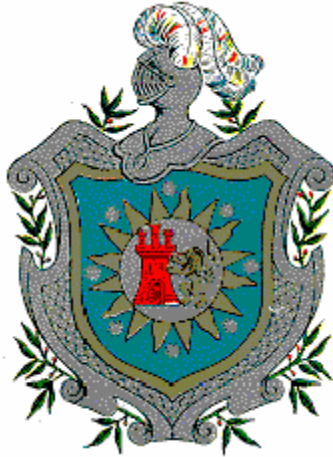




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEON
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Química Analítica**



***“Validación del Método para la Determinación de nitratos utilizando una
Columna de reducción con Cadmio”***

Presentado por:

Lic. Ela Yariela Downer Arispe

Tutor:

Dr. Gustavo Delgado

**Trabajo de Graduación presentado a
Consideración para optar por el Título
De Maestría en Química Analítica con
Especialidad en
Control de calidad De Aguas**

LEON, NICARAGUA AGOSTO DEL 2003



AGRADECIMIENTO

Hoy que me toca recordar todo lo que he vivido, te agradezco a ti mi Dios, que siempre me animas con la esperanza de nunca desistir.

A mis Padres, Hermanos, familiares, y amigos que no se han inventado todavía las palabras de agradecimiento, que puedan expresar cuanto valoro sus gestos de apoyo que nunca olvidaré. También, los incentivo a este camino de superación que al culminar una meta como esta, forjan dentro de cada persona, además, de satisfacción a este nuevo ser que todos llaman profesional.

A mis profesores Nicaragüenses, Franceses y a mis compañeros gracias por dejarme pertenecer a este grupo excepcional de personas, de las cuales me siento extremadamente orgullosa. A todos les deseo el mayor de los éxitos.

Gracias al Gobierno de Francia por la oportunidad de Beca, que me brindaron, y muy especialmente por su Diligencia y esmero para todo lo que necesite, lo cual llevaré en mi mente como un gesto que nunca olvidaremos yo, mis familiares y amigos.

A mi Tutor Dr. Gustavo delgado y MSc. José Villerreal por su tiempo y dedicación un millón de Gracias.



INDICE GENERAL

Resumen

Introducción

Objetivos

Capítulo I

1. Generalidades sobre la validación de métodos analíticos	1
1.1.Importancia de la validación para los laboratorios científicos y la industria moderna.	1
1.2.Validación dentro del sistema de aseguramiento y control de la calidad.	1
1.3. Tipos de validación.....	2
1.3.1. Conceptos y criterios que definen la eficiencia de un método.....	3
1.3.2. Reglas de validación.....	3
1.4. Quimiometría	
1.4.1. Concepto.....	4
1.4.2. Aplicación e importancia científica.....	4

Capítulo II

2. Industria Objetivo de Estudio	
Laboratorios de ensayo y calibración.....	5
2.1. Antecedentes y Proyecciones Futuras Laboratorios de Investigación en la Universidad de Panamá.....	5
2.2. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.....	7

Capítulo III

3. Marco teórico	
3.1 Generalidades sobre el Nitrógeno.....	10
3.2 Principio del método de Reducción por Columna de Cadmio.....	10

Capítulo IV. Parte Experimental

4.1 Instrumentos, Materiales y Equipo.....	12
4.1.1 Instrumentos.....	12
4.1.2 Cuadro de reactivos y sus especificaciones.....	12
4.1.3 Reactivos y soluciones preparadas.....	12
4.1.4 Cristalería.....	13
4.2 Preparación de Soluciones.....	13
4.3 Condiciones Experimentales.....	14
4.4 Preparación de la Columna de Reducción.....	14
4.5 Tratamiento previo de la muestra.....	14



4.6 Medición del Flujo.....	14
4.7 Proceso de reducción de la muestra.....	15
4.8 Desarrollo del Color.....	15
4.9 PROCEDIMIENTO PARA PREPARACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN.....	15
4.9.1 Comparación de un Estándar de Nitrato con un Estándar de Nitrito.....	15
4.9.2 Repetibilidad de la medición del instrumento con estándar puro.....	16
4.9.3 Repetibilidad del método.....	16
4.9.4 Estudio de linealidad.....	16
4.9.5 Efecto de la Adición de estándares a una muestra.....	17

Capítulo V. Resultados y Discusión

5.1 Calibración de Materiales Volumétricos y Balanza Analítica.....	19
5.2 Error Fotométrico.....	19
5.3 Estudio de Ruido de Fondo utilizando blanco.....	20
5.4 Comparación de estándar de nitrato con un estándar de nitrito.....	21
5.5 Estudio de Repetibilidad de la Medición del Instrumento con Estándar Puro.....	23
5.6 Estudio de Repetibilidad de Método Utilizando una Muestra de Agua.....	26
5.7 Estudio del efecto de los factores de tiempo y la preparación de los estándares en la respuesta de la medición analítica.....	27
5.8 Linealidad.....	28
5.9 Estudio de variación del flujo en las curvas de calibración.....	28
5.10 Estudio de Linealidad controlando el flujo de la columna de reducción.....	31
5.11 Discusión sobre el problema de dispersión de los puntos de la carta control.....	33
5.12 Evaluación de la Exactitud del Método.....	34
5.13 Limite de detección y cuantificación.....	36
5.14 Evaluación de la incertidumbre en el cálculo de la concentración de nitratos en una muestra de agua a través de una curva de calibración.....	36
5.15 Prueba de íter-laboratorio.....	38

Conclusiones

Recomendaciones

Referencias

Anexos



Resumen:

El objetivo fundamental del presente trabajo es evaluar los parámetros de desempeño para el método de determinación de nitratos utilizando una columna de cadmio. Se estudiaron los diferentes parámetros que caracterizan el desempeño del método tales como: precisión, exactitud, linealidad, límite de detección y de cuantificación. Se evaluó la incertidumbre en la determinación de nitratos en una muestra de agua. Por último, se participó en un ensayo interlaboratorial donde participaron 53 laboratorios a nivel de Latinoamérica, donde el laboratorio tuvo un error cuadrático medio relativo de 2.5 %. La precisión fue evaluada a tres niveles: señal de ruido de fondo, medición analítica o función respuesta del espectrofotómetro utilizado y repetibilidad del método. La linealidad en el modelo de calibración encontrándose que es necesario optimizar bien la columna de reducción de cadmio para obtener una buena linealidad. La exactitud del método fue evaluado relacionando la curva de calibración por adición patrón con la curva de calibración normal obtenida con estándares puros, estimándose un recobro de (106 +/- 6) %. Los límites de detección y de cuantificación para el nitrato fueron 0.07 mg/L y 0.09 mg/L que representan respectivamente 0.0160066 y 0.0207 nitrógeno como nitratos (N-NO₃) mg/L.

Por ultimo, se presenta el calculo de la concentración de la muestra Cx, junto con el valor de su incertidumbre Ux, obtenido a partir de Análisis de Regresión lineal Ponderada; cuyo resultado es 0.48807+/-2 (0.014869784) reportado como intervalo de confianza.



Introducción

En las aguas naturales y las aguas de desecho, las formas en que puede encontrarse el nitrógeno es de gran interés. Uno de los contaminantes que más preocupa al hombre es el nitrato ya que una alta concentración de este compuesto tendría efectos funestos en el medio acuático y marino; ya que promueve el crecimiento acelerado de plantas acuáticas y microorganismos que causan la polución del agua.

En general, el nitrato puede encontrarse a niveles de trazas en agua superficiales, pero puede alcanzar altos niveles en aguas subterráneas. En cantidades excesivas puede contribuir a una enfermedad conocida como metahemoglobinemia en infantes. Una concentración límite de 6 mg/L de nitrato, es impuesta a las industrias, para la descarga de efluentes líquidos a cuerpos receptores según la norma panameña (22) es el límite permisible y para el agua potable se establece una concentración mínima de 50 mg/L de nitrato según el Ministerio de Salud, de la republica de Panamá.

Otro aspecto que interesa conocer, se desarrolla en el área de la Agricultura, donde el ciclo del nitrógeno es de gran importancia; ya que la falta de este elemento limita la producción de alimento. Se conoce que el empleo de compuestos nitrogenados resuelve este problema, pero el exceso que no se recobre en las cosechas se convierte en nitrato, el cual al reducirse forma nitrosaminas. Las nitrosaminas son sustancias cancerígenas, mutagénicas y teratógenicas. El peligro esta cuando se ingieren agua o alimentos con acumulación de nitratos, el bajo pH del estómago del hombre favorece la formación de nitrosaminas. Por esta razón, se recomienda que se vigile la presencia de nitratos en los alimentos y en el agua de consumo humano.

