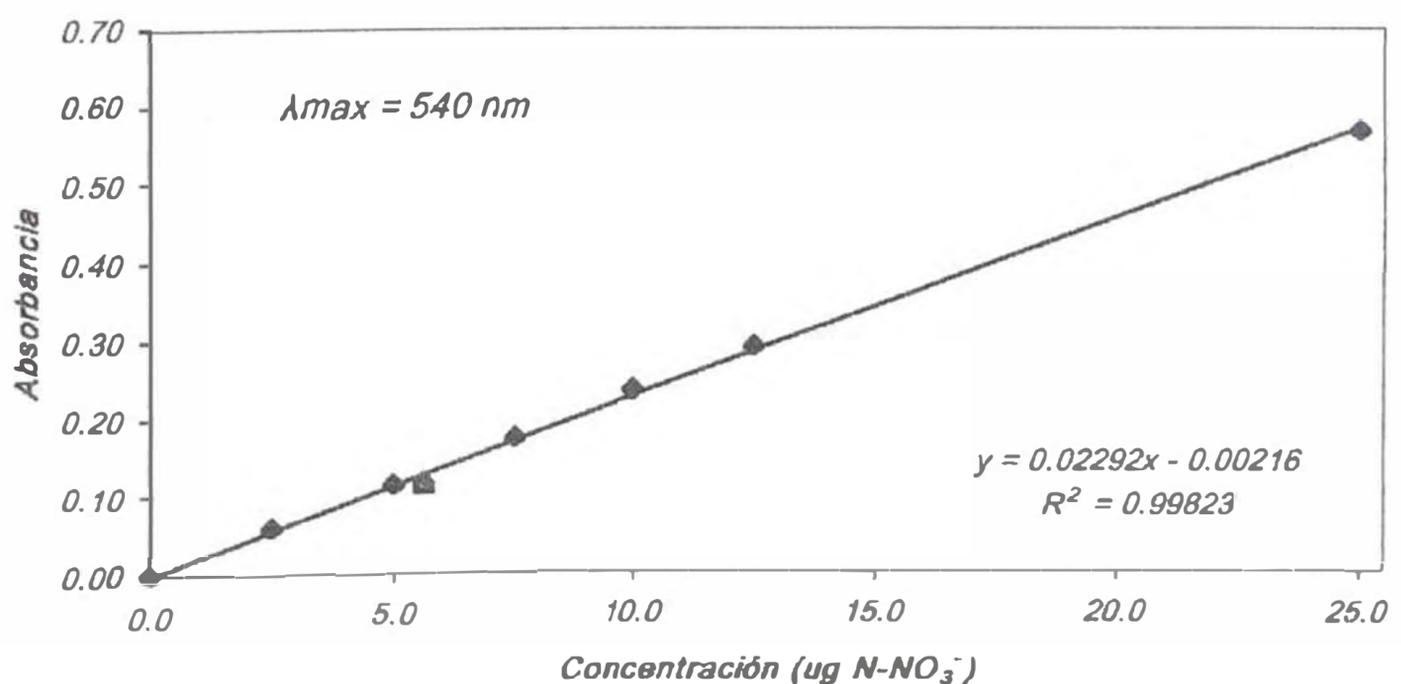
Para verificar la precisión de la calibración^(10,16) se trabaja con un estándar de control de 5.64 ug N-NO₃⁻ (25 ug NO₃⁻), preparado a partir de una fuente diferente a los estándares de la curva de calibración (muestra control de 1ug N-NO₃⁻/1ml preparada según 7.4.3.b). Se determina la concentración de esta muestra por duplicado con el método desarrollado (procedimiento de la sección 7.4.4.), se obtiene los resultados descritos en la Tabla 7.18.

TABLA 7.18. Verificación de la precisión de la curva de calibración usando un estándar de control de 5.64 ug N-NO₃⁻ (25ug NO₃⁻)

Estándar	Volumen de estándar añadido	Cantidad absoluta de N-NO ₃ ⁻ (ug/50 ml)	Absorbancia
St 1	1.0	2.5	0.06000
St 2	2.0	5.0	0.11488
St 3	3.0	7.5	0.17377
St 4	4.0	10.0	0.23372
St 5	5.0	12.5	0.28966
St 6	10.0	25.0	0.56870
EC	10.0	5.64	0.11403
EC	10.0	5.64	0.11714

Con los datos de la Tabla 7.18. se construye la curva de calibración (Figura N° 7.11), relacionando la absorbancia vs. la concentración en el espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 540 nm.

Figura N° 7.11. Curva de calibración de nitratos con un estándar de control de 5.64 ug N-NO₃⁻ (25 ug NO₃⁻)



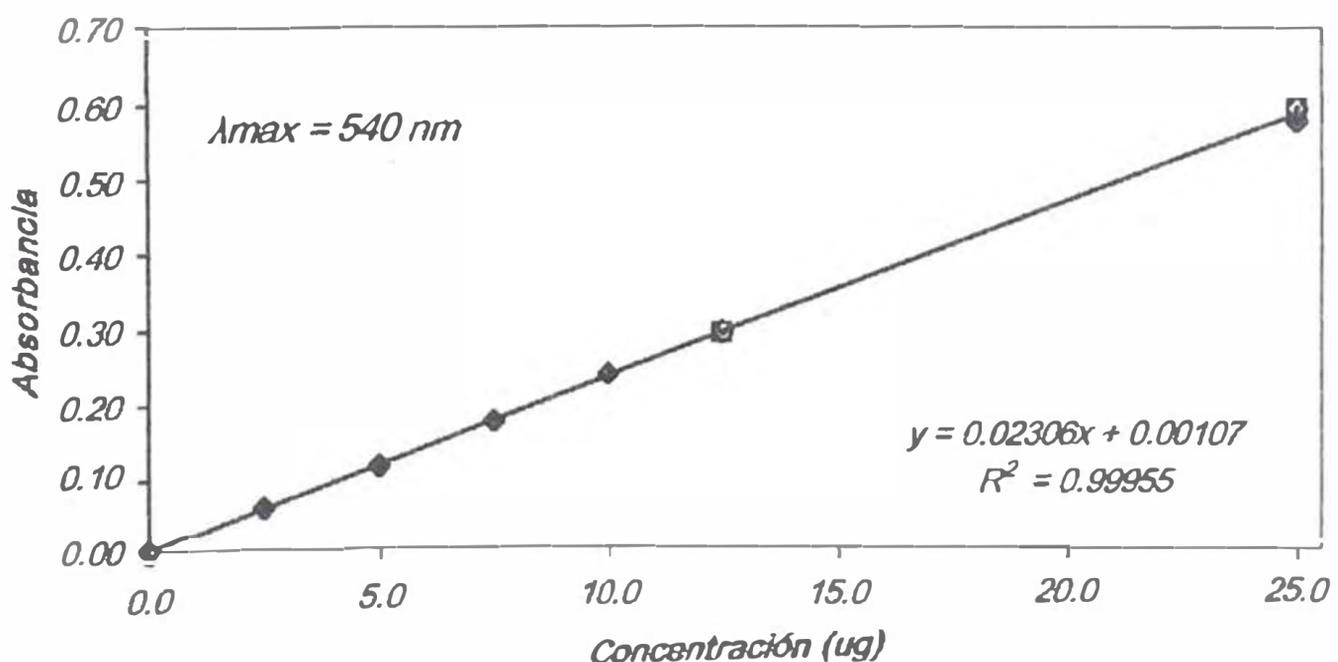
De acuerdo a la literatura, para verificar la estabilidad de la curva de calibración (Figura N°7.10), se determina la concentración de dos estándares de verificación de concentración conocida de 12.5 ug y 25.0 ug $N-NO_3^-$ (preparados a partir de 7.4.2.e.), que fueron analizadas a un tiempo posterior a la obtención de la curva de calibración (siguiendo el método desarrollado en la sección 7.4.4), obteniéndose los resultados descritos en la Tabla N° 7.19.

TABLA 7.19. Verificación de la estabilidad de la curva de calibración utilizando estándares de verificación 12.5 ug y 25.0 ug $N-NO_3^-$

Estándar	Volumen de estándar añadido	Cantidad absoluta de $N-NO_2^-$ (ug/50 ml)	Absorbancia
St 1	1.0	2.5	0.06000
St 2	2.0	5.0	0.11488
St 3	3.0	7.5	0.17377
St 4	4.0	10.0	0.23372
St 5	5.0	12.5	0.28966
St 6	10.0	25.0	0.56870
EV	5	12.5	0.28893
EV	10	25.0	0.58569

Con los datos de la Tabla 7.19. se construye una nueva curva de calibración Figura N° 7.12.

Figura N ° 7.12. Curva de calibración de nitratos con dos estándares de verificación (EV) 12.5 y 25 ug $N-NO_3^-$



7.5.2.. EXAMEN DE CONTAMINACIÓN DE BLANCOS

Para determinar la contaminación por fuentes externas, tales como medio ambiente, reactivos usados y equipos se realiza el examen de blancos y para determinar el ruido que produce el equipo aunque no exista ninguna muestra y sólo se encuentre un blanco^(10,16,20).

7.5.2.1. Examen de contaminación de blancos en la determinación de nitritos

Se hizo la medición analítica de 25 blancos analíticos, de una solución preparada con agua ultrapura y 2 ml de indicador mixto en frascos volumétricos de 50 ml (Tabla 7.20.) y leídos en el espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 540 nm.

TABLA 7.20. Análisis de lecturas de blancos analíticos para la determinación de nitritos (agua ultrapura)

Blanco	Absorbancia	Concentración (ug N-NO₂/50ml)
Bk1	0.0001	0.003
Bk2	0.0007	0.007
Bk3	0.0006	0.012
Bk4	0.0008	0.016
Bk5	0.0007	0.015
Bk6	0.0007	0.015
Bk7	0.0010	0.019
Bk8	0.0006	0.012
Bk9	0.0008	0.016
Bk10	0.0008	0.015
Bk11	0.0003	0.006
Bk12	0.0003	0.007
Bk13	-0.00002	0.002
Bk14	0.0005	0.011
Bk15	0.0002	0.006
Bk16	0.0004	0.009
Bk17	0.0001	0.004
BK18	0.00005	0.003
BK19	0.0005	0.011
BK20	0.0004	0.009
Bk21	0.0010	0.019
Bk22	0.0004	0.009
Bk23	0.0005	0.011
Bk24	-0.00005	0.000
Bk25	0.0005	0.011
Promedio		0.010
Desviación estándar Sed		0.005

7.5.2.2. Examen de contaminación de blancos en la determinación de nitritos y nitratos

Para esta evaluación se prepara 20 blancos analíticos y se determina la concentración de los blancos analíticos siguiendo el procedimiento desarrollado en la sección 7.4.4., leídos contra un blanco omitiéndose el paso de reducción (sección 7.4.4..b), de los cuales se obtiene los datos descritos en la Tabla 7.21.

TABLA 7.21. Análisis de lecturas de blancos analíticos para la determinación de nitratos y nitritos (agua ultrapura)

<i>Blanco</i>	<i>Absorbancia</i>	<i>Concentración (ug/50ml)</i>
<i>Bk1</i>	<i>0.0270</i>	<i>0.670</i>
<i>Bk2</i>	<i>0.0238</i>	<i>0.540</i>
<i>Bk3</i>	<i>0.0130</i>	<i>0.110</i>
<i>Bk4</i>	<i>0.0141</i>	<i>0.150</i>
<i>Bk5</i>	<i>0.0133</i>	<i>0.123</i>
<i>Bk6</i>	<i>0.0219</i>	<i>0.460</i>
<i>Bk7</i>	<i>0.0211</i>	<i>0.440</i>
<i>Bk8</i>	<i>0.0235</i>	<i>0.538</i>
<i>Bk9</i>	<i>0.0198</i>	<i>0.385</i>
<i>Bk10</i>	<i>0.0221</i>	<i>0.480</i>
<i>Bk11</i>	<i>0.0288</i>	<i>0.751</i>
<i>Bk12</i>	<i>0.0262</i>	<i>0.644</i>
<i>Bk13</i>	<i>0.0288</i>	<i>0.751</i>
<i>Bk14</i>	<i>0.0262</i>	<i>0.644</i>
<i>Bk15</i>	<i>0.0248</i>	<i>0.645</i>
<i>Bk16</i>	<i>0.0231</i>	<i>0.485</i>
<i>Bk17</i>	<i>0.0140</i>	<i>0.148</i>
<i>Bk18</i>	<i>0.0240</i>	<i>0.254</i>
<i>Bk19</i>	<i>0.0241</i>	<i>0.627</i>
<i>Bk20</i>	<i>0.0241</i>	<i>0.627</i>
<i>Promedio</i>		<i>0.466</i>
<i>Desviación estándar Sd</i>		<i>0.215</i>

7.5.3.. LÍMITES DE DETECCIÓN

Se evalúan los límites de detección tanto para la determinación de nitritos así como también para la determinación conjunta de nitratos y nitritos; en ambos casos se evalúan los siguientes límites:

- a) Límite de detección Instrumental*
- b) Límite de detección del método*
- c) Límite de detección práctica*

A continuación empezaremos determinando los límites correspondientes a la determinación de nitritos.

7.5.3.1. LÍMITES DE DETECCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS.

a) Limite de detección del Instrumento (LDI)

Como se menciona en la sección 6.1.1.g, el límite de detección se determina adicionando el analito al blanco (agua tipo I), en una concentración aproximada de 5 veces el LDI estimado, para el caso de la determinación de nitritos se trabaja con una solución de 0.006 mg N-NO₂⁻/l (0.3 ug en 50 ml).

Se prepara el estándar de 0.3 ug a partir de la solución patrón de nitrito de 1 ug N-NO₂⁻/ml (según 7.4.2.k). Esta solución se prepara diez veces adicionándola a cada una de ellas 2 ml de solución indicadora mixta (7.4.2.f), después de 15 minutos se registra las absorbancias en el espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 540 nm y se determina la concentración a través de la curva de calibración (ver sección 7.5.1.1., Figura N°7.7).

Los datos obtenidos son descritos en la Tabla 7.22.

En la evaluación del LDI para la determinación de nitritos se trabaja el mismo, pero a diferentes horas, debido a la inestabilidad del ion nitrito (ver en el Anexo N°5, el tiempo de conservación para el análisis de nitritos).

Se determina el LDI utilizando la Ecuación 6.4, obteniéndose como LDI un valor igual a 0.353 ug N-NO₂⁻/l .

TABLA .7.22. Determinación del Límite de Detección Instrumental usando un estándar de 0.3 ug N-NO₂⁻ en 50 ml (agua tipo I)

N°	Fecha	Absorbancia	Concentración (ug N-NO₂⁻/50ml)	Concentración (ug N-NO₂⁻/l)
1	18/10/00	0.01820	0.3270	6.54
2	19/10/00	0.01739	0.3102	6.20
3	20/10/00	0.01611	0.2915	5.83
4	24/10/00	0.01640	0.3103	6.21
5	25/11/00	0.01680	0.3031	6.06
6	26/10/00	0.01691	0.3050	6.10
7	27/10/00	0.01661	0.3008	6.02
8	6/11/00	0.01925	0.3008	6.02
9	7/11/00	0.01958	0.2974	5.95
10	8/11/00	0.01911	0.2987	5.97
<i>Promedio</i>				6.09
<i>Desviación estándar Sed</i>				0.19
<i>LDI = t_{n-1}*Sd (t_{n-1}=1.812; n=10)</i>				0.353

b) Limite de detección del método (LDM):

Según la literatura⁽¹⁶⁾ el límite de detección del método se determina calculando la desviación estándar de 7 o más determinaciones y el promedio de los blancos.