Las aguas subterráneas representan una fuente de suministro de agua potable especialmente en las áreas rurales, en donde el abastecimiento de agua se trata de complementar con el uso de pozos. Un estudio realizado en Panamá (24), que contempla este hecho se realizo en 1994, en la región de Azuero, provincia de Herrera. Azuero es una de las regiones de más baja pluviosidad en Panamá y el suministro de agua potable a la población depende de manera significativa de las aguas subterráneas. Además, está es un área densamente cultivada y la gran permeabilidad del suelo puede provocar contaminación de las aguas subterráneas por el uso de plaguicidas y fertilizantes.

En este estudio se determino la concentración de nitratos en 26 pozos ubicados en esta región; resultando que un 85% de los pozos analizados estaban dentro del valor recomendado por el Ministerio de Salud de Panamá (hasta 50mg/L de nitrato), pero es preocupante que el 15% estuviera por arriba del valor recomendado. Aunque este trabajo no fue tan extenso, sirvió de punto de partida para hacer recomendaciones y promover ulteriores investigaciones.

Con el crecimiento acelerado de la población la demanda de agua potable aumenta, y con ello, la necesidad de fuentes de aguas naturales de una buena calidad, para así hacer menos costoso y rápido su tratamiento. En los últimos años, los estudios



al recurso agua gozan de mucha importancia para los gobiernos y para la población a nivel mundial. La Protección ambiental, prevenir la contaminación de cuerpos y masa de aguas superficiales y subterráneas, mediante el control de los efluentes líquidos provenientes de actividades domésticas, comerciales e industriales, que se descargan a cuerpos receptores manteniendo una condición de aguas libres de contaminación, tiene como objetivo preservar la salud de la población.

Actualmente, Panamá se encuentra en un periodo de implementación de leyes y normas que brinden protección al recurso agua; para ello, necesita laboratorios de ensayo y calibración acreditados, a los cuales la autoridad competente autoriza para realizar análisis de efluentes líquidos, reconociendo la validez de sus análisis. Luego, para lograr esta acreditación, un requisito importante para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, es tener métodos de análisis validados; para ello, el laboratorio debe ser capaz de presentar evidencias objetivas, de que su método puede cumplir a cabalidad con las exigencias analíticas de sus clientes. Pensando en esto, el Laboratorio de Calidad y Aire, que pertenece a Vicerrectoría de investigación y post-grado de la Universidad de Panamá, se interesó en validar el método espectrofotométrico para la determinación de nitratos utilizando una columna reductora de cadmio.

Un estudio antecedente cuyo tema de investigación era “Una nueva columna de reducción para el análisis de nitratos en agua de mar” fue realizado en la Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Naturales y Farmacia en 1980. Se hizo con el objeto de agilizar los análisis de este componente en laboratorios de análisis que tengan grandes cantidades de muestra ya que el método es rápido y reproducible, introduciendo un dispositivo que utiliza cadmio como reductor. De los datos obtenidos se concluyó que el nuevo reductor presenta ciertas ventajas tales como; que se puede llevar a cabo con equipo sencillo, se puede utilizar poca cantidad de muestra mientras que los otros métodos utilizan gran cantidad de los mismos.

Para dar una idea del contenido de este trabajo, diremos que el primer capítulo, trata de la importancia que tiene la validación para laboratorios científicos y la industria moderna, también se hablara de conceptos y reglas muy generales acerca de la validación. El segundo capitulo menciona la norma 17025, la cual promueve de manera indirecta la competencia entre los laboratorios y dicta las pautas que deben seguir los laboratorios para garantizar la calidad de sus resultados. Además, se menciona los antecedentes, planes y proyecciones futuras de los laboratorios de investigación en la Universidad de Panamá. El capitulo tercero, contempla el marco teórico del análisis. El capitulo cuatro habla de la metodología aplicada. Por ultimo, los resultados y la discusión de estos se muestran en el capitulo cinco; donde se discute mas ampliamente las características de desempeño del método. Luego, de las conclusiones y recomendaciones; en la sección de anexos se encuentra información complementaria acerca de este tema.



OBJETIVOS

General:

- Validar el método para la determinación de nitratos utilizando una columna de reducción con cadmio.

Específicos:

- Evaluar los parámetros de desempeño del método repetibilidad, exactitud y linealidad.
- Determinar el rango de absorbancia de mayor precisión y exactitud estimando el error fotométrico para este análisis.
- Hacer un estudio de los factores preparación de los estándares y días en la respuesta de la medición analítica aplicando el diseño experimental de ANOVA de 2 Factores.
- Hacer un estudio de la variación del flujo en función de la concentración de nitratos
- Establecer límites de detección, cuantificación y repetibilidad de los resultados
- Realizar un estudio de la calidad del modelo lineal en función del tiempo mediante la carta control elíptica y los intervalos de confianza.
- Deducir la expresión de la concentración de nitratos en la muestra de agua a partir del modelo de regresión.
- Encontrar el valor de la incertidumbre de una muestra de agua subterránea



CAPITULO I

GENERALIDADES SOBRE LA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

1. Generalidades sobre la validación de métodos analíticos.

1.1. Importancia de la Validación para los laboratorios científicos y la industria moderna.

En la actualidad, el poder asegurar la calidad de un producto o un servicio a un nivel de confianza establecido, es un requisito importante a la hora de competir con otras industrias.

Para ello, la industria moderna esta basada en una serie de actividades que se encarga de controlar que el producto final cumpla con todas las especificaciones relacionadas con el fin para el cual se elaboró. La recopilación de evidencias mediante el análisis químico garantiza al usuario del producto y a la misma industria que lo fabricó, que no ocurran fallos de desempeño.

En este punto, la validación juega un papel primordial en la definición de estos parámetros de calidad.

Las normas ISO, como la 17025 para la acreditación de laboratorios de ensayo y/o calibración proporcionan una guía para la interpretación del término validación. En ella se indica que la validación consiste en una serie de verificaciones necesarias para asegurar las características de eficiencia del método y demostrar mediante ensayos de laboratorio que el método es científicamente adecuado para las condiciones en las cuales debe ser aplicado.

1.2. Validación dentro del Sistema de Aseguramiento y Control de la Calidad.

La industria requiere de un servicio analítico que contempla tres aspectos importantes: la velocidad, bajo costo y la calidad.

La validación y un sistema de aseguramiento de la calidad interactúan con el objeto de garantizar esa calidad.

Para cumplir con las diferentes etapas experimentales que se requieren en la validación de un método, se controlan una serie de actividades que van desde la preparación de la muestra, hasta el análisis estadístico de los datos. Por lo tanto, el analista, debe poseer conocimiento sólido de las diversas técnicas estadísticas (3).



Dentro del departamento de servicio analítico, un supervisor, controla periódicamente la calidad de los resultados. El personal de esta área debe ser competente y seguir las normas que imponen las buenas prácticas de laboratorio. Dentro del laboratorio los métodos de análisis deben poder cumplir con la tarea de lograr demostrar la calidad de un producto o servicio. Es en este momento, cuando el laboratorio puede utilizar a la validación como herramienta de juicio. Mediante la validación el laboratorio debe tener la capacidad de:

1. Confirmar, a través de examen y la presentación de evidencias objetivas, o de que se cumplen totalmente los requisitos particulares para un uso específico previsto.
2. Asegurar las características del desempeño y limitaciones de un método; verificando científicamente que se rige bajo las condiciones para las cuales debe ser aplicad.
3. El laboratorio debe confirmar que puede operar correctamente los métodos que desea validar (disponibilidad y recursos).
4. El laboratorio debe reportar al cliente externo o interno cuando el método propuesto por el mismo se considere inapropiado o desactualizado.
5. El laboratorio debe informar al cliente cuando sus recursos están fuera del alcance de las exigencias del cliente.
6. En un trabajo de validación el analista y el método son evaluados. El analista debe tener suficiente dominio sobre las diversas técnicas estadísticas.

1.3. Tipos de validación:

Existen dos tipos de validación de un método:

- a. Validación Interno: se desarrolla dentro del laboratorio, cuando se desea aplicar un nuevo método o cuando se necesite adaptar o modificar un método que se ha tomado de otras fuentes.
- b. Validación Externa: esta ocurre cuando deseamos comprar nuestros resultados con el de otros laboratorios de reputación



con el de otros laboratorios de reputación nacional e internacional.

1.3.1. Conceptos y Criterios que definen la eficiencia de un método.

Criterios Primarios de Eficiencia:

- a. Precisión: describe el tamaño de los errores aleatorios.
- b. Exactitud o Bías: también se le conoce como sesgo y mide la magnitud del error sistemático.
- c. Límite de Detección: mide la cantidad mínima que puede distinguirse del ruido de fondo.

Criterios Secundarios de Eficiencia: tienen influencia en los criterios primarios.

- a. Linealidad: utiliza el módulo de calibración para describir el comportamiento entre la respuesta y la concentración.
- b. Rango o intervalo de confianza: indica los niveles inferior y superior del analito, en el cual, la relación lineal u otro modelo de calibración es correcta.
- c. Límite de cuantificación: representa la mínima concentración el analito que puede ser cuantificada con una buena precisión y exactitud.
- d. Selectividad: esta asegura que la señal medida no es influenciada por otras sustancias presentes en la muestra. Es útil para eliminar la posibilidad de sustancias interferentes.
- e. Sensibilidad: mide la magnitud del cambio en la función respuesta con la concentración.
- f. Robustez o Fortaleza del Método: mide la sensibilidad del método a pequeños cambios en el procedimiento.

1.3.2. Reglas de Validación:

Antes de iniciarse una validación deben tomarse en cuenta tres reglas fundamentales:

1. Validar el método completo. Desde la etapa preparatoria hasta la medición analítica.
2. Validar en un intervalo de concentraciones. Un método puede ser apropiado a altas concentraciones y ser inadecuado ha bajas concentraciones.



3. Validar sobre una amplia gama de matrices. Se debe indicar para que matriz o matrices es apropiado el método.

1.4. Quimiometría:

1.4.1. Concepto:

La Quimiometría es un término que se emplea en la actualidad para referirse a la aplicación de la matemática y la estadística en la química. Se aplica en la evaluación de los resultados de un proceso analítico.

1.4.2. Aplicación e importancia científica.

En los últimos tiempos el desarrollo tecnológico ha permitido revolucionar la instrumentación química aumentando la sensibilidad de las determinaciones analíticas o del empleo de computadoras que utilizan las técnicas de la quimiometría, ha permitido obtener resultados más confiables.

La importancia científica está en el hecho, que la quimiometría nos permite evaluar los métodos analíticos identificados y cuantificando los diferentes tipos de errores que son la causa de la inexactitud en las mediciones analíticas.

En un proceso analítico podemos distinguir diferentes etapas:

1. Selección del Método: depende de la sensibilidad requerida.
2. Optimización del Método: seleccionado el método, se optimiza con la idea de obtener las mejores condiciones donde el método es capaz de dar resultados reproducibles.
3. Tratamientos de la Muestra: En este punto, se realizan operaciones como pesar, secar, diluir, digestar, extraer, etc. Por lo general, es la etapa más difícil y la primera que determina la calidad y la eficiencia del método.
4. Medición Analítica: la medición o determinación de un resultado es una señal, que es recuperada del instrumento por una computadora. Es a través de



módulos de calibración que relacionan la señal analítica con la concentración del analito, que se logra traducir la señal eléctrica en información química.

CAPITULO II

INDUSTRIA OBJETIVO DE ESTUDIO: LABORATORIOS DE ENSAYO Y CALIBRACION

2. Industria Objeto de Estudio: Laboratorios de Ensayo y Calibración

La creación de cualquier tipo de industria para el procesamiento y producción de artículos, sea cual sea su naturaleza, trae consigo la inminente necesidad de disponer de un laboratorio analítico, que cumpla con las exigencias de la organización a la cual pertenece.

La aplicación de normas nacionales e internacionales que buscan la mejora continua del proceso de aseguramiento de la calidad, ha hecho más complejo el trabajo realizado por los laboratorios que forman parte del sistema de calidad dentro de una empresa o industria.

El término laboratorios de ensayo y/o calibración es utilizada en nuestros días, por la Norma 17025, para referirse a todas las organizaciones que ejecutan ensayos y/o calibraciones. Por ejemplo, laboratorios de primera parte, se segunda parte o de tercera parte y laboratorios donde los ensayos y/o calibraciones forman parte de la inspección y la certificación de productos.

Lo importante de resaltar sobre la labor de los laboratorios de ensayo y/o calibración; se da a conocer mediante la Norma 17025, la cual de una manera indirecta promueve la competencia entre laboratorios; ya que un laboratorio demuestre cumplir con los requisitos que sugiere esta Norma, logra conseguir la aceptación comercial y un sello de calidad que garantice la preferencia de sus clientes.

2.1 Antecedentes y Proyecciones Futuras de los Laboratorios de Investigación en la Universidad de Panamá.

El presente trabajo de validación de método se realizó en uno de los 22 laboratorios de los edificios de Investigación y Postgrado de la Universidad de Panamá, el cual está identificado como Laboratorio de Calidad del Agua y del Aire (planta alta laboratorio 212). Este Laboratorio da servicio de análisis de agua a la empresa privada y a las empresas del estado (por ejemplo el IDAAN). Para entender un poco sobre el engranaje al cual, pertenece dicho laboratorio, hablaremos en esta



sección sobre los antecedentes y las proyecciones futuras de los Laboratorios de Investigación en la Universidad de Panamá.

El liderazgo que la Universidad de Panamá desea mantener en el área de la investigación científica dependerá de su capacidad para responder a las necesidades de la Nación Panameña. Por ello, en 1999 se inaugura el Edificio de Laboratorios Científicos de la Universidad de Panamá. Los investigadores, quienes por mucho tiempo han realizado su labor con grandes limitaciones, hoy en día cuentan con nuevas instalaciones, equipos y personal para realizar sus trabajos.

Dichas instalaciones fueron planificadas desde 1986, para que se ejecutase como parte de la Fase III del Programa UNIPAN-BID. El objeto del mismo, es captar contratos y, por lo tanto nuevas fuentes de financiamiento.

El edificio consta de 22 laboratorios distribuidos en dos plantas que fueron planificadas de acuerdo con las distintas líneas de investigación del programa:

En la planta baja se encuentra los Laboratorios de Electroquímica, Administración Caracterización y Análisis de Estructuras Químicas, Química Inorgánica, Radio nucleidos, Ciencias de Materiales Depósitos de radio nucleidos, Bioquímica de Alimentos y Nutrición. En la planta alta se encuentran: Laboratorios de Productos naturales y Síntesis Orgánica, Química Medicinal, Calidad del Agua y Aire, Electrónica y comunicaciones, Geofísica e Hidrología, Física de la atmósfera, entre otros.

En su operación, los laboratorios cuentan con apoyo internacional, que es importante para que la investigación siga creciendo. El 90% de los equipos ha sido financiado por organismos internacionales. El 10% ha sido financiado por otros medios y se han solidificado con donaciones internacionales.

Son muchas las investigaciones que se desarrollan en estos laboratorios, pero por ahora solo resaltaremos las que tienen que ver con el recurso agua:

El Instituto del Canal posee un laboratorio que esta desarrollando con el Fondo de Población de las Naciones Unidas. Se trata de elaboración de un mapa Hidráulico de la Cuenca del Canal de Panamá. Este trabajo de investigación tiene que ver con el manejo futuro del suministro logístico de agua para el Canal y un mapa digital de Centroamérica.



Además, se cuenta con estudios de reservorios de agua, a través de los laboratorios de Geofísica e Hidrología, que se desarrollan con el fondo de la OIEA. Con este estudio, se podrá detectar dónde hay pocas fuentes de aguas subterráneas, para determinar el tiempo en que demorarán en vaciarse, así como las soluciones que podrían aplicar el IDAAN en estos casos para que la población no quede desabastecida.

Se aspira a que los laboratorios de la Universidad de Panamá gocen de reconocimiento internacional, de tal manera que una compañía extranjera pueda solicitar un estudio de agua, de la Atmósfera y cualquier otro tipo.

Actualmente si una empresa o persona está interesada en efectuar un estudio de cualquier materia, puede dirigirse ha la Vicerrectoria de investigación y Postgrado de la Universidad de Panamá o apersonarse ha los laboratorios, localizados en la parte posterior de la facultad de Derecho de la Universidad. El propósito es que los laboratorios hagan aportes de calidad y orientación a los dueños de industrias nacionales para que se fabriquen mejores productos. Estos laboratorios impulsarán el desarrollo científico desde la Universidad. El edificio se inauguro hace pocos años pero solo el 50% del conjunto está funcionando.

2.2 Requisitos generales para la Competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

Al hablar de los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, tenemos que hablar de la norma 17025. La Norma Cubana (1) trata de explicar estos criterios en los siguientes puntos:

Selección de Métodos:

El laboratorio debe utilizar métodos de ensayo y/o calibración, incluyendo métodos de muestreo, que satisfacen las necesidades del cliente y que sean apropiados para los ensayos y/o calibraciones que realiza. Preferentemente deben ser utilizados los métodos publicados como normas internacionales, regionales o nacionales. El laboratorio debe asegurar que utiliza la última edición válida de las normas a menos que no sea apropiado o posible. Cuando sea necesario, las normas deben completarse con detalles para asegurar su correcta aplicación.

Cuando el cliente no especifica el método a utilizar, el laboratorio debe seleccionar métodos apropiados que hayan sido publicados, en normas internacionales, regionales o nacionales, o por organizaciones técnicas de prestigio, o en textos o revistas científicas concernientes, o de acuerdo a las



especificaciones del fabricante del equipo. Los métodos desarrollados o adoptados por el laboratorio pueden ser usados también si son apropiados para el uso previsto si son validados. El laboratorio debe confirmar que puede operar correctamente los métodos normalizados, antes de introducir los ensayos o calibraciones. Si el método normalizado cambia, la confirmación debe ser repetida.