Entonces se calcula el LDM a partir del límite de detección instrumental deducidas de las ecuaciones 6.4 y 6.5 obteniéndose:

$$LDM = Bk + LDI$$

Ecuación 7.7

Bk es el promedio de los blancos, determinadas al mismo tiempo que las muestras y el mismo número de veces. En la Tabla 7.23. se describe los valores de los blancos.

TABLA 7.23 Datos de los blancos analíticos para el Límite de Detección del Método (agua tipo I)

Lote	Fecha	Absorbancia	Concentración (ug N-NO₂⁻/50 ml)	Concentración (ug N-NO₂⁻/l)
1	18/10/00	0.00049	0.0257	0.51
2	19/10/00	0.00120	0.0380	0.76
3	20/10/00	0.00000	0.0112	0.22
4	24/10/00	0.00047	0.0248	0.50
5	25/11/00	0.00034	0.0231	0.46
6	26/10/00	0.00040	0.0241	0.48
7	27/10/00	0.00007	0.0187	0.37
8	6/11/00	0.00000	0.0000	0.00
9	7/11/00	0.00096	0.0297	0.59
10	8/11/00	0.00005	0.0188	0.38
<i>Promedio</i>				0.43
<i>Desviación estándar Sd</i>				0.207
<i>LDM = Bk + LDI</i>				0.780

Se determino el LDM utilizando la Ecuación 7.7, obteniéndose como LDM un valor igual a 0.78 ug N-NO₂⁻/l.

c) Límite de detección Práctica (LDP)

Según la literatura⁽¹⁶⁾ se determina el límite de detección práctica utilizando una muestra real, siguiendo el mismo procedimiento descrito para el LDM en igual número de veces y con sus respectivos blancos.

Se elige una muestra de agua superficial (agua del río Santa), un punto en el cual la concentración de nitritos es aproximadamente 5 veces el límite de detección del método.

Obteniéndose los datos descritos en la Tabla 7.24.

TABLA 7.24. Determinación del límite de detección práctica para la determinación de nítrito

<i>Lote</i>	<i>Volumen medido</i>	<i>Absorbancia</i>	<i>Concentración muestra (ug N-NO₂⁻/50ml)</i>	<i>Concentración muestra(ug N-NO₂⁻/l)</i>
1	50	0.0183	0.3121	6.24
2	50	0.0168	0.2866	5.73
3	50	0.0138	0.2345	4.69
4	50	0.0144	0.2453	4.91
5	50	0.0159	0.2712	5.42
6	50	0.0161	0.2748	5.50
7	50	0.0149	0.2532	5.06
8	50	0.1409	0.2398	4.80
9	50	0.0159	0.2712	5.42
10	50	0.0168	0.2866	5.73
<i>Promedio</i>				5.35
<i>Desviación estándar (Sd)</i>				0.49
<i>LDP = Bk + t_{n-1} * Sd (t_{n-1} = 1.812 para n=10)</i>				1.31

7.5.3.2. LÍMITES DE DETECCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN CONJUNTA DE NITRATOS Y NITRITOS

a) Límite de detección Instrumental (LDI)

Al igual que en la sección 7.5.3.1 el LDI estimado es 0.02 mg N-NO₃⁻/l , para este caso se trabaja con una solución de 0.1 mg N-NO₃⁻/l (2.5 ug N-NO₃⁻ en 50 ml. de agua tipo I).

Se prepara el estándar de 2.5 ug N-NO₃⁻ a partir de la solución patrón de nitrato de 1 ug N-NO₃⁻/ml (según 7.4.2.e), esta solución se prepara diez veces, luego de desarrollar el procedimiento 7.4.4., se registra las absorbancias en el espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 540 nm y se determina la concentración a través de la curva de calibración (sección 7.5.1.2. Figura 7.10.). Los datos obtenidos se describen en la Tabla 7.25. para estándares evaluados en un misma fecha y en la Tabla 7.26. para estándares evaluados en diferentes fechas.

TABLA 7.25. *Determinación del L.D.I., usando un estándar de 2.5 ug N-NO₃⁻ en 50 ml (agua tipo I) en la misma fecha*

<i>Lote</i>	<i>Fecha</i>	<i>Concentración (ug/50 ml)</i>	<i>Concentración (mg/l)</i>
1	3/10/00	2.469	0.099
2	3/10/00	2.668	0.107
3	3/10/00	2.665	0.107
4	3/10/00	2.530	0.101
5	3/10/00	2.780	0.111
6	3/10/00	2.490	0.100
7	3/10/00	2.490	0.100
8	3/10/00	2.500	0.100
9	3/10/00	2.518	0.101
10	3/10/00	2.715	0.109
<i>Promedio</i>			0.103
<i>Desviación estándar Sd</i>			0.0044
<i>LDI = t_{n-1}*Sd (t_{n-1}=1.812; n=10)</i>			0.008

TABLA 7.26. *Determinación del L.D.I, usando un estándar de 2.5 ug N-NO₃⁻ en 50 ml (agua tipo I) en diferentes fechas*

<i>Lote</i>	<i>Fecha</i>	<i>Concentración (ug/50 ml)</i>	<i>Concentración(mg/l)</i>
1	6/10/00	2.536	0.101
2	10/10/00	2.558	0.102
3	11/10/00	2.360	0.094
4	16/10/00	2.265	0.091
5	17/10/00	2.476	0.099
6	19/10/00	2.646	0.106
7	20/10/00	2.720	0.109
8	24/10/00	2.599	0.104
9	25/10/00	2.499	0.100
10	26/10/00	2.500	0.100
<i>Promedio</i>			0.101
<i>Desviación estándar Sd</i>			0.0053
<i>LDI = t_{n-1}*Sd (t_{n-1}=1.812; n=10)</i>			0.0096

b) Limite de detección del método (LDM)

Según la literatura ⁽¹⁶⁾ se puede determinar el LDM, de dos formas a partir de la adición del analito a un blanco (agua tipo I) en aproximadamente cinco veces el valor del LDI estimado o a través de blancos positivos.

En el caso de nitrato se obtiene blancos positivos, por tanto se trabaja el LDM en ambas formas, preparándose diez muestras de blancos y 10 muestras de un estándar de 2.5 ug N-NO₃⁻ y en diferentes días. Se procede de la misma manera que para LDI, obteniéndose los resultados descritos en la Tabla 7.27 y Tabla 7.28.

También se puede determinar el LDM el mismo día pero en diferentes lotes.

Para el cálculo del LDM a partir de blancos positivos se utiliza la Ecuación 7.7, y del LDM a partir de la adición del analito se utiliza la Ecuación 6.5.

TABLA 7.27. Límite de Detección del Método a partir de blancos positivos (agua tipo I)

Lote	Fecha	Concentración (ug/50 ml)	Concentración (mg/L)
1	18/10/00	0.67	0.027
2	19/10/00	0.54	0.022
3	20/10/00	0.75	0.030
4	24/10/00	0.64	0.026
5	25/11/00	0.38	0.015
6	26/10/00	0.47	0.019
7	27/10/00	0.53	0.021
8	6/11/00	0.75	0.030
9	7/11/00	0.44	0.018
10	8/11/00	0.46	0.018
Promedio			0.023
Desviación estándar (Sd)			0.0053
LDM = Bk + LDI			0.032

TABLA 7.28. Determinación del Límite de Detección del Método, usando un estándar de 2.5 ug N-NO₃⁻ en 50 ml (agua tipo I)

Lote	Fecha	Concentración Estándar (0.1 mg/l)	Concentración Blanco mg/l
1	6/10/00	0.101	0.0009
2	10/10/00	0.102	0.0008
3	11/10/00	0.094	0.0030
4	16/10/00	0.091	0.0000
5	17/10/00	0.099	0.0030
6	19/10/00	0.106	0.0000
7	20/10/00	0.109	0.0010
8	24/10/00	0.104	0.0010
9	25/10/00	0.100	0.0010
10	26/10/00	0.100	0.0004
<i>Promedio</i>		0.101	0.001
<i>Desviación estándar Sd</i>			0.0053
<i>LDM = Bk + t_{n-1}*Sd (t_{n-1}=1.812 n=10)</i>			0.018

c) Límite de detección Práctica (LDP)

Según la literatura⁽¹⁶⁾ se determina el LDP utilizando una muestra real, siguiendo el mismo procedimiento descrito para el LDM en igual número de veces y con sus respectivos blancos.

Se elige una muestra de agua superficial de manera tal que su concentración de nitratos es aproximadamente 5 veces el límite de detección del método, obteniéndose los datos descritos en la Tabla 7.29.

El análisis de la muestra elegida sigue el procedimiento descrito en la sección 7.4.4.

Para el cálculo de LDP se utiliza la Ecuación 6.5.

TABLA 7.29. Determinación del límite de detección práctica para la determinación de nitrato

Lote	Volumen medido	Concentración muestra (ug/50 ml)	Concentración muestra (mg/l)
1	25	5.9333	0.24
2	25	6.1481	0.25
3	25	5.1366	0.21
4	25	6.4941	0.26
5	25	5.4911	0.22
6	25	5.4009	0.22
7	25	5.2640	0.21
8	25	5.8129	0.23
9	25	5.8058	0.23
10	25	5.6243	0.22
Promedio			0.229
Desviación estándar (Sd)			0.016
$LDP = Bk + t_{n-1} * Sd$ ($t_{n-1}=1.812$; $n=10$)			0.030

7.5.4. EXACTITUD

Para evaluar la exactitud se determina el grado de concordancia entre los resultados experimentales y el valor aceptado como verdadero⁽¹⁶⁾, en muestras control de concentración conocida y también en muestras control de concentración desconocida, la cual se coteja después de obtener el resultado.

7.5.4.1. EXACTITUD EN LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS

Debido a la inestabilidad del ion nitrito, sólo se trabaja con una muestra control de concentración conocida, preparada según 7.4.3.c (10 ug NO₂⁻ /ml).

Se analiza la muestra control de 10 ug NO₂⁻ (3.04 mg N- NO₂⁻) diez veces, obteniéndose los datos descritos en la Tabla 7.30, con estos resultados se calcula la exactitud, empleando la ecuación 6.1 (sección 6.1.1.e).

TABLA 7.30. Determinación de la Exactitud , con una muestra control de 10 ug NO₂⁻ (0.304 mg N-NO₂⁻/l)

Lote	Volumen medido (estándar d.1)	Concentración (ug/50 ml)	Concentración (mg/l)
1	20	6.13	0.307
2	20	6.17	0.309
3	20	6.03	0.302
4	20	6.10	0.305
5	20	6.08	0.304
6	20	6.06	0.303
7	20	6.02	0.301
8	20	6.04	0.302
9	20	6.10	0.305
10	10	3.17	0.317
11	10	3.06	0.306
12	10	3.04	0.304
13	10	3.06	0.306
14	10	3.11	0.311
15	10	3.02	0.302
16	10	3.09	0.309
17	10	2.90	0.290
18	10	3.01	0.301
19	10	3.01	0.301
20	10	3.03	0.303
21	10	2.96	0.296
22	10	3.28	0.328
<i>Promedio</i>			0.305
<i>Valor Verdadero</i>			0.304
<i>% Exactitud</i>			100.33

7.5.4.2. EXACTITUD EN LA DETERMINACIÓN CONJUNTA DE NITRITOS Y NITRATOS

Para la determinación de nitratos y nitritos se trabaja con dos muestras de control de concentración desconocida , las muestras control QC-99 y QC-97 preparadas en 7.4.3.h y 7.4.3.g respectivamente. Las cuales siguieron los procedimientos descritos en 7.4.4. determinándose la

concentración a partir de la curva de calibración de la Figura N° 7.10, obteniéndose los resultados descritos en la Tabla 7.31 y Tabla 7.32. para las muestras control QC-97 y QC-99 respectivamente. En la Tabla 7.33 se muestran los valores verdaderos de las muestras control y sus rangos de aceptación.

TABLA 7.31 Determinación de la Exactitud (muestra control QC-97)

Lote	Fecha	Volumen medido (ml)	Concentración (ug/50ml)	Concentración (mg/l)
1	3/5/00	10	20.80	2.08
2	4/5/00	10	21.15	2.12
3	5/9/00	10	22.40	2.24
4	6/9/00	10	21.80	2.18
5	7/9/00	10	22.15	2.22
6	11/9/00	10	22.05	2.20
7	12/9/00	10	21.40	2.14
8	13/9/00	10	20.40	2.04
9	14/9/00	10	22.41	2.24
10	15/9/00	10	23.41	2.34
11	20/9/00	10	20.23	2.02
12	21/9/00	10	20.89	2.09
13	22/9/00	10	21.09	2.11
14	25/9/00	10	20.12	2.01
15	25/9/00	10	21.40	2.14
16	25/9/00	10	20.12	2.06
17	28/9/00	10	20.03	2.00
18	29/9/00	10	21.03	2.10
19	2/10/00	10	20.93	2.09
20	3/10/00	10	21.36	2.14
Promedio				2.13
Valor Verdadero				2.10
% Exactitud				101.33

TABLA 7.32. Determinación de la Exactitud (muestra control QC-99)

<i>Lote</i>	<i>Fecha</i>	<i>Volumen medido(ml)</i>	<i>Concentración (ug/50 ml)</i>	<i>Concentración (mg/l)</i>
1	10/10/00	10	12.39	1.24
2	11/10/00	20	22.14	1.11
3	13/10/00	20	22.60	1.13
4	16/10/00	20	24.27	1.21
5	17/10/00	20	23.61	1.18
6	19/10/00	20	24.07	1.20
7	20/10/00	20	23.87	1.19
8	25/10/00	20	24.52	1.22
9	26/10/00	20	24.20	1.21
10	27/10/00	20	24.07	1.20
11	31/10/00	20	22.61	1.13
12	6/11/00	20	23.37	1.16
13	8/11/00	20	22.83	1.14
14	9/11/00	20	23.71	1.18
15	10/11/00	20	24.28	1.21
16	14/11/00	20	22.69	1.13
17	16/11/00	20	21.83	1.09
18	17/11/00	20	21.93	1.09
19	20/11/00	20	21.91	1.08
20	21/11/00	20	22.98	1.15
21	22/11/00	20	21.86	1.09
22	24/11/00	20	21.64	1.08
23	1/12/00	20	22.04	1.10
24	7/12/00	20	22.95	1.15
25	13/12/00	20	22.62	1.13
<i>Promedio</i>				1.152
<i>Valor Verdadero</i>				1.14
<i>% Exactitud</i>				101.05

Con los datos obtenidos en la Tabla 7.31 y 7.32 y los datos de la Tabla 7.33. se calcula la exactitud empleando la Ecuación 6.1.

TABLA 7.33. Valores verdaderos y límites de aceptación de la muestras control QC-99 y QC-97

<i>Muestra Control</i>	<i>VV (mg N-NO₃⁻/l)</i>	<i>Límites de aceptación</i>	<i>Límites de rechazo</i>
<i>QC-99</i>	<i>1.14</i>	<i>0.90</i>	<i>1.34</i>
<i>QC-97</i>	<i>2.10</i>	<i>1.85</i>	<i>2.35</i>

7.5.5 PRECISIÓN

Se evalúa la precisión dentro de lotes y entre lotes.