El laboratorio debe informar al cliente cuando el método propuesto por el mismo se considere inapropiado o desactualizado.

Métodos desarrollados por el laboratorio:

La introducción de métodos de ensayo y calibración desarrollados por el laboratorio para su propio uso debe ser una actividad planificada y debe ser asignada a personal calificado, provisto de los recursos adecuados.

Los planes deben ser actualizados en el desarrollo del proceso y debe ser asegurada una comunicación efectiva entre todo el personal involucrado.

Métodos no normalizados:

Cuando sea necesario utilizar métodos que no han sido establecidos como métodos normalizados, estos deben estar sujetos aun acuerdo con el cliente y deben incluir una especificación clara de los requisitos del cliente y de los objetivos del ensayo y/o calibración. El método desarrollado debe ser validado apropiadamente antes de ser utilizado.

NOTA: Se deberían desarrollar procedimientos para los nuevos métodos de ensayo y/o calibración antes de que los ensayos y/o calibraciones sean realizados y deben contener al menos la siguiente información:

- a) identificación apropiada
- b) alcance
- c) descripción del tipo de objeto a ensayar o calibrar
- d) parámetros o magnitudes y rangos a ser determinados
- e) aparatos y equipos, incluyendo requisitos técnicos para su funcionamiento
- f) patrones de referencia y materiales de referencia requeridos
- g) condiciones ambientales requeridas y cualquier período de estabilización necesario
- h) descripción de procedimiento, incluyendo:
 - colocación de marcas de identificación, manipulación, transportación, almacenamiento y preparación de los objetos de ensayo y/o calibración
 - comprobaciones previas antes de iniciar el trabajo
 - comprobaciones sobre el correcto funcionamiento de los equipos y donde se requiera, calibración y ajuste del equipo antes de su uso
 - método para registrar las observaciones y los resultados



- cualquier medida de seguridad a observar
- i) criterios y/o requisitos para la aceptación / rechazo
- j) datos a ser registrados y método de análisis y presentación
- k) incertidumbre o el procedimiento para estimarla

Validación de métodos:

La validación es la confirmación, a través del examen y la presentación de evidencias objetivas, de que se cumplen totalmente los requisitos particulares para un uso específico previsto.

El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos diseñados / desarrollados por el laboratorio, métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto y las ampliaciones y modificaciones de métodos normalizados para confirmar que los métodos son apropiados para el uso previsto. La validación debe ser tan extensa como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo o campo de aplicación dado. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento empleado para la validación y una declaración sobre la idoneidad del método para el uso previsto.



CAPITULO III MARCO TEORICO

3.1 Generalidades sobre el Nitrógeno

En las aguas naturales y en las aguas de desecho las formas en que se puede encontrar el nitrógeno son de gran interés. En orden decreciente de su estado de oxidación mencionaremos al nitrato, nitrito, amonio y nitrógeno orgánico. Todas estas formas del nitrógeno, al igual que el nitrógeno gaseoso (N_2), son bioquímicamente intercambiables y son componentes del ciclo del nitrógeno. El total de nitrógeno oxidado es la suma de nitratos y nitritos cuantificados en forma de nitrógeno.

Generalmente, el nitrato puede encontrarse a nivel de trazas en aguas superficiales, pero puede alcanzar altos niveles en aguas subterráneas. En cantidades excesivas puede contribuir a una enfermedad conocida como metamoglobinemia en infantes.

El nitrato se encuentra en pequeñas cantidades en aguas de desecho frescas y de origen doméstico pero en fuentes de nitrificación en Plantas de tratamiento biológico, el nitrato puede encontrarse en concentraciones por arriba de 30 mg N- NO_3^- /L. Este es un nutriente esencial para algunos autótrofos fotosintéticos y en algunos casos puede ser relacionado con su crecimiento e identificado como limite de nutrientes.

3.2 Principio del método de Reducción por Columna de Cadmio

El nitrato NO_3^- es reducido casi cuantitativamente a nitrito en presencia de cadmio. Este método es útil comercialmente cuando se usa gránulos de cadmio (Cd) tratado con sulfato de cobre hasta formar una cubierta de cobre.

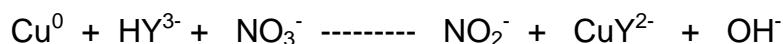
El nitrito producido de esta manera, es determinado por diazonización con sulfamida junto con N-(1_naphthyl) ethylenediamine hasta formar un complejo **azo** altamente coloreado que es medido espectrofotométricamente. Una corrección puede ser realizada empleando cualquier nitrito, analizado sin el paso de reducción.

El rango aplicable del método es 0.04 hasta 4.43 mg/L de nitratos (0.01 a 1.0 mg N- NO_3^- /L) donde otros métodos carecen de sensibilidad adecuada (16).

En este método de reducción heterogénea, la determinación de nitratos se realiza en 2 etapas.



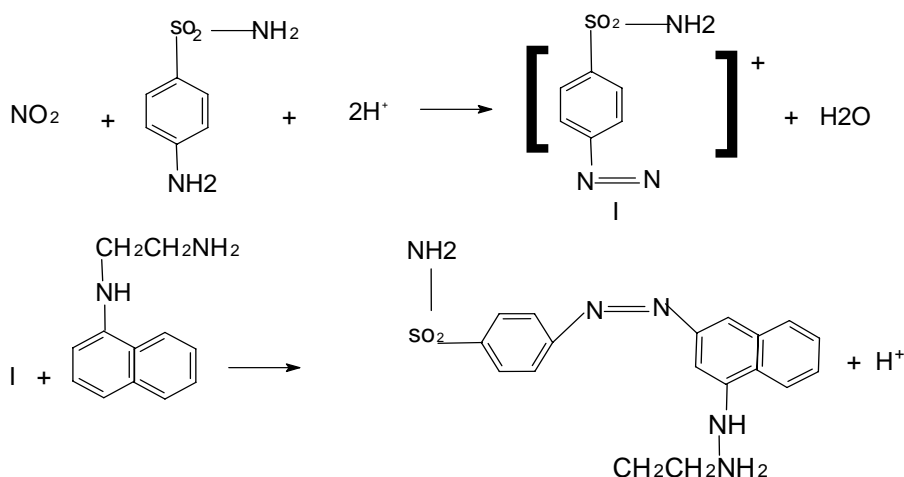
Primera Etapa: Reducción heterogénea del Nitrato a Nitrito. Esta etapa es llevada a cabo en una columna rellena de granos de metal Zn o Cd luego se hace depositar químicamente cobre sobre los granos del metal soporte. Para reducir el nitrato es necesario utilizar un medio complejante como el EDTA. La reacción que se lleva a cabo es:



El reductor(Cu-Cd) tiene diferentes formas y tamaños (16).

La ventaja de este reductor es que utiliza poca cantidad de muestra y el tiempo de reducción es corto con un equipo sencillo.

Segunda Etapa: Determinación del nitrato por la formación de un azo compuesto.



La cantidad de azo compuesto formada es proporcional a la concentración inicial de nitrito. La solución colorada debe medirse a 540 nm



CAPITULO IV PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentos, Materiales y Equipo:

4.1.1 Instrumentos:

- Columna de Reducción.
- Spectronic-Genesis 2: para ser usado en una longitud de onda de 540 nm.
- PHmetro, Hanna Instruments.

4.1.2 Cuadro de reactivos y sus especificaciones:

Reactivos	Marca	% de Pureza
1. Nitrato de potasio, KNO_3	ISO Merck	99.0%
2. Nitrito de Sodio, NaNO_2	ISO Merck	99.0%
3. NH_4Cl	ACS, ISO Merck	99.8%
4. EDTA	Fisher Chem Alert Guide	99%
5. N-dihidrocloruro de 1-naftiletelendinamina (N-NED).		97%
6. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Merck	99.0 –100.5%
7. Sulfamida	Merck pro analysi	99%
8. HCl fumante	Merck	37%
9. NH_3	Merck	25%
10. Gránulos cadmio	Merck	-----

4.1.3 Reactivos y soluciones preparadas:

- Reactivo de Sulfamida,
- N-dihidrocloruro de 1-naftiletelendinamina (N-NED).
- Solución Cloruro de amonio-EDTA.
- Solución diluida de Cloruro de amonio-EDTA.
- Ácido Clorhídrico, HCl, 6N.
- Solución de sulfato de cobre, 2%.
- Solución Madre de Nitrato.
- Solución Estándar de nitrato.
- Solución madre de nitrito.
- Solución Estándar de nitrito.