7.5.5.1. PRECISIÓN DENTRO DE LOTES

Evalúa la repetibilidad del análisis bajo las mismas condiciones (en el mismo material, inmediatamente una seguida de otra, con el mismo equipo y en el mismo lugar)

Se determina la precisión en la determinación de nitritos y en la determinación conjunta de nitratos y nitritos en un mismo día.

a) Evaluación de la precisión dentro de lotes en la determinación de nitritos .

Para evaluar la precisión se trabaja con una muestra de control de 10 ug N-NO₂⁻ (0.5mg N-NO₂⁻), con los datos obtenidos para la evaluación de la exactitud (ver Tabla 7.30.), se calcula la desviación estándar y el promedio. Sd=0.007521 y P = 0.305.

Utilizando la ecuación 6.3 se calcula el coeficiente de variación igual a 2.468, y según la literatura este valor puede ser aceptado hasta el 8%, descritos en la relación empírica de Horwitz⁽²¹⁾ (Tabla 6.1, página 32)

b) Evaluación de la precisión dentro de lotes en la determinación conjunta de nitritos y nitratos.

Para evaluar la precisión se trabaja con un muestras control de concentración desconocida, QC-99, se trabaja en forma similar que en la evaluación de la exactitud (sección 7.5.4.2), obteniéndose los resultados de la Tabla 7.34.

TABLA 7.34. Determinación de la Precisión dentro del lote (muestra control QC-99)

Lote	Fecha	Concentración (mg/L)	D (Cm – Vv)
1	20/11/00	1.14	0.01
2	20/11/00	1.13	0.02
3	20/11/00	1.12	0.03
4	20/11/00	1.15	0.00
5	20/11/00	1.18	-0.03
6	20/11/00	1.19	-0.04
7	20/10/00	1.21	-0.06
8	20/11/00	1.14	0.01
9	20/11/00	1.15	0.00
10	20/11/00	1.12	0.03
11	20/11/00	1.13	0.02
12	20/11/00	1.17	-0.02
13	20/10/00	1.19	-0.04
14	20/11/00	1.19	-0.04
15	20/11/00	1.02	0.13
16	20/11/00	1.20	-0.05
17	20/11/00	1.10	0.05
18	20/11/00	1.13	0.02
19	20/11/00	1.11	0.04
20	20/11/00	1.14	0.01
Promedio		1.15	0.000
		Sed	0.0425
		C.V.	3.7090

Nota: D es la diferencia entre la concentración de la muestra (Cm) y el valor verdadero de la muestra control QC-99 (Vv)

7.5.5.2. PRECISIÓN ENTRE LOTES

Se analiza determinaciones de la misma muestra control pero en diferentes días, en este caso hay que tener en cuenta la estabilidad del analito. El nitrito es inestable y el nitrato es estable (ver el Anexo N 5), no se evalúa la precisión entre lotes para la determinación de nitritos.

a) **Evaluación de la precisión entre lotes en la determinación conjunta de nitritos y nitratos.**

Para evaluar la precisión se trabaja con una muestra control de concentración desconocida, QC-99, utilizando los datos obtenidos en la Tabla 7.35., se calcula la desviación estándar, el promedio y utilizando la ecuación 6.3. se calcula el coeficiente de variación igual a 4.2027. ver Tabla 7.35.

TABLA 7.35. Determinación de la Precisión entre lotes (muestra control QC-99)

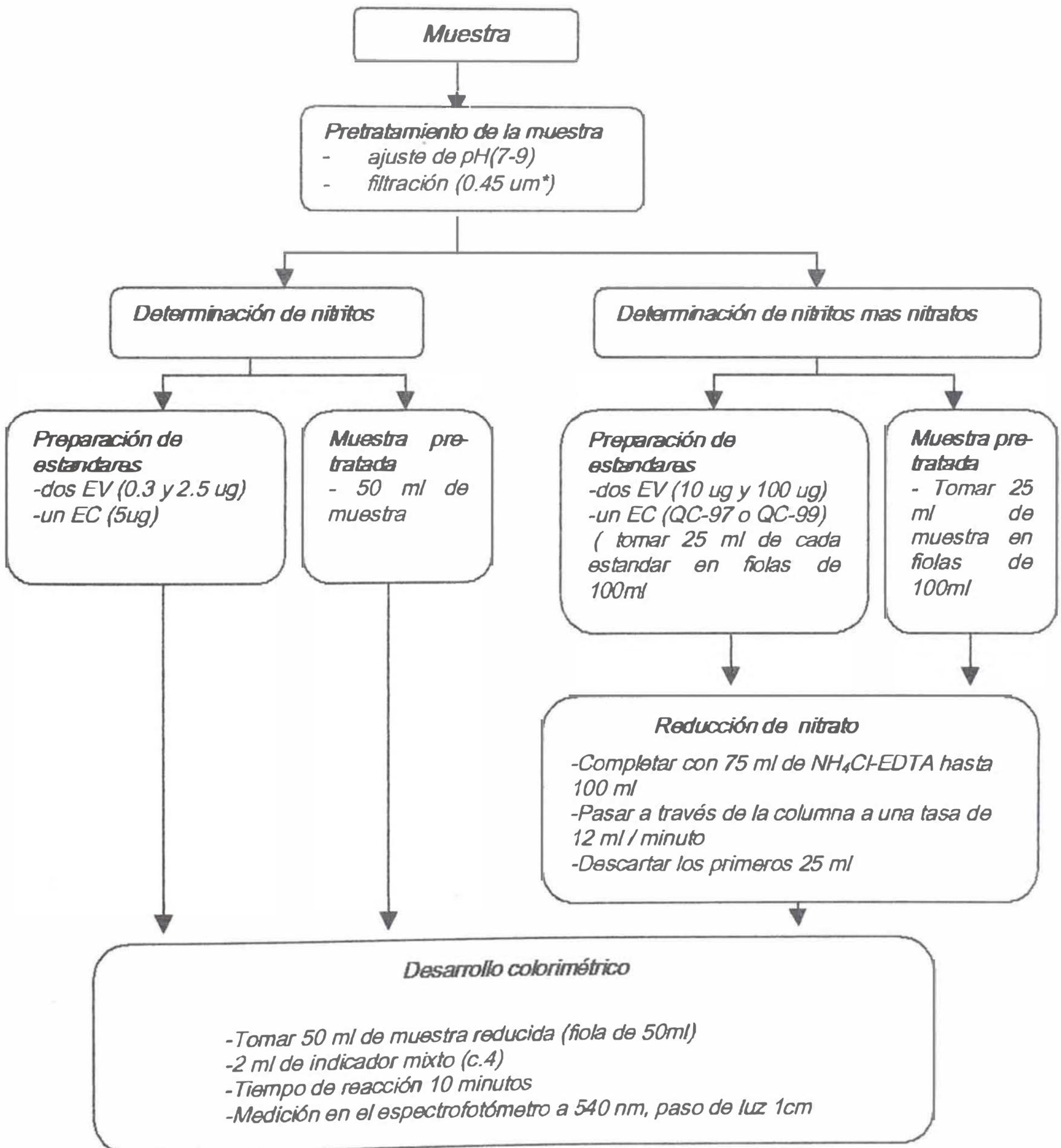
Lote	Fecha	Concentración (mg/l)	D (Cm – Vv)
1	10/10/00	1.24	-0.09
2	11/10/00	1.11	0.04
3	13/10/00	1.13	0.02
4	16/10/00	1.21	-0.06
5	17/10/00	1.18	-0.03
6	19/10/00	1.20	-0.05
7	20/10/00	1.19	-0.04
8	25/10/00	1.22	-0.07
9	26/10/00	1.21	-0.06
10	27/10/00	1.20	-0.05
11	31/10/00	1.13	0.02
12	6/11/00	1.16	-0.01
13	8/11/00	1.14	0.01
14	9/11/00	1.18	-0.03
15	10/11/00	1.21	-0.06
16	14/11/00	1.13	0.02
17	16/11/00	1.09	0.06
18	17/11/00	1.09	0.06
19	20/11/00	1.08	0.07
20	21/11/00	1.15	0.00
21	22/11/00	1.09	0.06
22	24/11/00	1.08	0.07
23	1/12/00	1.1	0.05
24	7/12/00	1.15	0.00
25	13/12/00	1.13	0.02
Promedio		1.15	0.0007
Sd			0.0484
C.V.			4.2027

7.6. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA LA VALIDACIÓN DE DATOS

7.6.1. Análisis de las Muestras

Después de la evaluación de los parámetros analíticos para la validación del método, se procede con el análisis de las muestras, con las cuales se toman en cuenta los parámetros analíticos para la validación de resultados: duplicados de las muestras, recuperación de una adición conocida, blancos analíticos y muestras control.

El resumen del procedimiento aplicado a la muestra se resume en el diagrama N° 1.



* um: micrómetros diámetro de poro

Diagrama N°1: Resumen del proceso seguido por la muestra

7.6.1.1. Pre-tratamiento de las muestras

- Si la muestra contiene sólidos suspendidos, se necesita filtrar a través de un filtro de membrana de 0,45 μm de diámetro de poro.
- Se ajusta el pH de la muestra entre 7 – 9 (se usa NaOH o HCl diluido).

7.6.1.2. Determinación de nitritos por el método espectrofotométrico

Los estándares de verificación de la curva de calibración, EV (Figura N° 7.7) de 0.5 y 5.0 $\mu\text{g N-NO}_2^-$ (se preparan a partir del mismo estándar que el de la curva de calibración), el estándar de control, EC para la verificación de la exactitud (se prepara a partir de un estándar diferente al usado para la curva).

La concentración de la muestra en mg N-NO_2^- se determina según la siguiente ecuación:

$$C_{m1} = \frac{W_{\text{NO}_2}}{V_m} \quad \text{Ecuación 7.3}$$

Donde:

C_{m1} = concentración de nitrito en la muestra en $\text{mg N-NO}_2^-/\text{l}$

W_{NO_2} = cantidad de N-NO_2^- derivada de la curva de calibración (Figura N° 7.7.) en μg

V_m = volumen de la muestra en ml.

Los resultados obtenidos para las muestras se resumen en la Tabla 7.36.

7.6.1.3 Determinación conjunta nitratos y nitritos por el método de reducción con cadmio

Los estándares de verificación, EV de la curva de calibración (Figura N°7.10) de 2.5 y 25 $\mu\text{g N-NO}_2^-$ (se preparan a partir del mismo estándar de la curva de calibración), el estándar de control, EC para la verificación de la exactitud (se prepara a partir de una muestra control QC-97 ó QC-99). La concentración de la muestra en $\text{mg N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$ se determina según la siguiente ecuación:

$$C_{m2} = \frac{W}{V_m} \quad \text{Ecuación 7.4}$$

Donde:

C_{m2} = concentración conjunta nitrato y nitrito en la muestra en $\text{mg N-NO}_3^- + \text{NO}_2^-/\text{l}$

W = cantidad de N-NO_3^- derivada de la curva de calibración (Figura N°7.10) en μg

V_m = volumen de la muestra en ml.

La concentración de nitratos en la muestra ($\text{mg N-NO}_3^-/\text{l}$) se obtiene restando la concentración de nitritos de la cantidad de nitratos y nitritos. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 7.37.

7.6.1.4 Resultados Obtenidos

Los resultados de nitritos se muestran en la Tabla 7.36. y de los nitratos en la Tabla 7.37.

TABLA 7.36. Resultados de la concentración de Nitrito en las muestras

Muestra	Fecha de muestreo	Fecha de analisis	Vm	Concentración ($\mu\text{g N-NO}_2^-$)	Concentración ($\text{mg N-NO}_2^-/\text{l}$)
Punto 1	26/10/00	26/10/00	50	0.353	0.007
Punto 2	26/10/00	26/10/00	50	0.176	0.004
Punto 3	26/10/00	26/10/00	50	0.000	<0.0010
Punto 3-d	26/10/00	26/10/00	50	0.000	<0.0010
Punto 4	26/10/00	26/10/00	50	1.430	0.029
Punto 5	27/10/00	27/10/00	50	2.628	0.053
Punto 5-d	27/10/00	27/10/00	50	2.546	0.051
Punto 6	27/10/00	27/10/00	50	2.170	0.043
Punto 6-d	27/10/00	27/10/00	50	2.128	0.043
Punto 7	30/10/00	31/10/00	50	0.013	<0.0010
Punto 8	30/10/00	31/10/00	50	1.249	0.025
Punto 9	30/10/00	31/10/00	50	1.098	0.022
Punto 10	30/10/00	31/10/00	50	0.697	0.014
Punto 10-d	30/10/00	31/10/00	50	0.657	0.013
Punto 1	04/03/01	05/03/01	50	0.323	0.006
Punto 2	04/03/01	05/03/01	50	0.153	0.003
Punto 3	04/03/01	05/03/01	50	0.045	0.001
Punto 4	05/03/01	05/03/01	50	1.323	0.026
Punto 4-d	05/03/01	05/03/01	50	1.312	0.026
Punto 5	05/03/01	05/03/01	50	2.352	0.047
Punto 6	05/03/01	05/03/01	50	0.637	0.013
Punto 7	05/03/01	05/03/01	50	0.020	<0.0010
Punto 8	27/02/01	28/02/01	50	0.277	0.006
Punto 8-d	27/02/01	28/02/01	50	0.267	0.005
Punto 9	27/02/01	28/02/01	50	0.899	0.018
Punto 10	27/02/01	28/02/01	50	0.714	0.014

TABLA 7.37. Resultados de la concentración de nitrato en la muestra como N-NO₃⁻

<i>Muestra</i>	<i>Fecha de muestreo</i>	<i>Fecha de análisis</i>	<i>Vm (ml)</i>	<i>Concentración (ug N-NO₃⁻ + N-NO₂⁻)</i>	<i>Concentración (mg N-NO₃⁻ + N-NO₂⁻/l)</i>	<i>Concentración (mg N-NO₃⁻/l)</i>
<i>Punto 1</i>	<i>26/10/00</i>	<i>26/10/00</i>	<i>25</i>	<i>0.474</i>	<i>0.019</i>	<i>0.012</i>
<i>Punto 2</i>	<i>26/10/00</i>	<i>26/10/00</i>	<i>25</i>	<i>0.913</i>	<i>0.037</i>	<i>0.033</i>
<i>Punto 3</i>	<i>26/10/00</i>	<i>26/10/00</i>	<i>25</i>	<i>6.868</i>	<i>0.275</i>	<i>0.275</i>
<i>Punto 4</i>	<i>26/10/00</i>	<i>26/10/00</i>	<i>25</i>	<i>12.283</i>	<i>0.491</i>	<i>0.463</i>
<i>Punto 4-d</i>	<i>26/10/00</i>	<i>26/10/00</i>	<i>25</i>	<i>12.330</i>	<i>0.493</i>	<i>0.465</i>
<i>Punto 5</i>	<i>27/10/00</i>	<i>27/10/00</i>	<i>25</i>	<i>8.632</i>	<i>0.345</i>	<i>0.294</i>
<i>Punto 6</i>	<i>27/10/00</i>	<i>27/10/00</i>	<i>25</i>	<i>8.180</i>	<i>0.327</i>	<i>0.284</i>
<i>Punto 6-d</i>	<i>27/10/00</i>	<i>27/10/00</i>	<i>25</i>	<i>8.080</i>	<i>0.323</i>	<i>0.280</i>
<i>Punto 7</i>	<i>27/10/00</i>	<i>27/10/00</i>	<i>5</i>	<i>21.927</i>	<i>4.385</i>	<i>4.385</i>
<i>Punto 8</i>	<i>30/10/00</i>	<i>31/10/00</i>	<i>25</i>	<i>16.718</i>	<i>0.669</i>	<i>0.644</i>
<i>Punto 8-d</i>	<i>30/10/00</i>	<i>31/10/00</i>	<i>25</i>	<i>16.522</i>	<i>0.661</i>	<i>0.636</i>
<i>Punto 9</i>	<i>30/10/00</i>	<i>31/10/00</i>	<i>25</i>	<i>12.500</i>	<i>0.500</i>	<i>0.478</i>
<i>Punto 10</i>	<i>30/10/00</i>	<i>31/10/00</i>	<i>25</i>	<i>15.020</i>	<i>0.601</i>	<i>0.587</i>
<i>Punto 1</i>	<i>04/03/01</i>	<i>06/03/01</i>	<i>25</i>	<i>0.419</i>	<i>0.017</i>	<i>0.010</i>
<i>Punto 2</i>	<i>04/03/01</i>	<i>06/03/01</i>	<i>25</i>	<i>0.844</i>	<i>0.034</i>	<i>0.031</i>
<i>Punto 3</i>	<i>04/03/01</i>	<i>06/03/01</i>	<i>10</i>	<i>16.979</i>	<i>1.698</i>	<i>1.697</i>
<i>Punto 4</i>	<i>05/03/01</i>	<i>06/03/01</i>	<i>10</i>	<i>3.843</i>	<i>0.384</i>	<i>0.358</i>
<i>Punto 5</i>	<i>05/03/01</i>	<i>06/03/01</i>	<i>25</i>	<i>5.501</i>	<i>0.220</i>	<i>0.173</i>
<i>Punto 6</i>	<i>05/03/01</i>	<i>06/03/01</i>	<i>10</i>	<i>12.020</i>	<i>1.202</i>	<i>1.189</i>
<i>Punto 6-d</i>	<i>05/03/01</i>	<i>06/03/01</i>	<i>10</i>	<i>11.990</i>	<i>1.199</i>	<i>1.186</i>
<i>Punto 7</i>	<i>05/03/01</i>	<i>06/03/01</i>	<i>2</i>	<i>20.255</i>	<i>10.128</i>	<i>10.127</i>
<i>Punto 8</i>	<i>27/02/01</i>	<i>28/02/01</i>	<i>10</i>	<i>14.720</i>	<i>1.472</i>	<i>1.467</i>
<i>Punto 8-d</i>	<i>27/02/01</i>	<i>28/02/01</i>	<i>10</i>	<i>14.831</i>	<i>1.483</i>	<i>1.478</i>
<i>Punto 9</i>	<i>27/02/01</i>	<i>28/02/01</i>	<i>10</i>	<i>8.965</i>	<i>0.897</i>	<i>0.879</i>
<i>Punto 10</i>	<i>27/02/01</i>	<i>28/02/01</i>	<i>25</i>	<i>19.695</i>	<i>0.788</i>	<i>0.774</i>

7.6.2. Duplicados de las muestras

Las muestras duplicadas son seleccionadas al azar y con un mínimo de 20% por lote de muestras (aproximadamente después de cada 6 muestras).

Se determina la concentración de los duplicados de las muestras siguiendo el mismo procedimiento descrito para la determinación conjunta de nitratos y nitritos. (Ver Diagrama N°1).

Para evaluar la precisión de los duplicados de la muestra se trabaja con la diferencia del porcentaje relativo (%RPD). Calculada a partir de la ecuación 6.10:

En las Tablas 7.38 y la Tabla 7.39, se resumen los duplicados realizados a las muestras para la determinación de nitritos y de nitratos con nitritos respectivamente.

TABLA 7.38. Duplicados de las muestras para la determinación de nitrito

Muestra	Fecha	Concentración 1 (mg/L)	Concentración 2 (mg/L)	RPD (%)
Punto 3	26/10/00	<0.0010	<0.0010	-
Punto 5	27/10/00	0.053	0.051	3.170
Punto 6	27/10/00	0.043	0.043	1.936
Punto 10	31/10/00	0.014	0.013	5.908
Punto 4	05/03/01	0.026	0.026	0.835
Punto 8	28/02/01	0.006	0.005	3.532

TABLA 7.39. Duplicados de las muestras para la determinación conjunta de nitrito y nitrato

Muestra	Fecha	Concentración 1 (mg/L)	Concentración 2 (mg/L)	RPD (%)
Punto 4	26/10/00	0.491	0.493	0.382
Punto 6	27/10/00	0.327	0.323	1.230
Punto 8	31/10/00	0.669	0.661	1.179
Punto 6	06/03/01	1.202	1.199	0.250
Punto 8	28/02/01	1.472	1.483	0.751

7.6.3. Recuperación de una adición conocida

Este procedimiento se realiza con la finalidad de establecer si existen interferencias en la matriz (considerados como errores sistemáticos), además de informar si el método es capaz de determinar todo el analito de interés en la matriz elegida⁽¹⁶⁾.

Se evalúa la recuperación de una adición conocida en el denominado período preliminar antes de la ejecución de las muestras durante un período de 20 días. En las Tablas 7.40. y 7.41. se tiene los resultados de nitritos y de nitratos con nitritos respectivamente.

En las Tablas 7.42 y la Tabla 7.43, se resumen las recuperaciones realizados a las muestras para la determinación de nitritos y de nitratos con nitritos respectivamente .

TABLA 7.40 *Recuperación de una adición conocida en la determinación de nitrito (período preliminar)*

Muestra	Fecha	Concentración muestra (mg/l)	Concentración adicionada (mg/l)	Concentración encontrada(mg/l)	%RR
1	10/10/00	<0.0010	0.024	0.024	99.83
2	11/10/00	0.0077	0.022	0.028	89.67
3	13/10/00	0.0017	0.024	0.024	93.22
4	16/10/00	<0.0010	0.009	0.009	94.67
5	17/10/00	0.0014	0.009	0.009	83.25
6	19/10/00	0.0011	0.009	0.009	87.61
7	20/10/00	0.0043	0.022	0.026	97.34
8	25/10/00	0.0014	0.023	0.023	93.69
9	26/10/00	<0.0010	0.009	0.009	89.34
10	27/10/00	<0.0010	0.006	0.006	105.83
11	31/10/00	0.0009	0.010	0.011	102.60
12	6/11/00	0.0028	0.022	0.025	100.99
13	8/11/00	0.0059	0.022	0.028	100.42
14	9/11/00	0.0063	0.006	0.012	104.92
15	10/11/00	0.0039	0.022	0.026	101.23
16	14/11/00	<0.0010	0.006	0.0058	91.90
17	16/11/00	<0.0010	0.006	0.006	100.26
18	17/11/00	<0.0010	0.006	0.006	92.80
19	20/11/00	<0.0010	0.006	0.006	94.69
20	21/11/00	<0.0010	0.006	0.006	96.06
Promedio					96.017
Desviación estándar Sd					5.862

TABLA 7.41 Recuperación de una adición conocida en la determinación de nitrato con nitrito (período preliminar)

Muestra	Fecha	Concentración muestra (mg/L)	Concentración adicionada (mg/L)	Concentración encontrada(mg/l)	%RR
1	17/10/00	0.047	2.500	2.476	97.16
2	19/10/00	0.000	2.500	2.265	90.60
3	20/10/00	0.071	2.500	2.336	90.60
4	25/10/00	0.019	2.500	2.558	101.56
5	26/10/00	0.017	2.500	2.536	100.76
6	27/10/00	0.004	2.500	2.647	105.71
7	31/10/00	0.037	2.500	2.725	107.53
8	6/11/00	0.026	2.500	2.599	102.94
9	8/11/00	0.031	2.500	2.500	98.76
10	9/11/00	0.011	2.500	2.503	99.69
11	10/11/00	0.015	2.500	2.504	99.57
12	14/11/00	0.026	2.500	2.889	114.52
13	16/11/00	0.015	2.500	2.621	104.26
14	17/11/00	0.085	2.500	2.586	100.03
15	20/11/00	0.005	2.500	2.563	102.30
16	21/11/00	0.003	2.500	2.273	90.78
17	22/11/00	0.013	2.500	2.483	98.80
18	24/11/00	0.014	2.500	2.434	96.80
19	1/12/00	0.007	2.500	2.443	97.44
20	7/12/00	0.020	2.500	2.539	100.75
Promedio					100.028
Desviación estándar Sd					5.593

TABLA 7.42. Recuperación de una adición conocida en las muestras para la determinación de nitrito

Código de muestra	Fecha	Concentración muestra (mg/L)	Concentración adicionada (mg/L)	Concentración encontrada(mg/l)	%RR
Punto 3	26/10/00	<0.0010	0.0060	0.0064	106.00
Punto 7	31/10/00	<0.0010	0.0060	0.0058	96.92
Punto 3	05/03/01	0.0010	0.0060	0.0060	84.13
Punto 7	05/03/01	<0.0010	0.0060	0.0057	94.97
Punto 8	28/02/01	0.0055	0.0060	0.0111	94.00

TABLA 7.43. Recuperación de una adición conocida en las muestras para la determinación de nitrito con nitrato

Código de muestra	Fecha	Concentración muestra (mg/l)	Concentración adicionada (mg/l)	Concentración encontrada(mg/l)	%RR
Punto1	26/10/00	0.012	2.500	2.412	96.03
Punto 5	27/10/00	0.294	2.500	2.805	100.44
Punto 1	06/03/01	0.010	2.500	2.531	100.84
Punto 6	06/03/01	1.188	2.500	3.659	98.84
Punto 10	28/02/01	0.774	2.500	3.269	99.80

7.6.4. Blancos Analíticos

Los resultados se muestra en las Tabla 7.44 y la Tabla 7.45. para la determinación de nitritos y de nitratos con nitritos respectivamente .

TABLA 7.44. Blancos analíticos para la determinación de nitrito

Muestra	Fecha	Absorbancia	Concentración (ug/L)	LDM (ug/L)
1	26/10/00	0.0005	0.22	0.78
2	27/10/00	0.0004	0.18	0.78
3	31/10/00	0.0015	0.62	0.78
4	05/03/01	0.0003	0.12	0.78
5	28/02/01	0.0005	0.22	0.78

TABLA 7.45. Blancos analíticos para la determinación de nitrito con nitrato

Muestra	Fecha	Absorbancia	Concentración (mg/L)	LDM (mg/L)
1	26/10/00	0.024	0.011	0.032
2	27/10/00	0.017	0.008	0.032
3	31/10/00	0.045	0.020	0.032
4	06/03/01	0.022	0.010	0.032
5	06/03/01	0.035	0.016	0.032
6	28/02/01	0.022	0.010	0.032

7.6.5. Muestras de Control

Los Resultados de las muestras control evaluados conjuntamente con las muestras se resume en las Tabla 7.46. para la determinación de nitritos y en la Tabla 7.47. para la determinación de nitritos con nitratos.

TABLA 7.46. Muestra control para la determinación de nitrito

<i>Muestra</i>	<i>Fecha</i>	<i>Concentración (ug/10ml)</i>	<i>Concentración (mg/l)</i>	<i>(%E)</i>
1	26/10/00	3.0186	0.3019	99.31
2	27/10/00	2.9759	0.2976	97.80
3	31/10/00	3.0227	0.3023	99.44
4	05/03/01	3.0839	0.3084	101.45
5	28/02/01	3.0379	0.3038	99.93

TABLA 7.47. Muestra control para la determinación de nitrito con nitrato

<i>Muestra</i>	<i>Fecha</i>	<i>Concentración (ug/20ml)</i>	<i>Concentración (mg/l)</i>	<i>(%E)</i>
1	26/10/00	22.97	1.15	100.75
2	27/10/00	22.48	1.12	98.60
3	31/10/00	23.95	1.20	105.04
4	06/03/01	23.64	1.18	103.68
5	06/03/01	22.97	1.15	100.75
6	28/02/01	22.16	1.11	97.19

7.7. ELABORACIÓN DE CARTAS DE CONTROL Y VERIFICACIÓN DE DATOS

7.7.1 CARTA DE CONTROL X (CARTA DE EXACTITUD)

La carta de exactitud se construye a partir de los datos de las muestras de control evaluadas en el periodo preliminar en la Sección 7.5.4, para la determinación de nitrito se usa los datos de la Tabla 7.30. y para la verificación de los resultados de la muestra control durante el análisis de las muestras se usa la Tabla 7.46. (ver Figura N°7.13.) y la carta de control de precisión para la determinación de nitritos y nitratos se usa los datos de la Tabla 7.32. y para la verificación de los datos obtenidos durante el análisis se usa la Tabla 7.47. (ver Figura N°7.14.)