4.1.4 Cristalería

Matraces volumétricos de 100 ml, Kimax, clase A +/- 0.08.
Matraces volumétricos de 100 ml, Pirex, clase A +/- 0.08.
Matraces volumétricos de 100 ml, Pirex, Tolerancia +/- 0.16
Matraces volumétricos de 50 ml, Pirex
Pipeta de 25 ml, Kimax, clase A Tolerancia +/- 0.03
Pipeta de 10 ml, Precicolor.
Pipeta de 1 ml, Kimax, Tolerancia +/- 0.04
Matraz volumétrico de 1000 ml, Pirex, clase A +/- 0.03
Matraz volumétrico de 500ml, Kimax, clase A +/- 0.08.

4.2 Preparación de Soluciones:

1. Solución Madre de Nitrato: Secar KNO_3 en un horno a 105°C por 24 horas. Disuelva 0.7218 g en agua y diluya a 1000ml. Preservar con 2ml de Cloroformo CHCl_3/L . Esta solución es estable por lo menos 6 meses.
2. Solución Madre de Nitrito: Secar NaNO_2 en un horno a 105°C por 24 horas. Disuelva 0.4929 g en agua y diluya a 1000ml. Preservar con 2ml de Cloroformo CHCl_3/L . Esta solución es estable por lo menos 3 meses.
3. Solución Estándar de Nitrato: : A partir de la solución madre de nitrato de potasio, disuelva 50 ml de esta, en un volumétrico de 500 ml con agua destilada.
4. Solución Estándar de Nitrito: A partir de la solución madre de nitrito de sodio, disuelva 50 ml de esta, en un volumétrico de 500 ml con agua destilada.
5. Reactivo de Sulfamida: Disuelva 5g de sulfamida en una mezcla de 50 ml de HCl concentrado y 300 ml de agua, luego diluir con agua hasta 500 ml.
6. Sol. NED-dihidrocloro: Disuelva 500ml de Ned-hidrocloro en 500 ml de agua. Almacene la solución en un frasco cerrado oscuro . Reemplace cada mes o tan pronto desarrolle un color chocolate. Prepare curvas de calibración para cada nuevo paquete de Ned-dihidrocloro .
7. Sol. Cloruro de Amonio –EDTA: Disuelva 13 g de cloruro de amonio y 1.7 g de EDTA en 900 ml de agua. Ajuste el pH a 8.5 con NH_4OH concentrado y diluya a un litro.
8. Solución diluida de NH_4Cl -EDTA: Diluya 500 ml de la solución de cloruro de amonio-EDTA hasta 500ml con agua.



4.3 Condiciones Experimentales:

1. Flujo constante durante todo el análisis, cuyo valor oscile entre 7 y 10 ml/minuto.
2. Tiempo de desarrollo del color, 1ra etapa para la sulfamida 2 minutos
3. Tiempo de desarrollo del color, 2da etapa para el reactivo NED 10 minutos.

Nota: la concentración de los estándares fue preparada, expresando la concentración nitrógeno como nitratos (N-NO_3 mg/L), excepto para la prueba Interlaboratorio.

4.4 Preparación de la Columna de Reducción:

Se lavaron 25 gramos de gránulos Cd-Cu con HCl 6N y se enjuagó con agua destilada. Agitar suavemente el Cd con 100ml de solución de CuSO_4 2% por 5 minutos o hasta un color parcialmente azul. Se decantó. Se vuelve adicionar la solución de cobre recién preparada, hasta el desarrollo de un precipitado coloidal parcialmente azul. Luego se lavaron los gránulos de Cd-Cu copiosamente con agua por lo menos 10 veces hasta remover todo precipitado de Cu.

Se insertó lana de vidrio hasta el fondo de la columna de reducción y llenar con agua. Se añadió suficientes gránulos Cu-Cd hasta producir una columna de 16cm de largo. Manteniendo el nivel del agua en la columna por encima del Cu-Cd para prevenir trampas de aire. Se lavó la columna con 200 ml de solución $\text{NH}_4\text{Cl-EDTA}$ diluida. El flujo debe oscilar entre 7 y 10 ml/L.

Se activó la columna haciendo pasar una solución compuesta de 25 ml de estándar de nitrato de 1 mg/L y 75 ml de solución concentrada de $\text{NH}_4\text{Cl-EDTA}$ tratando de obtener el flujo anterior.

4.5 Tratamiento previo de la muestra:

Si la muestra presenta turbiedad hacerla pasar a través de un filtro con diámetro de poro $0.45 \mu\text{m}$ o filtre con fibra de vidrio. Se añadieron 75 ml de la solución concentrada de amonio-EDTA, asegurándose obtener un pH 7 y 9.

4.6 Medición del Flujo

Antes de iniciar cualquier análisis se debe medir el flujo; el cual depende de la altura del liquido en el extremo ancho de la columna de reducción.

Primero se buscó la altura del extremo más ancho de la columna (ver figura #1), en la que debe mantenerse la solución de nitrato vertida para obtener un flujo constante, que puede oscilar entre 7 a 10 ml/ minuto. Se vertió dentro de la columna una solución de cloruro de amonio-EDTA diluida, y luego se midió el volumen utilizando una probeta graduada de 10 ml y un cronometro. La altura



de bulbo o parte más ancha de la columna que corresponde al flujo deseado, se marca. Todas las soluciones que pasen por la columna deben mantenerse a esta altura durante todo el análisis. Este procedimiento debe hacerse cada día antes de utilizar la columna.

4.7 Proceso de reducción de la muestra:

Se tomaron 25 ml de la muestra se añadieron 75 ml de la solución de $\text{NH}_4\text{CL-EDTA}$ y se mezclaron. Se vertió la mezcla dentro de la columna y se descartaron los primeros 25 mL manteniendo un flujo de 9 ml / minuto. Luego se colectaron 50 ml.

4.8 Desarrollo del Color:

Inmediatamente después de la reducción, se añadió el reactivo de Sulfamida a 50 ml de la muestra, dejando reaccionar 2 minutos. Luego se añadió el reactivo NED-dihidrocloro mezclando inmediatamente. Después de 10 minutos se midió la absorbancia a 540 nm utilizando agua destilada para la calibración del cero de absorbancia.

4.9 PROCEDIMIENTO PARA PREPARACIÓN DE CURVA DE CALIBRACION:

4.9.1 Comparación de un Estándar de Nitrato con un Estándar de Nitrito

En este punto, se construyeron dos curvas de calibración; una a partir de nitrato de potasio KNO_3 y la otra utilizando nitrito de sodio NaNO_2 .

La primera curva se preparó usando la solución estándar de nitrato de potasio en concentración de 10 mg/L, preparando estándares en un rango de 0.05 a 1.0 mg/L. Se tomaron las siguientes alícuotas diluyendo con agua desionizada a 100 mL en frascos volumétricos: 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10 ml. Por cada solución se toma una alícuota de 25 ml y se afora con la solución amoniacal-EDTA concentrada en matraces volumétricos de 100 mL. Cada estándar se hizo pasar por la columna y se procedió a la medición espectrofotométrica como se describió en el caso de la muestra.

La segunda curva se preparó usando la solución estándar de nitrito en el mismo rango de concentraciones, de 0.05 a 1.0 mg/L. Se prepararon las soluciones estándares de igual manera que en caso anterior. Estos estándares no pasan por la columna, sino que inmediatamente se le adicionan los reactivos para el desarrollo del color y se miden sus absorbancias a 540 nm en el espectrofotómetro.



4.9.2 Repetibilidad de la medición del instrumento con estándar puro.

Para estudiar la Repetibilidad de las mediciones se utilizaron tres soluciones estándar de KNO_3 en concentración 0.5 mg / L. Cada solución estándar se toman tres alícuotas de 25 mL y se aforan con la solución de cloruro de amonio-EDTA en un matraz volumétrico de 100 mL. Cada alícuota se hizo pasar por la columna de reducción, se añadieron los reactivos para el desarrollo del color tal a como se tiene establecido en el procedimiento descrito anteriormente. Luego se midieron las absorbancias respectivas a 540 nm, repitiendo la lectura 5 veces para cada alícuota. Esta operación se realizó durante 5 días consecutivos.

4.9.3 Repetibilidad del método

Se preparó una curva de calibración con el estándar de KNO_3 a partir de las siguientes concentraciones 0.1, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg /L, en matraces volumétricos de 100 ml. Para las espectrofotométricas se procedió como en c y d. Se determinó el modelo de calibración.

Se tomaron 5 alícuotas de 25 ml de la muestra de agua subterránea y se vertieron en sus respectivos matraces volumétricos de 100 ml; y luego se aforo con la solución de NH_4Cl -EDTA concentrada. Se pasó por la columna de reducción y se procedió como se describe en la metodología. La concentración nitrato en la muestra se determinó aplicando el modelo de calibración anterior.

4.9.4 Estudio de linealidad

Se prepararon un blanco y 10 estándares a partir de la solución madre de KNO_3 (100 mg/l) diluyendo los siguientes volúmenes: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1.0 ml; con agua destilada y desionizada en matraces volumétricos de 100 ml. De cada estándar se toma una alícuota de 25 ml y se aforan con solución de NH_4Cl -EDTA concentrada.