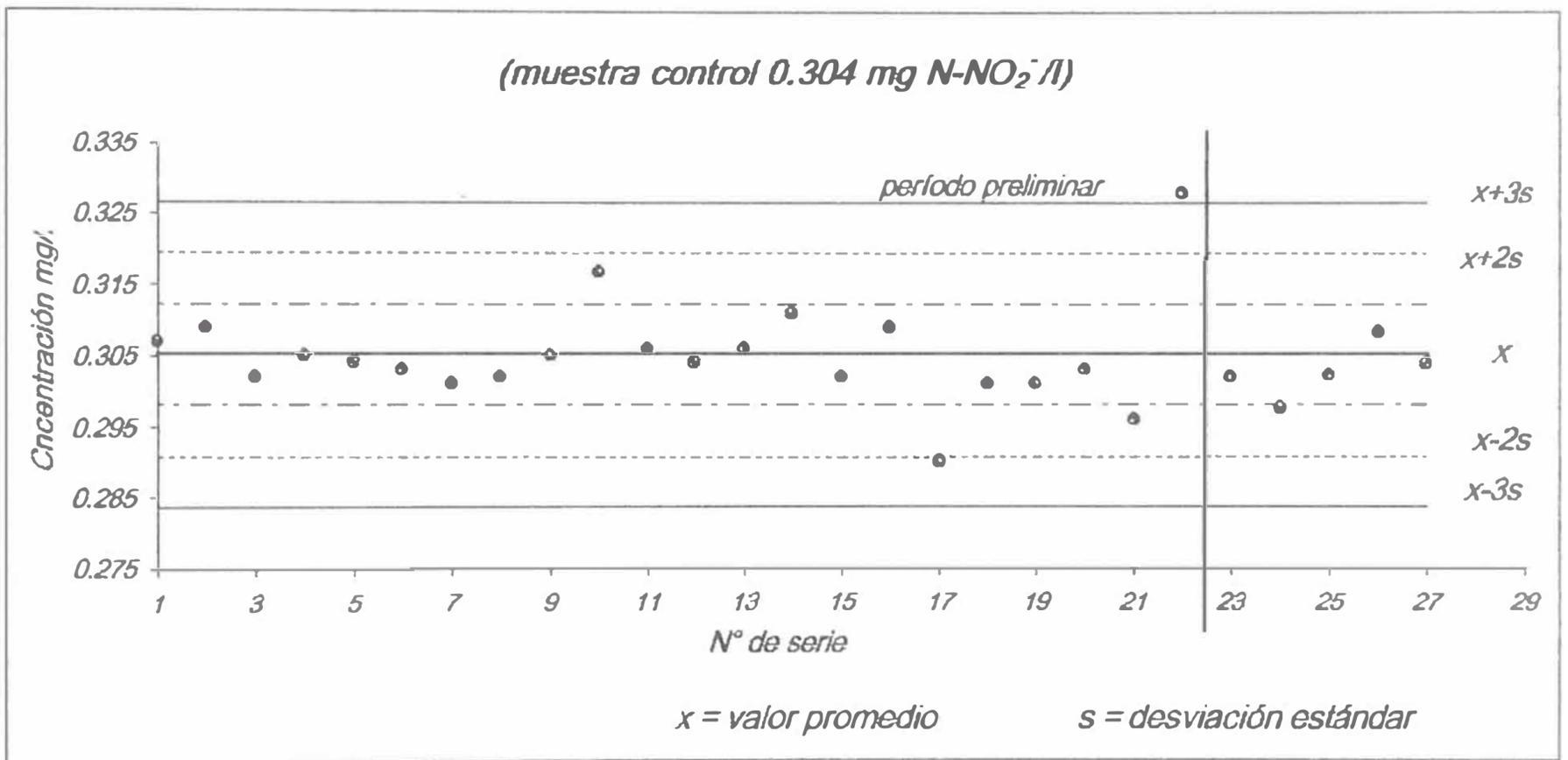


Figura N°7.13. Carta de Control de Exactitud de Nitritos

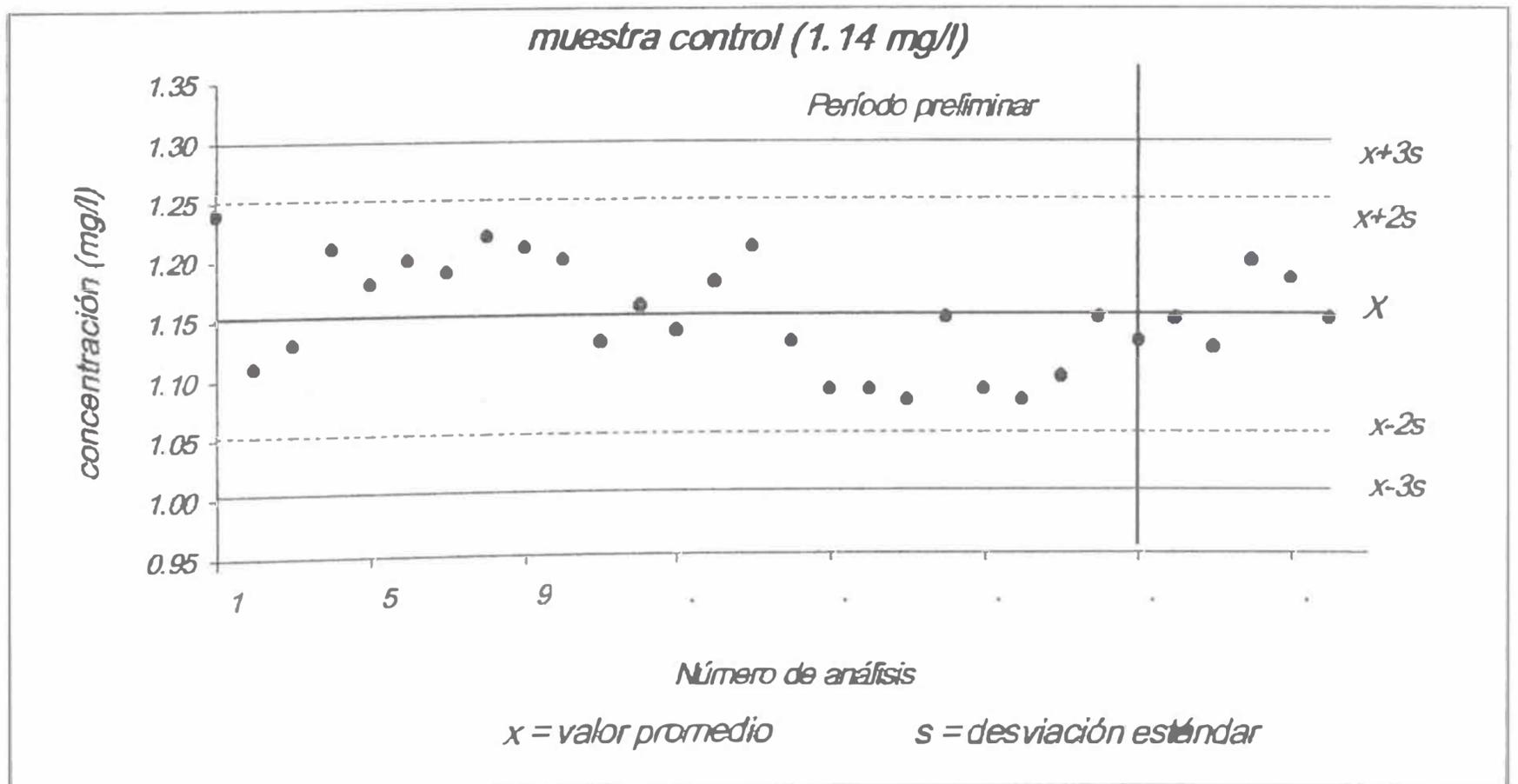


Figura N°7.14. Carta de Control de Exactitud de nitratos y nitritos

7.7.2 CARTA DE CONTROL DE VALORES BLANCOS

Las cartas de control de valores blancos se construye a partir de los datos obtenidos en la Sección 7.5.2. (que denominaremos como periodo preliminar).

En la Figura N°7.15. se muestra la carta de control de valores blancos para la determinación de nitritos (se utiliza los datos de las Tablas 7.20 y 7.44.)

En la Figura N°7.16 se muestra la carta de control de valores blancos para la determinación de nitritos con nitratos (se utiliza los datos de las Tablas 7.21 y 7.45)

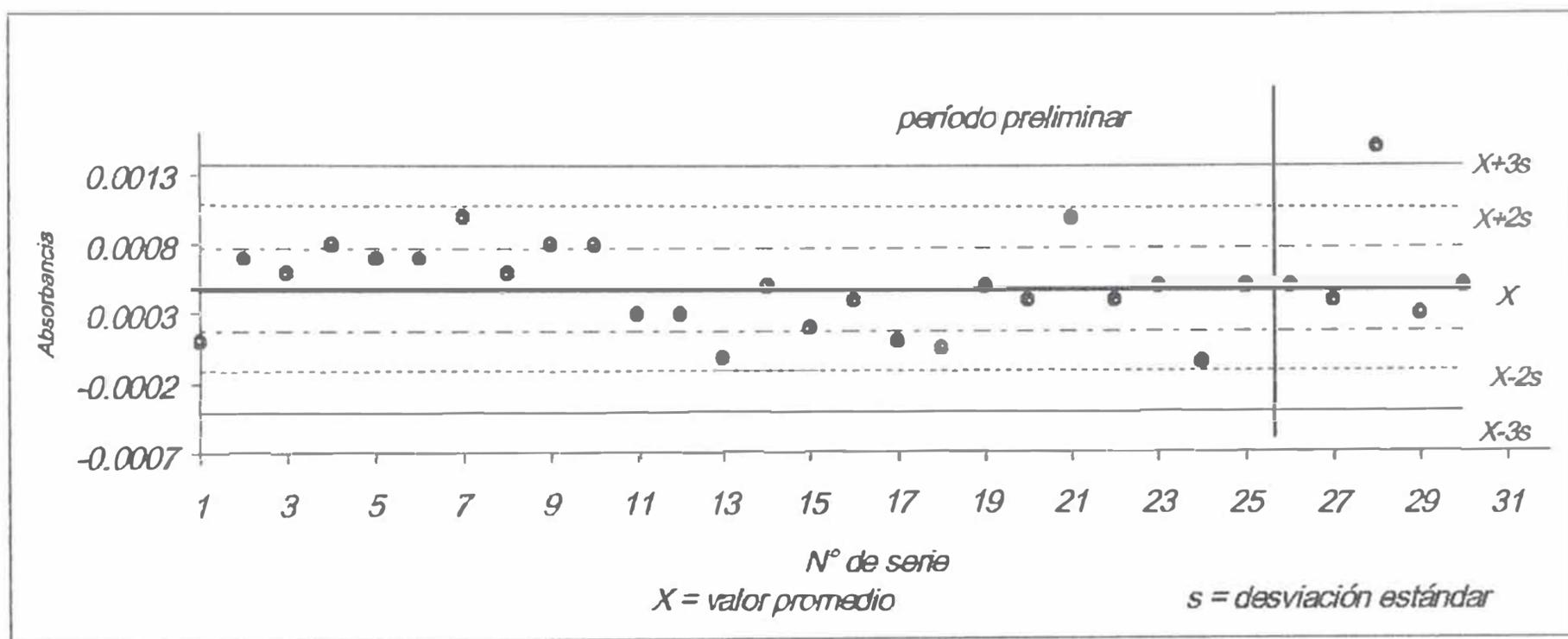


Figura N°7.15.- Carta de Control de blancos de nitritos

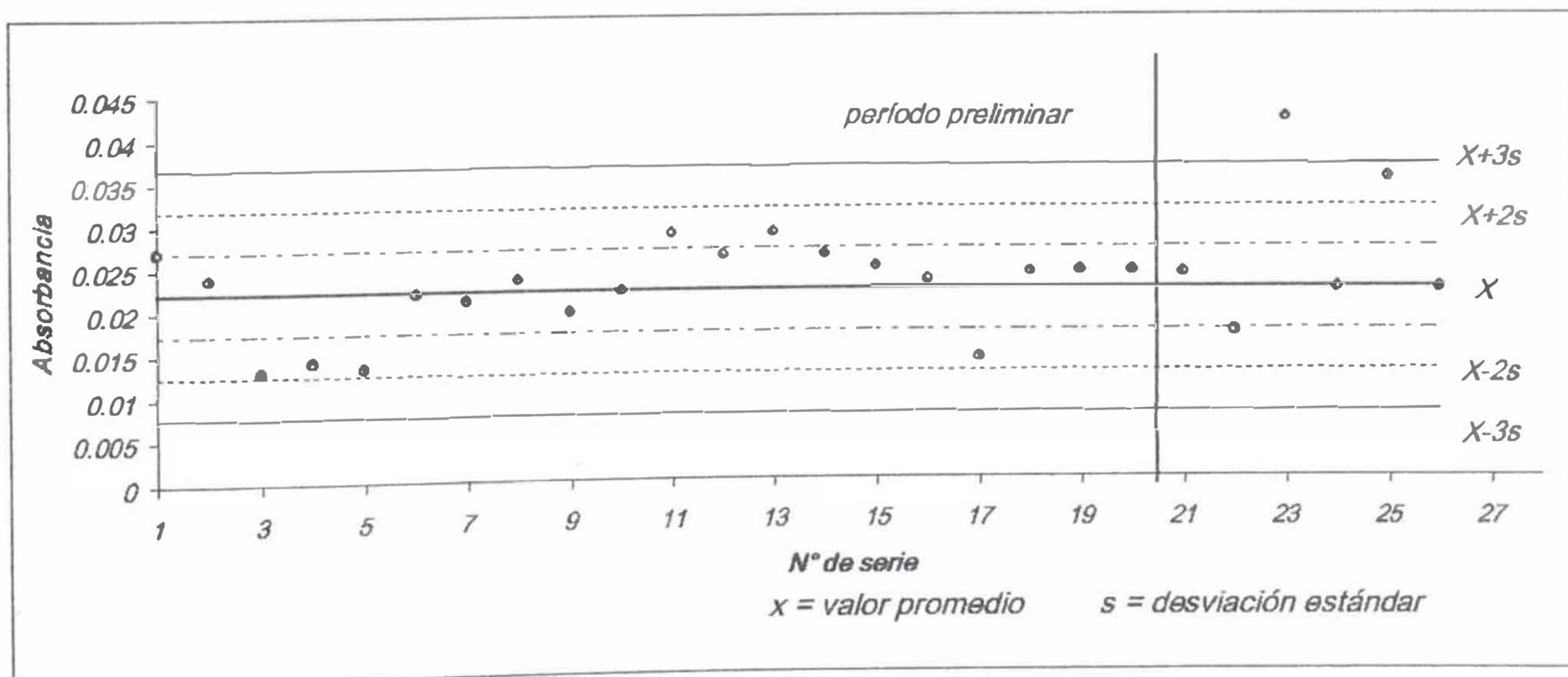


Figura N°7.16.- Carta de control de blancos de nitratos con nitritos

7.7.3. CARTA DE CONTROL DE PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN (RR)

Las cartas control del porcentaje de recuperación (cartas de control RR), se construyen a partir de los datos de las Tablas 7.40. y 7.42. para la determinación de nitritos (Figura N°7.17) y de las Tablas 7.41. y 7.43. (Figura N°7.18) para la determinación de nitritos con nitratos.

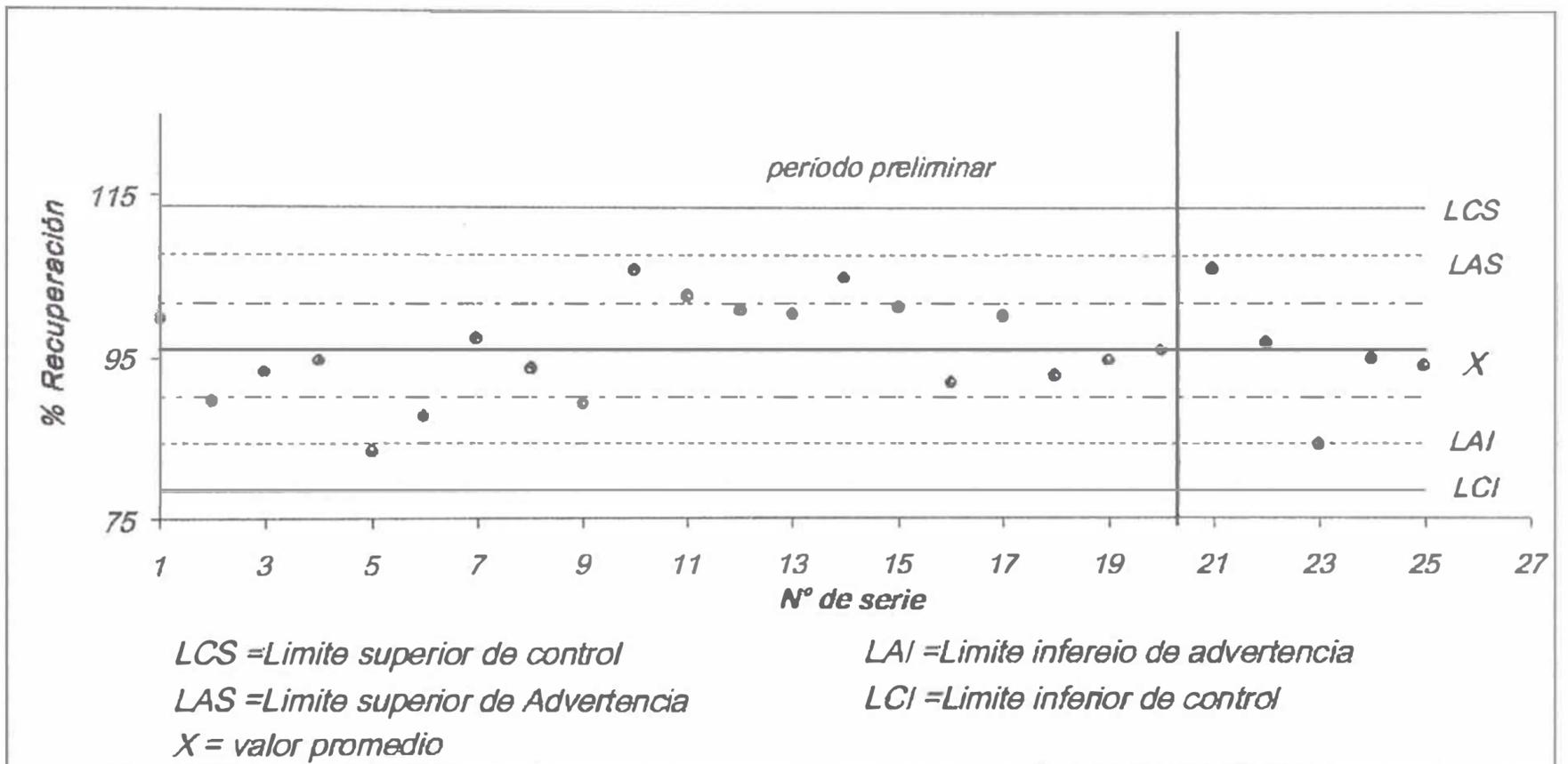


Figura N°7.17. Carta de control RR para la determinación de nitrito

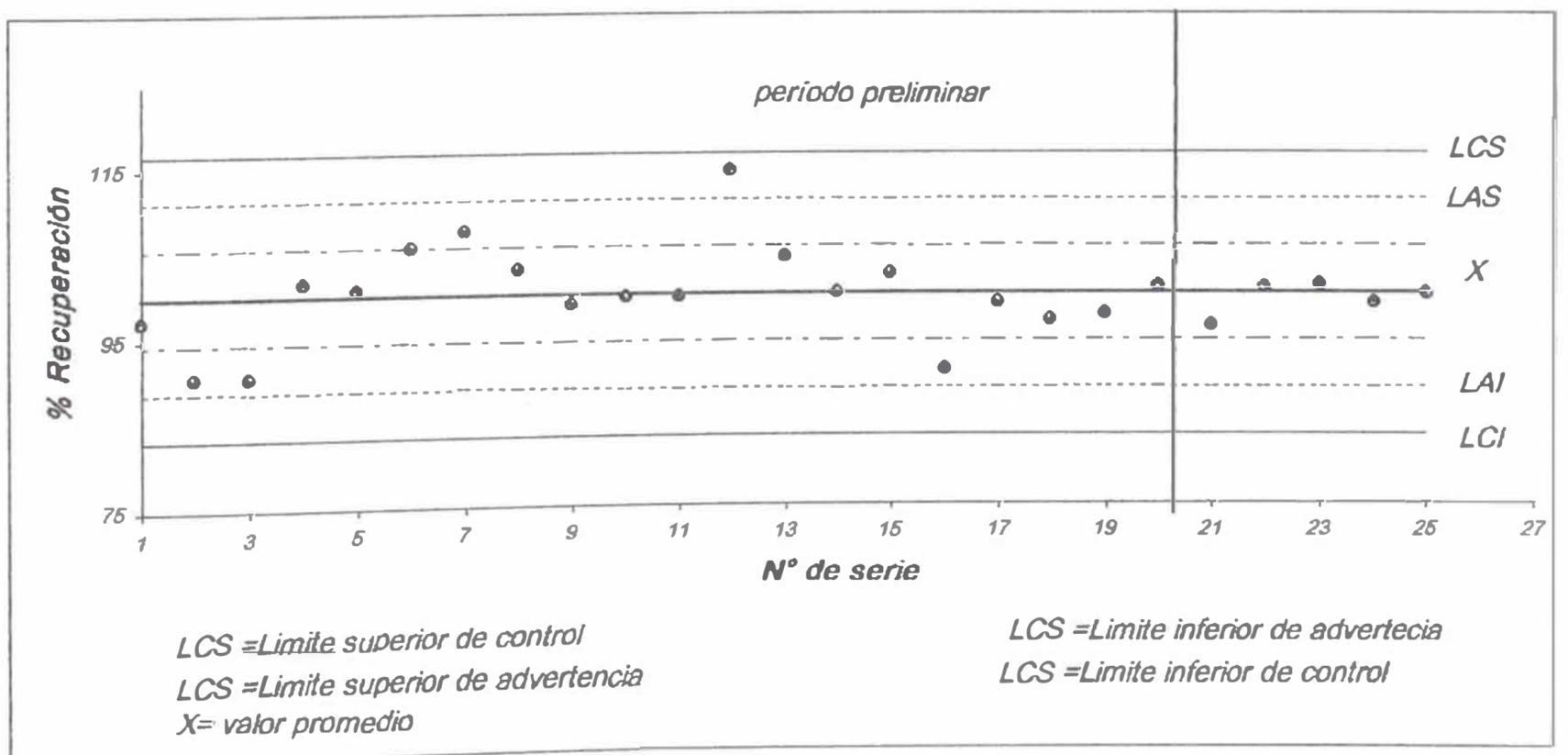


Figura N°7.18. Carta de control RR para la determinación de nitrato con nitrito

7.7.4 CARTAS DE CONTROL DE RANGO (PRECISIÓN)

Se construyen las cartas de control de Rango para la evaluación de la precisión, en base a un estándar de nitrito evaluado por duplicado en cada lote (día) (Tabla 4 del Anexo N°6) y del estándar de nitrato evaluado en la misma forma (Tabla 5 del Anexo N°6).

En la Figura 7.19. se muestra la carta control de rango para la determinación de nitritos con duplicados de las muestras (Datos de la Tabla 7.38.) y para nitratos en la Figura 7.20. (Datos de la Tabla 7.39).

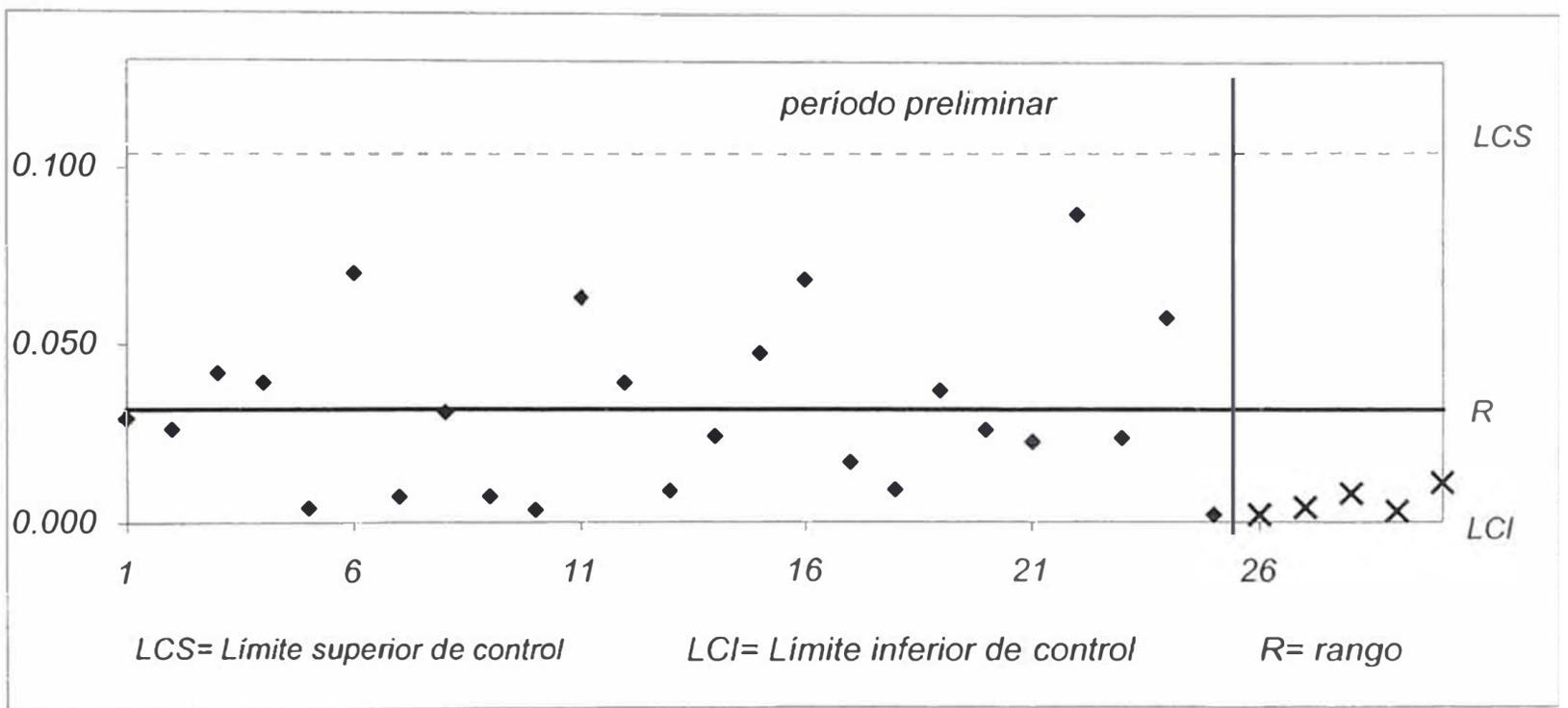


Figura N°7.19. Carta de control de precisión para los duplicados de las muestras en la determinación de nitritos

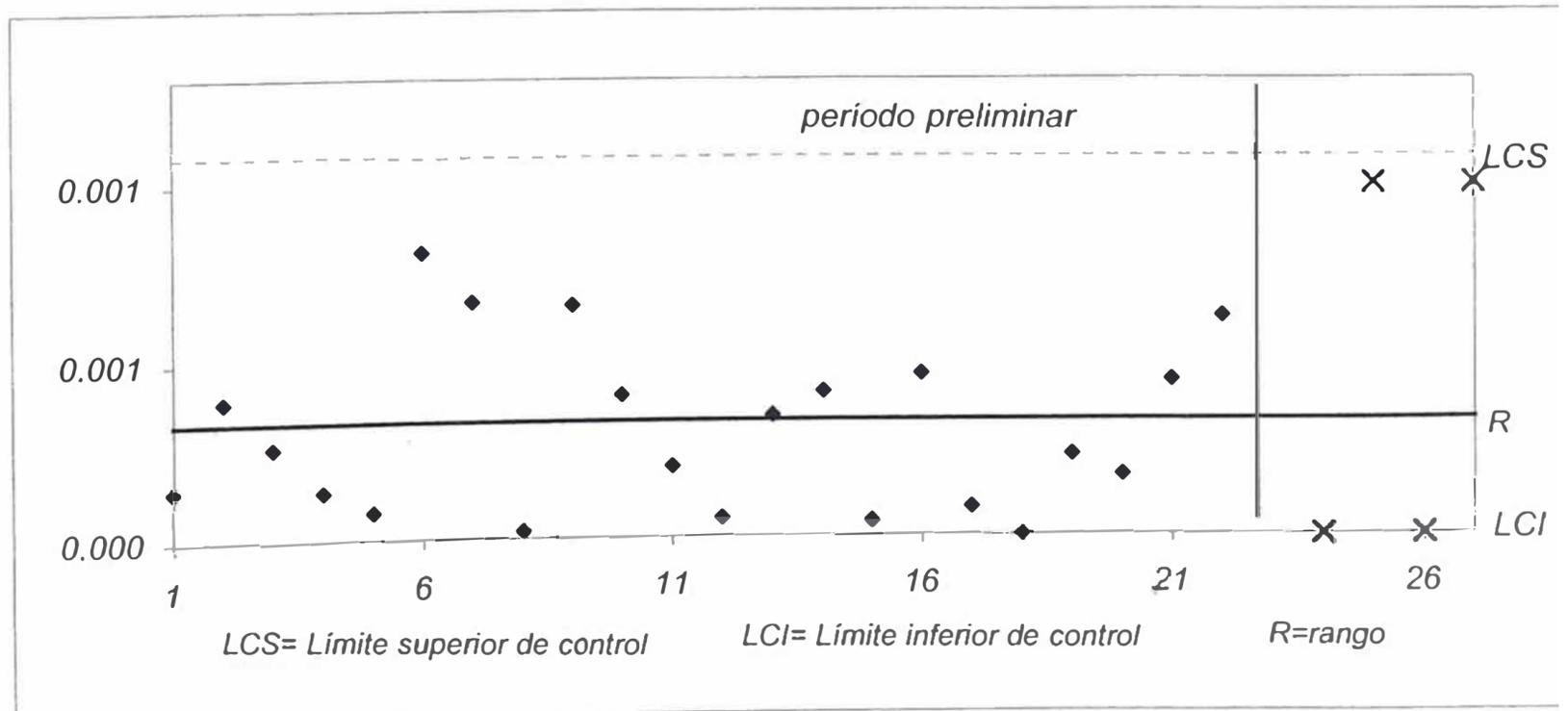


Figura N°7.20. Carta de control de la Precisión para los duplicados de las muestras en la determinación de nitratos

7.7.5. CARTA DE CONTROL CUSUM (MUESTRAS DE CONTROL)

La carta de control cusum se construyen a partir de los datos de las muestras de control evaluadas en el periodo preliminar (Sección 7.5.4), En la carta de control cusum para la determinación de nitritos se usa los datos de la Tabla 7.30. (ver Figura N°21)y la carta de control de cusum para la determinación de nitritos con nitratos se usa los datos de la Tabla 7.32. (ver Figura N°7.22)