El blanco más las 10 soluciones estándares se hacen pasar por la columna de reducción; según el procedimiento descrito en la metodología. Este procedimiento se repite durante 5 días consecutivos.

4.9.5 Efecto de la Adición de estándares a una muestra



Para esta prueba se realizaron dos curvas de calibración. Una a partir estándar de nitrato de potasio (curva normal, CN) y la otra adicionando estándar a la muestra, Curva Adición Patrón, AP).

Curva normal:

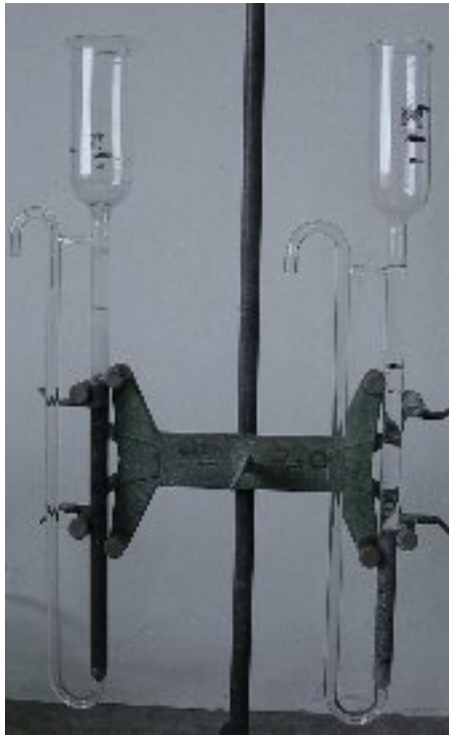
A partir de la solución madre de KNO_3 se toman alícuotas de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1.0 ml y se diluyen con agua destilada en matraces de 100 ml. De estas soluciones se toman alícuotas de 25 ml y se aforan con solución de $\text{NH}_4\text{Cl-EDTA}$ concentrado y luego se aplica el procedimiento descrito en la metodología para la reducción de las muestras.

Curva Adición Patrón:

Se determina por medio de 5 replicas el contenido del analito en la muestra con el método a validar, una vez conocido el contenido promedio se procede a enriquecer la muestra con estándar.

A partir de la solución madre se tomaron los siguientes volúmenes 0.4, 0.5 y 0.6 ml y se aforaron con la muestra en matraces volumétricos de 100 ml. De cada estándar se toman 25 ml y se afora con solución $\text{NH}_4\text{Cl-EDTA}$ concentrada. El blanco se prepara con una alícuota de 25 ml de la muestra sin adicionar estándar y se afora con solución de $\text{NH}_4\text{Cl-EDTA}$ en un matraz volumétrico de 100ml.

Reducción con Columna de Cadmio



Muestras producto de la reducción



Figura # 1

CAPITULO V RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Calibración de Materiales Volumétricos y Balanza Analítica

Antes de la realización de los análisis se procedió a calibrar la balanza analítica y el equipo volumétrico, por lo que se utilizó la ayuda del programa Microsoft Excel para el tratamiento de los datos de calibración y obtener las ecuaciones que indican el valor real leído. El modelo de calibración obtenido para la balanza analítica fue el siguiente: $y = 0.002377142 + 1.000104047 (x)$. De acuerdo a la prueba de Significancia para el intercepto y la pendiente, se logró probar que el intercepto es igual de cero y la pendiente es igual a la unidad, lo que indica que la balanza está bien calibrada y por lo tanto no es necesario la corrección de las lecturas. Los Resultados se presentan en ANEXO #1. Se utilizó material volumétrico calibrado.

Asimismo, se seleccionó la longitud de onda óptima con una solución de nitrato de potasio 0.1 mg/L, haciéndola pasar por la columna de reducción obteniéndose un máximo de 0.147 a una longitud de onda de 541 nm. Ver gráfico en ANEXO #2

5.2 Error Fotométrico.

Para determinar el rango de absorbancia de mayor precisión y exactitud en el que se debe trabajar; se evaluó el error relativo de concentración o error fotométrico en función de las absorbancias, como puede observarse en la figura #2.

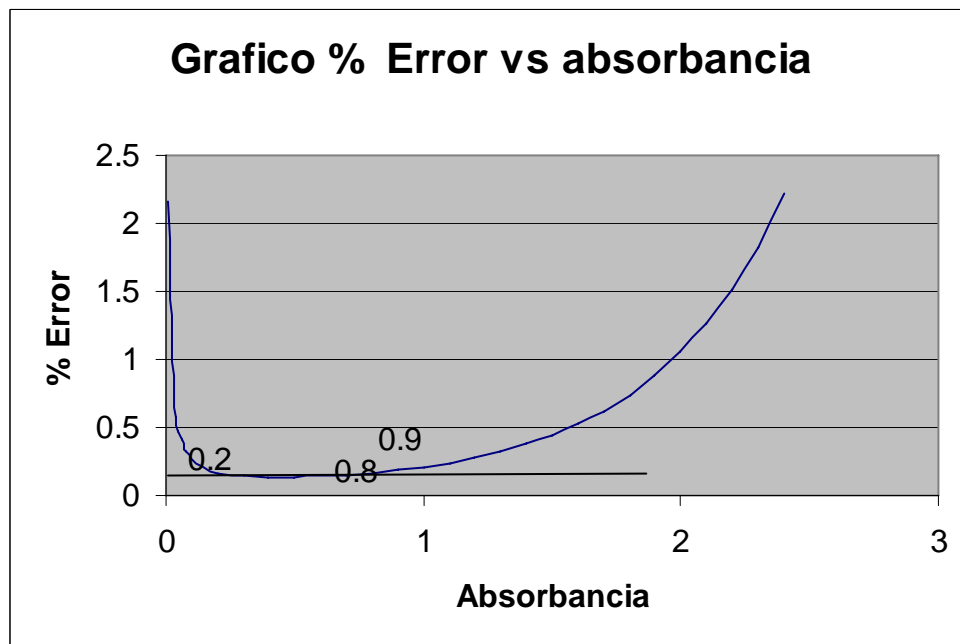


Figura #2: Error fotométrico como porcentaje en función de las absorbancias. (ver datos en anexo #5)

En esta figura se muestra el error fotométrico como porcentaje ($\frac{\Delta A}{A} \times 100/A$) en un intervalo de absorbancias que va desde 0.01 a 2.5. El gráfico fue obtenido aplicando la ecuación (1) La desviación estándar fue obtenida, leyendo 15 veces la solución de KNO_3 , de concentración igual a $0.5 \text{ mg NO}_3 / \text{L}$ ($S_T = 4.87 \times 10^{-4}$).

$$\frac{\Delta A}{A} 100 = \frac{100 S_T}{2.303(A)10^{-A}} \quad \text{Ec. (1)}$$

Como puede observarse, en el intervalo de 0.2 a 0.8 de absorbancia se produce el menor error fotométrico cuyo valor es $< 0.168\%$. Por lo tanto, las soluciones de trabajo se prepararon de tal forma que las concentraciones proporcionaran lecturas en este intervalo de absorbancias. Para concentraciones de nitrato que tengan una absorbancia menor a 0.2 se ve afectada la precisión en el ruido fotométrico, mientras que para absorbancias mayores que 0.8, es la exactitud fotométrica la que influye en las lecturas (18)(19)(20)

5.3 Estudio de Ruido de Fondo utilizando blanco

Con el objeto de verificar la aleatoriedad de la señal de fondo durante los procesos de medición, se estudio la repetibilidad de la señal del blanco en diferentes días y se construyo una carta control con el fin de controlar la calidad de las mediciones durante las experiencias. Los resultados se muestran en la tabla #1 y el gráfico de control o carta de control se presentan en la figura #3. Como puede verse los límites de tolerancia de la carta de control se construyeron tomando en cuenta la media global y la desviación estándar global. Como límite central se toma la media global y como límites superior e inferior se toman $\pm 2S_r$ y $\pm 3S_r$ desviaciones estándares (ver tabla #2).

Tabla #1. Valores de Replicas del blanco durante 5 días

	Dia1	Dia2	Día 3	Dia4	Dia5
replicas	abs	abs	abs	abs	abs
1	0.009	0.009	0.011	0.010	0.010
2	0.010	0.008	0.011	0.010	0.011
3	0.010	0.009	0.011	0.010	0.010

Tabla #2 Límites de control

MEDIA GLOBAL	0.010
+3Sr	0.01258448
+2Sr	0.01170076
-2Sr	0.0081659
-3Sr	0.00728219

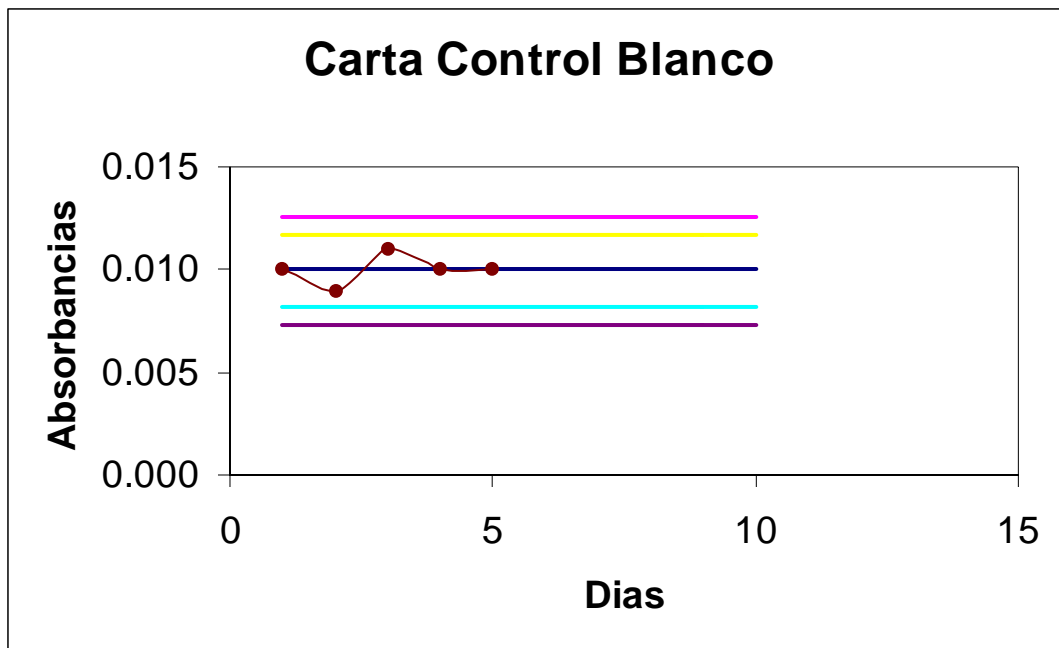


Figura #3. Carta Control Blanco, construida a partir de la grafica

Como puede Observarse los promedios de los 5 días caen dentro de los limites de seguridad $\pm 2S$. Esta carta control fue de gran utilidad para verificar la aleatoriedad del ruido de fondo de las lecturas espectrofotométricas durante la realización del presente trabajo.

5.4 Comparación de estándar de nitrato con un estándar de nitrito.

Para ver el efecto de la columna reductora sobre el nitrato, se construyeron dos curvas de calibración. La primera curva con una solución de nitrito puro que no pasa por la columna reductora de cadmio-cobre y la otra curva con una solución de nitrato que pasa por la columna para convertirse a nitrito.

En la figura #4 se presentan las dos curvas, observándose que la de nitrito tiene una pendiente mucho mayor. Para la curva de nitrito de sodio en el intervalo de concentraciones de 0.05 a 1.0 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ se obtienen lecturas de absorbancia que van desde 0.003 hasta 2.890. En esta curva se pueden observar desviaciones negativas de la ley de Beer, para absorbancias mayores de 1, (esto es a partir de la concentración de 0.5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$), donde ya no se obtiene buena linealidad, el coeficiente de determinación es de 0.9922, es decir un 99.22 % de linealidad; el modelo que mejor se ajusta en este caso es el cuadrático, como puede verse en la figura #5. Sin embargo, en la curva de nitrato de potasio, cuando el nitrato pasa por la columna para convertirse en nitrito, se puede ver que en todo el intervalo de concentraciones, existe buena linealidad, cuyo coeficiente de correlación es 0.9991 (99.91 % de linealidad). La máxima absorbancia que se obtiene en este caso es un



valor de 0.744. Ver las tablas #3 y #4 para comparar los valores de absorbancia para ambas curvas.

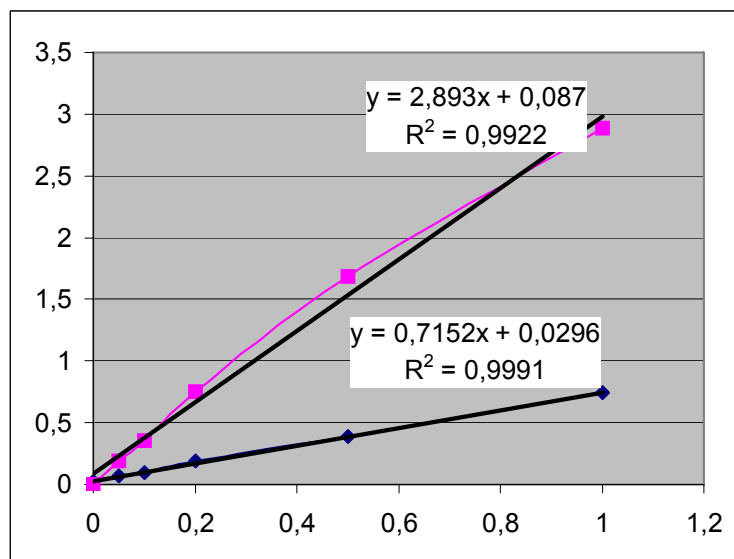


Figura #4. Curvas de calibración para nitrato y nitrito
a) curva de NaNO_2 $y = 2.893x + 0.087$
b) curva de KNO_3 $y = 0.7152x + 0.0296$

Tabla #3. Calibración de KNO_3

Conc.	abs
0	0.026
0.05	0.068
0.1	0.091
0.2	0.187
0.5	0.385
1	0.744

Tabla #4. Calibración NaNO_2

Conc.	abs
0	0.003
0.05	0.188
0.1	0.356
0.2	0.748
0.5	1.689
1	2.89

Ahora, si se compara la pendiente de la parte lineal de la curva de nitrito con la de nitrato (figura #6), se puede pensar, que cuando el nitrato pasa por la columna de reducción, no todo el nitrato es convertido a nitrito, eso significa que la columna no es tan eficiente. Según la literatura (16) la eficiencia deber ser al menos del 75 por ciento. Si se relacionan las pendientes (nitrato/nitrito) se obtiene una eficiencia experimental de alrededor del 20 %, muy por debajo de lo que establece la literatura. Sin embargo, la determinación de nitrato en las muestras de aguas no se ven afectadas, puesto que tanto el estándar como la muestra sufren el mismo proceso. Debido a limitaciones económicas y ambientales del laboratorio donde se llevó a cabo esta experiencia no se pudo optimizar la columna.

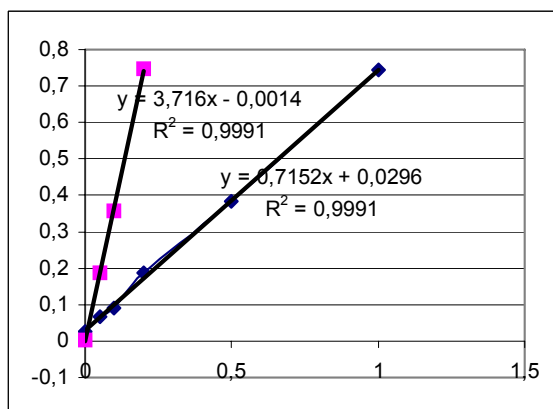
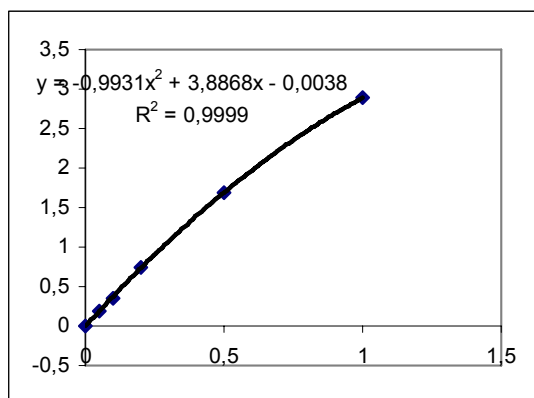


Figura #5. Curva cuadrática de NaNO_2 de Figura #6: Curvas del nitrito y nitrato.

5.5 Estudio de Repetibilidad de la Medición del Instrumento con Estándar Puro

Con el objeto de ver si hay repetibilidad en la medición del instrumento se realizaron mediciones durante 5 días según el diseño presentado en la tabla #5, donde se observan los valores de absorbancia obtenidos cada día. A los datos se le aplicó la prueba de Hubber(7) para detectar puntos outliers o valores aberrantes. La concentración de nitrato elegida fue 0.5 mg/L.

TABLA #5: Resultados de las mediciones en absorbancia para una solución estándar 0.5 mg/L de nitrógeno como nitrato.

Repeticiones	DIA1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5
1	0.357*	0.371	0.373	0.380	0.404
2	0.391	0.388	0.399	0.414*	0.392
3	0.410*	0.387	0.402	0.419*	0.402
4	0.397	0.386	0.393	0.372	0.377
5	0.383	0.394	0.363	0.393	0.383
6	0.394	0.377	0.368	0.380	0.371
7	0.389	0.361	0.383	0.368	0.385
8	0.387	0.389	0.375	0.373	0.398
9	0.395	0.361	0.365	0.380	0.402

*) outliers, o valores aberrantes.