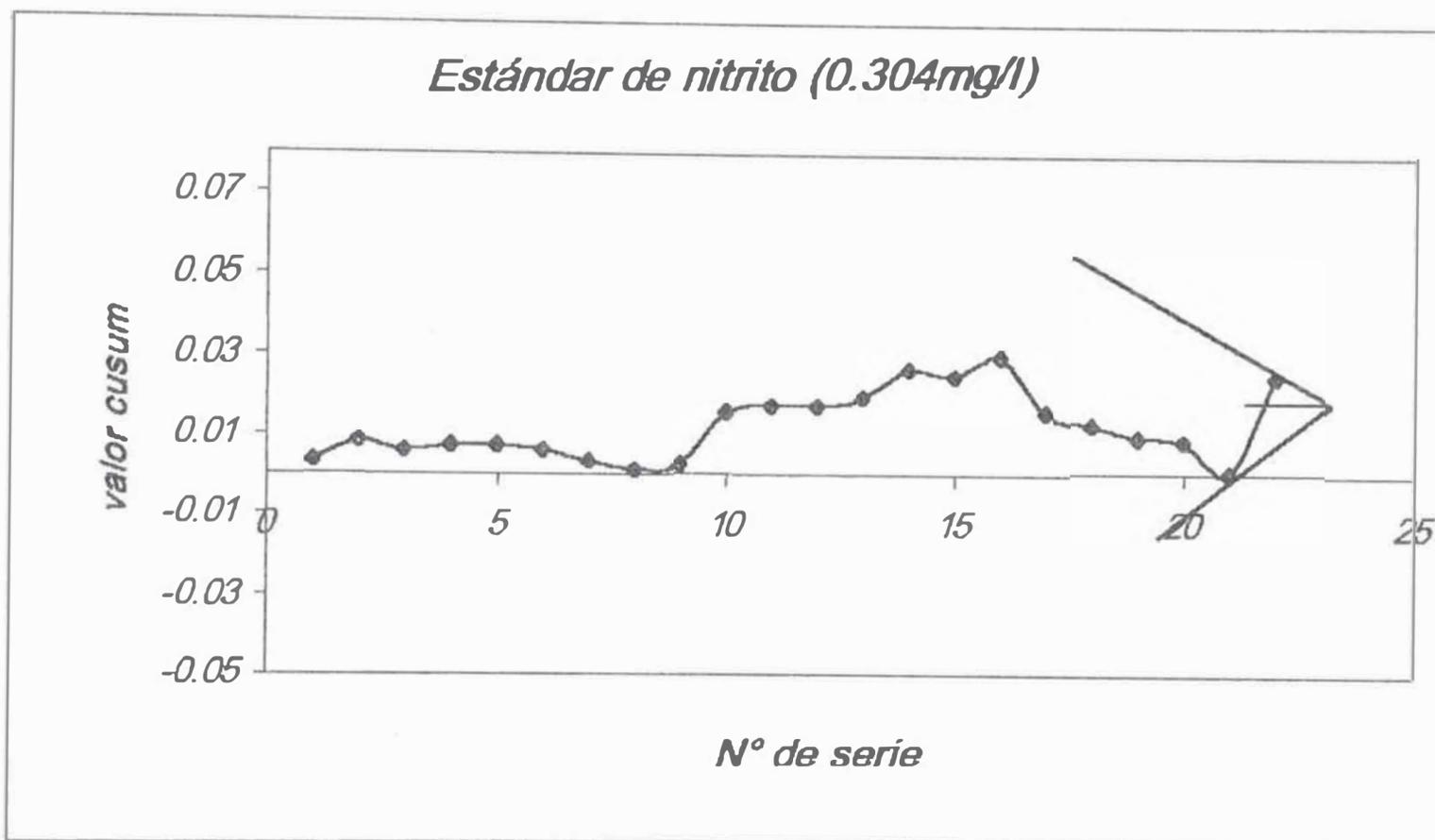


Figura N°7.21 Carta de control cusum para un estándar de nitrito

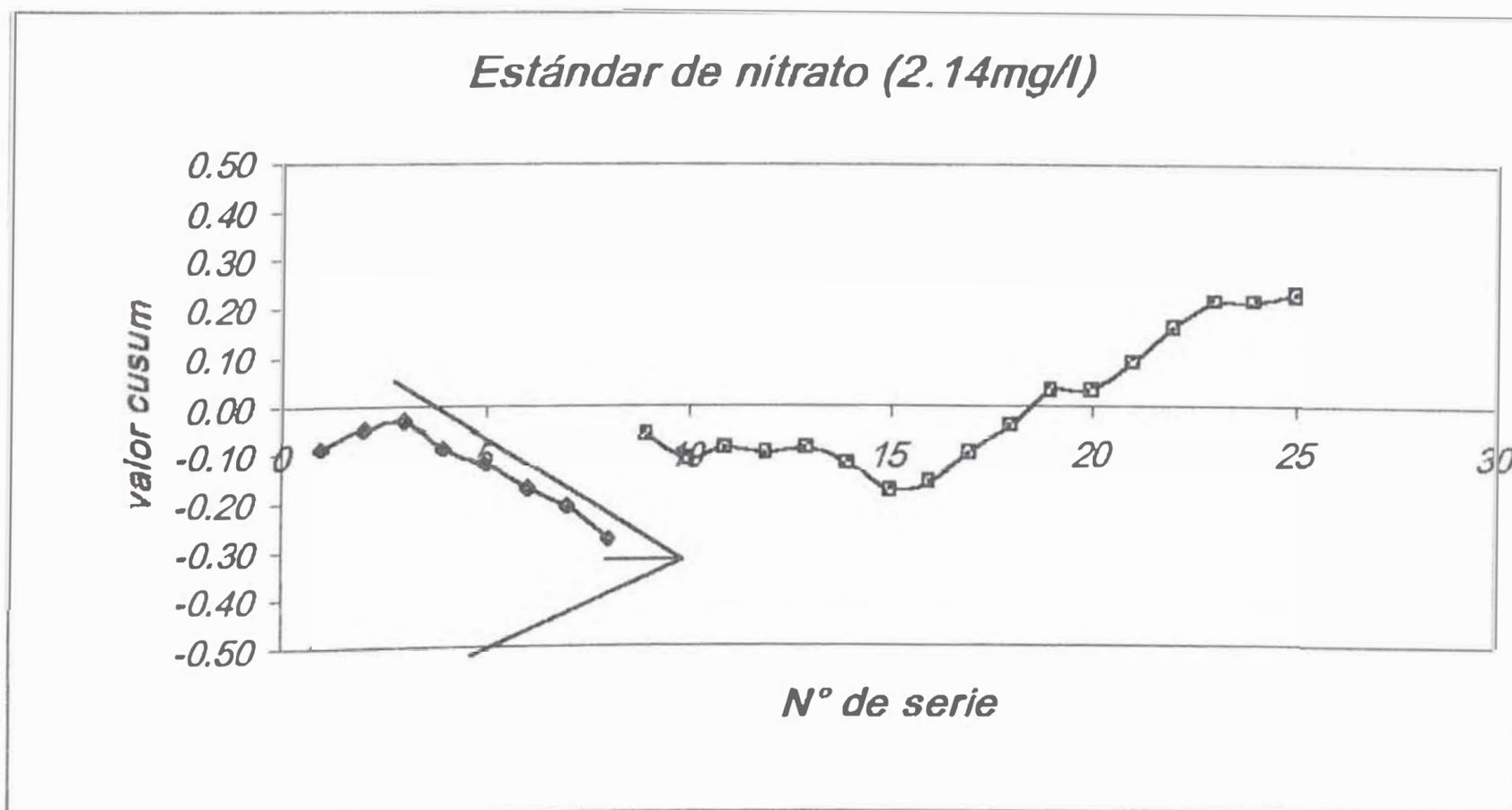


Figura N°7.22. Carta de control cusum para un estándar de nitrato

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA EL MÉTODO DE REDUCCIÓN CON CADMIO :

A. Del Tamaño de partículas de cadmio

Se evalúa estándares de nitrato con diferente tamaño de partículas de cadmio. En la literatura se menciona un rango de tamaño de partículas con mallas 20-100 y de 50-100.

Para esta prueba se utiliza cadmio de la siguiente granulometría:

	Granulometría	malla
Cadmio	0.3 a 0.8mm	20-50
Cadmio	0.3 a 1.6 mm	20-100
Cadmio	3-6 mm	-

Los resultados de las eficiencias de las tres columnas construidas a partir de las tres granulometrías de cadmio se muestran en el Anexo N°6. De estos resultados se tiene que las partículas cadmio de granulometría de 0.3 a 1.6 y de 0.3 a 0.8 mm, ambas son eficientes, el inconveniente encontrado con esta última fue la pérdida obtenida de aproximadamente 10% después de realizada la reactivación con HCl 6N y con sulfato de cobre al 2%, debido al tamaño pequeño de las partículas la pérdida de cadmio es mayor. Por lo tanto se trabaja con el cadmio de tamaño de partículas de 0.3 a 1.6 mm equivalente a una malla de 20-100 , durante todo el proceso de validación del método y análisis de las muestras

B. Del tiempo de contacto en la columna de reducción

Se realiza varias pruebas para evaluar el tiempo de contacto a través de la columna. Como se explica anteriormente en la sección 7.4.5.4 . no es conveniente evaluar por el flujo porque no se obtuvo un flujo constante durante toda la muestra, por lo que se decide trabajar con un tiempo total de contacto de la muestra obteniéndose los resultados descritos en las Tablas 7.10 y 7.11. para una concentración baja y alta respectivamente, De los resultados obtenidos podemos decir que para tiempos mayores de 10 minutos se obtiene resultados más bajos en los estándares, esto es debido a la inestabilidad del ión nitrito que es oxidado en presencia de oxígeno del aire

C. De las curvas de calibración

Curvas de calibración	Parámetro	Rango	Coefficiente de linealidad r^2
Figura N°7.3	Nitrito	0.5-25ugN-NO ₂ ⁻	0.99988
Figura N°7.4	Nitrito	0.1-2.5ugN-NO ₂ ⁻	0.99994
Figura N°7.5	Nitrato	3-25ugN-NO ₂ ⁻	0.99993
Figura N°7.6	Nitrato	2.5-25ugN-NO ₃ ⁻	0.9987

Para el caso de nitritos los resultados mostrados nos indican que es conveniente trabajar en dos rangos de concentración, de esta manera se consigue mejorar la linealidad de las curvas de calibración, obteniéndose una alta linealidad. En caso de nitrato es posible mejorar el coeficiente de linealidad obtenido, aumentando la concentración del punto más bajo teniendo en cuenta el límite de cuantificación obtenido (se explica más adelante en la calibración y estandarización de la curva).

8.2. DE LOS PARÁMETROS EVALUADOS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO :

A. Calibración y estandarización de la curva patrón.

Para la determinación del rango de la curva de calibración se tiene en cuenta el límite de cuantificación obtenido a partir de la ecuación 6.6(ver página 33). Los resultados son:

Nitritos	LC = 2.5 ug/l
Nitratos más nitritos	LC = 0.05mg/l

Para la determinación de nitritos se emplea el rango de 0.5 a 5 ug N-NO₂⁻ obteniéndose un coeficiente de linealidad $r^2 = 0.99998$; para el caso de nitrato más nitrito se utiliza el rango de 2.5 a 25 ug N- NO₃⁻ con un coeficiente de linealidad $r^2 = 0.99983$. Para verificar la precisión de la curva de calibración se trabaja con estándares de control (EC), y para la estabilidad con dos estándares de verificación (EV), obteniéndose los siguientes resultados (los resultados totales son mostrados en la sección 7.5.1.):

Parámetro	Figura	Estándares	Coefficiente de linealidad r^2
Nitrito	N°7.8	EC	0.99997
Nitrito	N°7.9	EV	0.99998
Nitrato más nitrito	N°7.11	EC	0.99823
Nitrato más nitrito	N°7.12	EV	0.99925

obteniéndose coeficientes de linealidad aceptables mayores de 0.990 según la literatura. Por tanto se usaron estas curvas de calibración con confiabilidad para todos los demás parámetros de validación y análisis de las muestras.

B. Examen de contaminación de blancos

Para el ion nitrito no se tiene contaminación de blancos analíticos (Ver Tabla 7.20.) Para la determinación de nitratos más nitritos sí se tiene contaminación. Las fuentes de contaminación son los reactivos utilizados en los análisis: el agua de reactivos, EDTA, NH₄Cl y NH₄OH. La fuente de contaminación es conocida y cuantificable según la Tabla 6.2 (ver página 40) la acción correctiva a tomar es restar los blancos de la muestras y tratar de minimizar las fuentes de contaminación.

Para minimizar las fuentes de contaminación empieza con el agua usada para la preparación de reactivos concluyéndose que debe utilizarse agua de tipo I (ver Anexo N°2), con los otros tipos de agua se obtiene valores de blancos altos..

En cuanto a los reactivos se tiene en cuenta las especificaciones en las etiquetas de los reactivos y/o en las hojas técnicas.

EDTA Merck nitratos máximo 0.01%

NH₄Cl Merck nitratos máximo 0.0005%

NH₄OH Merck nitrato máximo 2%

Una alternativa para minimizar esta fuente de contaminación sería trabajar con reactivos con mínima concentración de nitratos y nitritos.

C. Límites de Detección

El resumen de los límites de detección obtenidos es el que se detalla a continuación:

Parámetro	Límite	Valor obtenido
Nitrito	LDI	0.353 ug/l
Nitrito	LDM	0.780 ug/l
Nitrito	LDP	1.31 ug/l
Nitrito	LC	2.51 ug/l
Nitrato	LDI	0.008 mg/l evaluado el mismo día
Nitrato	LDI	0.0096 mg/l evaluado en 10 días
Nitrato	LDM	0.032mg/l con blancos positivos
Nitrato	LDM	0.018mg/l con un estándar de 2.5 ug N-NO ₃ ⁻
Nitrato	LDP	0.030 mg/l
Nitrato	LC	0.051 mg/l

Los resultados del LDI sirven para evaluar el LDM, los LDM representan la mínima concentración que el método puede determinar, por tanto, para concentraciones menores, los resultados se reportan como menores a LDM; En los nitratos se reportan dos LDI, el valor que se considera es de 0.0096 ya que se adaptan a las condiciones más reales, también se muestran dos valores de LDM el valor considerado es el 0.018 en este caso se considero minimizar las fuentes de contaminación. El LDP es específico para una matriz determinada, en este caso para muestras de agua superficial; los resultados de la concentración de nitratos y nitritos obtenidos menores a LDP se reportan como <LDP. El LC define la concentración mínima en la que se debe cuantificar, es decir que la curva de calibración debe contener este punto de calibración (LC).

D. Exactitud y Precisión.

Los resultados obtenidos de exactitud y precisión son:

Exactitud

<i>Parámetro</i>	<i>Código muestra control</i>	<i>Valor verdadero</i> <i>mg/l</i>	<i>Valor obtenido</i> <i>mg/l</i>	<i>Exactitud</i> <i>%</i>	<i>Error</i> <i>%</i>
<i>Nitrato</i>	<i>Merck lote 90389112</i>	<i>0.3041</i>	<i>0.305</i>	<i>100.33</i>	<i>0.33</i>
<i>Nitrato</i>	<i>QC-97 US EPA</i>	<i>2.10</i>	<i>2.13</i>	<i>101.33</i>	<i>1.33</i>
<i>Nitrato</i>	<i>QC-99 US EPA</i>	<i>1.14</i>	<i>1.15</i>	<i>101.05</i>	<i>1.05</i>

Precisión

<i>Parámetro</i>		<i>Valor Promedio</i>	<i>Sd</i>	<i>Coefficiente de variación</i>
<i>Nitrato</i>	<i>dentro de lote</i>	<i>0.305</i>	<i>0.0210</i>	<i>0.69</i>
<i>Nitrato</i>	<i>dentro de lote</i>	<i>2.13</i>	<i>0.0425</i>	<i>3.70</i>
<i>Nitrato</i>	<i>entre lotes</i>	<i>1.15</i>	<i>0.0484</i>	<i>4.20</i>

Los coeficientes de variación obtenidos son aceptables ya que son menores a 8.0, valor referencial dado por Horwitz después de varios estudios colaborativos (ver Tabla 6.1).

8.3. DE LOS PARÁMETROS EVALUADOS PARA LA VALIDACIÓN DE DATOS:

Estos parámetros se consideran con la finalidad de evaluar el control de calidad que deben seguir las muestras por todo el proceso analítico seguido. Por tanto se debe tener en cuenta en el momento que se lleva a cabo los análisis.

A. Duplicados de las muestras

El valor de RPD que es la desviación promedio relativa, su valor máximo aceptado es determinada de acuerdo a criterios de precisión establecido por cada laboratorio. Por lo general se adopta un RPD máximo entre 10 y 20 %. En nuestras muestras evaluadas se obtiene RPD menores de 10%, cuando se obtienen resultados que excedan los valores establecidos, primero se debe evaluar la matriz de la muestra, luego se debe tomar la acción correctiva, es decir si es necesario o no repetir todo el proceso analítico seguido por la muestra.

B. Porcentajes de Recuperación de una adición conocida

Los porcentajes RR obtenidos son los siguientes:

<i>Parámetro</i>	<i>%RR</i>	<i>Rango de aceptación RR</i>
<i>Nitrito</i>	<i>96.017</i>	<i>84.29 – 107.741</i>
<i>Nitrato más nitrito</i>	<i>100.028</i>	<i>88.84 - 111.190</i>

Los porcentajes RR obtenidas en las muestras adicionadas se encontraron dentro del rango de aceptación RR.

C. Cartas de control

Las cartas de control se usan para verificar los resultados y tomar acciones correctivas inmediatas cuando se detecten situaciones fuera de control y tendencias en las cartas de control.

En la Sección 7.7.1 se muestran todas las cartas de control las cuales fueron construidas en base a la información dada en la Sección VI. En todas las cartas de control construídas hay una separación entre el periodo preliminar, que debe realizarse en un tiempo de 20 a más días y el análisis de las muestras de agua superficial.

Las carta de control de exactitud para la determinación de nitrito se observa una situación fuera de control, el valor de la concentración de la muestra control fue mayor de LCS, la acción correctiva tomada fue preparar una nueva muestra control y repetir el análisis. En la

carta de control para la determinación de nitratos y nitritos no se observa situaciones fuera de control.

Las cartas de control de blancos para la determinación de nitrato y nitrito se observa la serie 23 fuera de control, valor obtenido mayor del límite de control superior ($LSC = \bar{x} + 3s$).

Las cartas de control de recuperación y las cartas de control de rango no se observan situaciones fuera de control.

Se describe como fue construida la carta de control cusum de la Figura N°7.22..

Consideraremos sólo los 8 primeros datos de la Tabla 7.32. y el valor verdadero de la muestra control (1.14 mg/l)

<i>N de Serie</i>	<i>Valor verdadero</i>	<i>Valor obtenido</i>	<i>Desviación</i>	<i>Valor Cusum</i>
1	1.14	1.24	-0.10	-0.10
2	1.14	1.11	+0.03	-0.07
3	1.14	1.13	+0.01	-0.06
4	1.14	1.21	-0.07	-0.13
5	1.14	1.18	-0.04	-0.17
6	1.14	1.20	-0.06	-0.23
7	1.14	1.19	-0.05	-0.28
8	1.14	1.22	-0.08	-0.36

La desviación = Valor verdadero – Valor obtenido

Valor cusum $i =$ Desviación $i +$ Valor cusum anterior($i-1$) donde $i =$ N° de serie (1,2, etc.)

Valor cusum 1 = -0.1 + 0 = -0.1

Valor cusum 2 = +0.03 + -0.1 = -0.07 y así sucesivamente son obtenidos los siguientes valores los cuales son graficados en el eje Y, contra el número de serie en el eje X.

Las cartas de control cusum son usadas cuando se requiere de una más alta exactitud en los análisis, así por ejemplo podemos comparar las cartas control \bar{x} y cusum obtenidas en los gráficos de las Figuras N°7.14 y 7.22. En la Figura N°7.14. no se observa una situación fuera de control en el punto 8, sin embargo en la carta cusum de la Figura N°7.22, en el punto 8 se observa una situación fuera de control donde se toma una acción correctiva inmediata.

IX. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. De la evaluación de los parámetros analíticos para el desarrollo del método de reducción con cadmio se concluye que las condiciones óptimas de trabajo fueron las siguientes; pH de reducción de 8.5 ± 0.1 , tiempo de reducción a través de la columna de 8 a 10 minutos por muestra y la eficiencia promedio de la columna de reducción de 93.8% (malla 20-100, columna # 1).

Todos estos parámetros evaluados se encuentran en los rangos establecidos en la literatura y los cuales se tomaron en cuenta durante todo el proceso de validación del método y evaluación de las muestras.

2. Durante la evaluación de los parámetros analíticos para la validación del método se concluye lo siguiente:

- El método de reducción con cadmio es apto para la determinación de nitratos más nitrito en el rango de 0.01 a 1.00 mg N-NO₃⁻/l

- El método espectrofotométrico es aplicado en dos rangos de concentración de 0.001 a 0.025 y de 0.025 a 0.50 mg N-NO₂⁻/l.

- Las curvas de calibración de los métodos empleados presentan un alto coeficiente de linealidad (r^2) de 0.9999 para la determinación de nitritos y de 0.9998 para la determinación de nitratos más nitritos, obtenidos por el método de regresión lineal.

La Evaluación analítica de las curvas de calibración se realizó mediante estándares de control (EC) y estándares de verificación (EV) obteniéndose los siguientes coeficientes de linealidad: EC 0.99997, EV: 0.99998 para nitritos; EC: 0.99823, EV: 0.99925 para nitratos con nitritos.

Estos resultados nos permitieron emplear las curvas de calibración obtenidas con confiabilidad para los análisis de las muestras durante todo el proceso seguido.

- El Límite de Detección Instrumental (LDI) nos permite calcular el Límite de Detección del método. El LDM representa la mínima concentración que el método determina a un nivel de confianza del 99.9 %, concentraciones menores obtenidas para las muestras se debe reportar como < LDM (<0.00078 mg/l para el caso de nitrito y <0.018 mg/l para el nitrato).

- Los métodos empleados presentan una exactitud de 100.33 % para la determinación de nitritos por el método espectrofotométrico y de 101.19 % para la determinación de nitratos

más nitritos; obteniéndose porcentajes de error menores al 25% con los cuales son considerados como métodos aceptables.

- *La precisión expresada como coeficiente de variación para la determinación de un estándar de nitrito es 3.25 % y para la determinación de nitrato mas nitrito con un estándar de nitrato es 5.4 %; que son aceptables considerando la relación empírica de Horwitz evaluada después de varios estudios colaborativos.*
- 3. *De los resultados obtenidos para la determinación de nitratos, el 80 % de las muestras son mayores a 0.1 mg/l (Tabla 7.37.) sobrepasando el límite establecido para las aguas tipo III, según la Ley General de Aguas, solo el restante 20 % esta dentro de los límites*
- 4 *De los resultados obtenidos para las diez estaciones o puntos de muestreo evaluados al río Santa podemos concluir que ningún valor de concentración de nitritos y nitratos exceden los límites de valores guías (VG) establecidos por la OMS ver tabla 4.3. Los VG son las concentraciones máxima de nitritos y nitratos que puede contener el agua potable (o de bebida).*
- 5. *Se realizaron dos muestreos con el propósito de ver las influencias del clima, de los resultados obtenidos de las muestras se puede concluir que las muestras tomadas en los meses Febrero-Marzo presenta resultados más altos de nitritos y nitratos con respecto a los obtenidos en las muestras tomadas en el mes de Octubre, el aumento de concentración de estos parámetros puede deberse al incremento de las lluvias durante éstos meses (Diciembre-Marzo) y a la posible escorrentia de las aguas a través de las zonas agrícolas donde se usan los fertilizantes.*
- 6. *El agua del río Santa no tiene un riesgo significativo para la salud debida a la cantidad de nitritos y nitratos, pero mediante este trabajo puedo concluir que existe un aumento considerable de la cantidad de nitrato que puede estar relacionada con la contaminación orgánica debida especialmente al uso de plaguicidas asociados a nitritos y nitratos. Actualmente ya existen varios estudios donde se relaciona nitratos con la contaminación de plaguicidas.*

Además por comparación de los datos obtenidos en este trabajo y los datos de estudios anteriores realizados se puede verificar un progresivo incremento de contaminación que ya es muy conocido en nuestros ríos y mar peruano por la falta de infraestructura y normatividad en cuanto a los vertimientos de nuestros desechos y de muchas empresas (mineras, pesqueras, etc.) que contaminan nuestros recursos como es el agua superficial.

RECOMENDACIONES

1. *Se debe asegurar la calibración operación y mantenimiento de todos los equipos usados durante los análisis. Calibración de termómetros, balanzas, de medidores de pH y del Espectrofotómetro. En el caso del espectrofotómetro se debe determinar la calibración de la longitud de onda, mediante un espectro de absorción conocida, actualmente se usa el óxido de Holmio, también se puede usar el cloruro de cobalto. Y la calibración fotométrica para el chequeo de la linealidad, esta se puede realizar con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) o permanganato de potasio ($KMnO_4$).*

Recomienda una calibración del espectrofotómetro una vez al año, con un mantenimiento preventivo trimestral que consiste en la verificación de la intensidad de la lámpara de deuterio, la prueba de estabilidad del equipo entre otros parámetros. De los termómetros y balanzas dos veces en un año que son verificados por INDECOPI, y su mantenimiento preventivo de limpieza mensual para el caso de la balanza. En cuanto a los medidores de pH la verificación de su funcionamiento correcto debe ser trimestral.

2. *Para todo proceso analítico seguido para las muestras se recomienda que siempre se aplique y verifique los resultados en el momento que se lleva a cabo los análisis, es decir que cuando se analice las muestras debemos tener en cuenta en analizar en cada lote de muestra un mínimo de: un blanco analítico, una muestra de control interna o externa (de concentración conocida o desconocida), duplicados de muestras y una recuperación de una adición conocida (es necesario sino se conoce la matriz de la muestra). Adicionalmente si se trabaja con curvas de calibración se necesita de estándares de verificación de uno a dos puntos (es necesario cuando no se lleva la curva de calibración con las muestras).*
3. *Se recomienda llevar a cabo el control de calidad de los análisis mediante el uso de las cartas de control, que permiten detectar las posibles fuentes de error para tomar las acciones correctivas inmediatas, elaborar las cartas a partir de datos obtenidos en un período preliminar que debe ser trabajado de manera similar que para los análisis de las muestras, esto quiere decir en lo posible controlar las mismas condiciones de temperatura, pH, tiempo, etc. del análisis. Nunca se debe seguir un tratamiento especial en el período preliminar para ningún parámetro evaluado durante todo el proceso*
4. *Si no se puede adquirir un material de referencia certificado, se recomienda preparar un estándar de control a partir de una fuente diferente que la usada para la curva de calibración, esto quiere decir como para el caso de nitratos, se prepara los estándares de la curva de calibración a partir de un sal de nitrato de potasio, la muestra control se puede preparar a partir de nitrato de sodio, que viene a ser una fuente diferente*

5. *Se recomienda que todo método utilizado para el análisis de muestras propuesto o estándar debe ser desarrollado y validado mediante un procedimiento similar al descrito en este trabajo.*

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) *Theodore L. Brown, Química de la Ciencia Central, Universidad de Illinois 1991 by Prentice Hall Inc. Pág 897-898*
- (2) *A.F. Wells, Química Inorgánica estructural. Editorial Reverte, 1978. P. 686-688*
- (3) *Nitrato Behaviour in the presence of metallic compounds. Water Supply volumen 10,N°3. Hamburg, 1992. Pág 31-37*
- (4) *R. Urbistando and L.R. Bays. Nitrogen Pollution of Water. Water Supply volumen 6, N°3.London 1988. Pág. 45-70,72, 77-87, 199-205*
- (5) *César Guillermo Zumaran Calderón. Estudio de la calidad de aguas superficiales caso:cuenca del río Cañete, ONERN, Lima Perú, 1985.*
- (6) *Evaluación Comparativa de Riesgos ambientales en Lima. Proyecto Ecoriesgo, Lima, 1996.*
- (7) *Luis Malnati Faro. La contaminación de las aguas en el Perú, Rol del Ministerio de Salud en su control. CEPIS-OPS, 1976.*
- (8) *César Guillermo Zumaran Calderón. Diagnostico Nacional de la calidad del agua ONERN, Lima, Perú, 1986.*
- (9) *Eudoro Espinoza. Concentración de nitratos en aguas subterráneas de Gurané-Masparro. Proyecto Guarane-Masparro CIDIAT, 1978.*
- (10) *Standard Methods for the Determination of Water and Wastewater . APHA, AWWA, WEF Edition 20, 1999.*
- (11) *Guías para la Calidad de Agua potable. Organización Mundial de la Salud (OMS), Segunda Edición. Ginebra 1999. Pág 9-11 y 38.*
- (12) *Bouchard, Dermont C. ; Williams, Maru K. Surampalli, Rao Y. Nitrate contamination of groundwater. Journal of the American Water Works Association; 84. (9), September 1992. P. 85-90.*
- (13) *Marina Grajales Coello. Nitratos en aguas subterráneas causa de metahemoglobinemia, Facultad de Ciencias Medicas, 1990.*

- (14) *Granwn Guter. F.G.D.G. Methahemogolbin levels in young in consuming high nitrate well water in the United Stated.*
- (15) *The National Laboratory for the enviromental testing. Manual of Analytical Methods Volumen 1 Major Ions and Nutrients. Burlington Ontario.Canada, 1994*
- (16) *James W.o'dell. Determination of nitrate-nitrite nitrogen by automated colorimetry. Chemistry Research Division, Revisión 2.0 august 1993.US. EPA Cincinnati,Ohio.*
- (17) *Rene Navarro, Method for nitrate in potable waters. Joumal American Water Works Association, Jun 1964, Pag. 781-783*
- (18) *P-Hajos and J. Inczedy. Spectrophotometric determination of the nitrate with 2.6-dimethy phenol. Hungarian Scientific Instruments. 1975, Pag. 25-29*
- (19) *Standar Methods for the Determination of Water and Wastewater . APHA, AWWA, WEF Edition 14, 1971*
- (20) *Castañeda Saldaña Beatriz. Fundamentos de estadística, curso-taller de Control de calidad analítica, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima 1995, Pag 1-13 y 23-39*
- (21) *F.M. Garfield, Quality Asurance Pribciples for analytical Laboratories AOAC, 1991, Pag 23-28*
- (22) *M.Parkany, quality asurance for analytical Laboratories, Intemational Organization for Standarization, Genova, Pag 5-11*
- (23) *Esparza Maria Luisa, Manual de Control de Calidad de Laboratorio del CEPIS, OPS/CEPIS/PUB/13-1995,*
- (24) *Cliff J. Kirchmer, Control de Calidad en los Análisis de Agua. CEPIS, Lima, OPS/CEPIS/PUB/24-1984*
- (25) *Frederick M. Garfield, Association of Official Analytical Chemist, USA, 1999, Pag. 82-93 y 185-189*
- (26) *Carlos Gonzales. Normas internacionales de administración de calidad, Sistemas de calidad y sistemas ambientales. Ed. MCGraw-Hill, Mexico 1998*
- (27) *Wemer, Funk, Qualyti Assurance in Analytical Chemistry, New York VCH, Weinheim 1981.*

- (28) *Julio Tremolada Payano, Técnicas de tratamiento en la destrucción de cianuro de sodio a partir de efluentes líquidos de cianuración, Minera Aurífera Retamas, Perú 1993*
- (29) *SANIDRO Ingenieros Consultores, Estudio de Contaminación y Preservación del Rio Santa Lima 1982, Tomo I y II*
- (30) *Henry Salas. Evaluación y Manejo de sustancias Tóxicas en Aguas Superficiales, CEPIS, Lima 1988*
- (31) *Stuart Zucchety, Anna Alegre et al. Evaluación Corporativa de Riesgos para la Salud Ambiental en Lima Metropolitana elaborado por el Proyecto Econiego, Lima 1993*
- (32) *Manual del Espectrofotómetro Hewlett Packard HP-8452^a, con arreglo de diodos, Publicación N°08-452-50001, July 1986 Pag. 2-15*
- (33) *Mundo Minero Edición 177, 15 Agosto/15 setiembre. Técnicas empleadas en metalurgia aurífera. Pag. 83-96*
- (34) *Nural Kuyucak, Medio Ambiente y tratamiento de Residuos Mineros, Minería 251, Pag. 20-26.*