Para estudiar la repetibilidad de las mediciones o lecturas espectrofométricas, es necesario demostrar que las varianzas son homogéneas y que no existen diferencias significativas entre los resultados de cada día. Las pruebas estadísticas utilizadas son el Test de Bartlett (21)(7) para comparar las



varianzas y el Análisis de Varianza de 1 Factor (ANOVA-1F) (7)(8) para las medias.

Los resultados de estas dos pruebas se pueden ver en las tablas #6 y #7. Para el caso de Test de Bartlett se puede ver que el parámetro experimental calculado M , llamado parámetro de Bartlett, es menor que la Chi-Cuadrada (χ^2) al 95 por ciento de nivel de confianza. Lo que significa que las varianzas son iguales. Para el caso del ANOVA-1F, puede verse que el parámetro experimental de Fischer (F_c) es menor que el de las tablas al 95 % de nivel de confianza, por tanto no existen diferencias significativas entre las medias de cada día.

En estas condiciones, se puede elaborar la carta de control con el fin de verificar la aleatoriedad de las lecturas del espectrofotómetro durante el proceso de análisis de rutina del nitrato en las muestras de agua.

Tabla #6 Resultados de la prueba de Test de Bartlett

Parámetro de Bartlett	$M =$	7.378313
Chi-Cuadrada a 95%	χ^2	9.49

TABLA #7. RESULTADOS DE ANOVA DE UN FACTOR

Fuente de variación	S.C.	G.L.	C.M.	Fc	F 5%	Significancia
Entre días	0.00128291	4	0.000321	2.46399	2.61	no
Dentro de días (residual)	0.00468597	36	0.00013			
total	0.00596888	36	0.000149			

El valor de F_c se obtiene por la razón entre la cuadrática media (CM) de los resultados entre los días y los obtenidos por días (o lecturas del espectrofotómetro) el cual es 2.46399. El valor de F 5% se obtiene de las tablas estadísticas de Fischer (2.61, Ver en tabla #7).

La desviación estándar de repetibilidad se denomina (S_r) se obtiene aplicando la raíz cuadrada a la cuadrática media total, que puede expresarse como RSD % como se ven en la tabla #8:

Tabla # 8. Resultados de Repetibilidad

S_r	0.012216
RSD%	3.183236

En base a los resultados obtenidos en Bartlett y ANOVA, se ve que no hay diferencias significativas entre las varianzas ni las medias, por lo tanto, podemos afirmar que el método tiene una repetibilidad del 3 %.

Con el fin de verificar que no hay diferencias significativas entre las medias de cada día, se grafican los intervalos de confianzas mostrados en la figura #7, observándose que todas tienen puntos comunes.

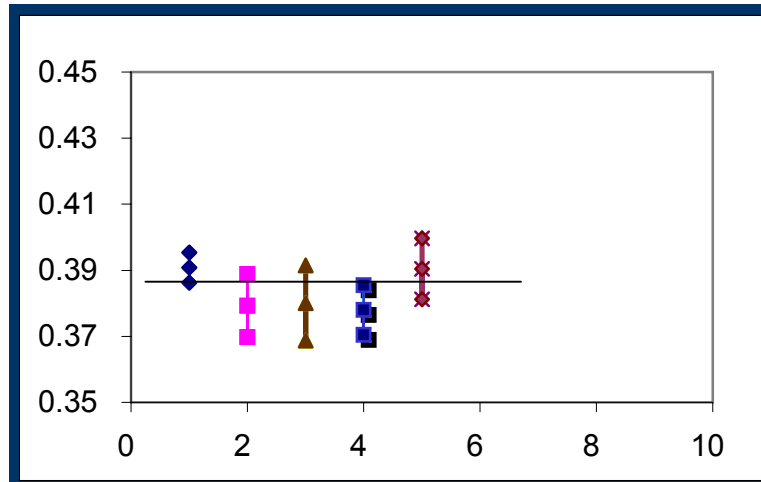


Figura #7. Intervalos de confianza para los diferentes días.

En el gráfico se puede observar que la línea central abarca o toca todos los intervalos. En la tabla #9, se puede observar los valores de los intervalos de confianza, calculados para cada día a partir de la tabla #5.

Tabla # 9. Intervalos de Confianza

S	0.00491354	0.01241974	0.01481084	0.00814453	0.01201157
GL	6	8	8	6	8
t(.975,GL)	2.447	2.306	2.306	2.447	2.306
Medias	0.39085714	0.37933333	0.38011111	0.378	0.39044444
Lim. Inf.	0.38631271	0.36978669	0.36872651	0.3704673	0.38121155
Lím. Sup.	0.39540157	0.38887998	0.39149571	0.3855327	0.39967734
# de Medias	1	2	3	4	5

La carta control se construye tomando la media global de los 5 días y tomando como límites superiores e inferiores $\pm 2S_r$ y $\pm 3S_r$. Los datos se encuentran en la tabla #10 y el gráfico de control se muestra en la figura 8.

Tabla #10. Intervalos de Carta Control

MEDIA GLOBAL =	0.38368293
+2Sr	0.40811421
+3Sr	0.42032986
-2Sr	0.35925164
-3Sr	0.347036

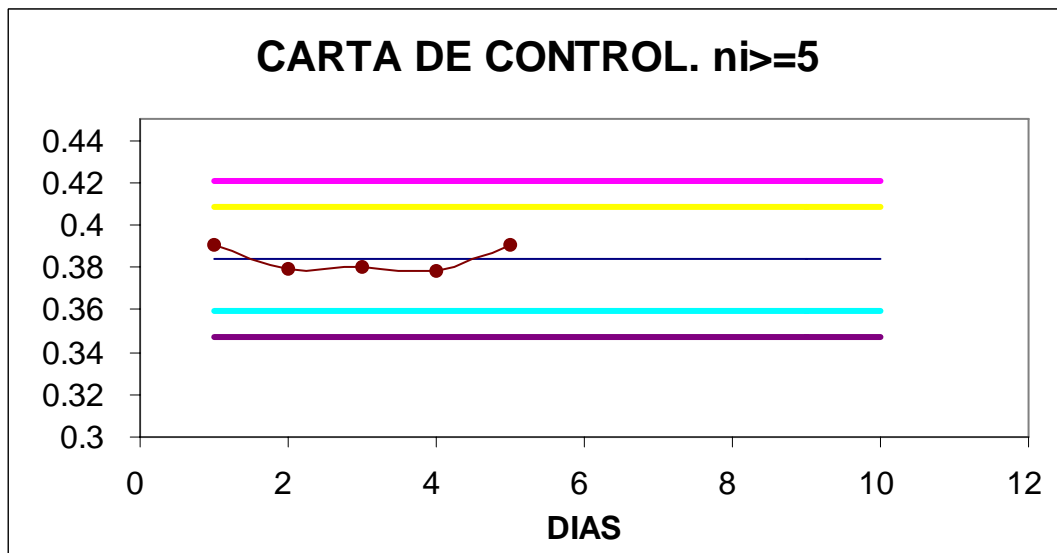


Figura #8. Carta de control para la repetibilidad de las lecturas espectrofotométricas

Como puede observarse las medias de los cinco días se encuentran dentro de los límites de seguridad de la carta de control

5.6 Estudio de Repetibilidad de Método Utilizando una Muestra de Agua.

Para estudiar la repetibilidad del método, se utilizaron muestras de agua subterránea obtenida cerca de la Barriada 2000, calle 25, Arraiján, Panamá oeste. (Ver mapa en Anexo).

El objeto de estudiar la repetibilidad del método es de verificar la aleatoriedad de las mediciones espectrofotométricas en muestras reales donde además de tomar en cuenta los componentes de la matriz, se tiene en cuenta el tratamiento que se le da a la muestra. Con los estándares puros sólo se pueden verificar la aleatoriedad de las lecturas espectrofotométricas.

Esta prueba tuvo como duración sólo un día debido al tiempo y a limitaciones del laboratorio. Se prepararon 5 muestras como se describe en la parte experimental y se leyeron 5 veces en el espectrofotómetro. Las absorbancias obtenidas se muestran en la tabla # 11. El valor que está en asterisco y que corresponde a 0.3902 UA es aberrante o outlier. En base a esto se hizo una estimación de la repetibilidad con la desviación estándar de los 4 resultados restantes. La Gráfica de control, en estas condiciones, con muestras pequeñas (21), se puede elaborar una carta control con el intervalo de confianza:

$$\bar{x} \pm \frac{t_{0.95}}{\sqrt{n}} S_r$$

Tabla # 11. Valores para la determinación de nitrato

muestras	abs.promedio
----------	--------------

M1	0.4226
M2	0.3902*
M3	0.4154
M4	0.416
M5	0.404

*) outlier.

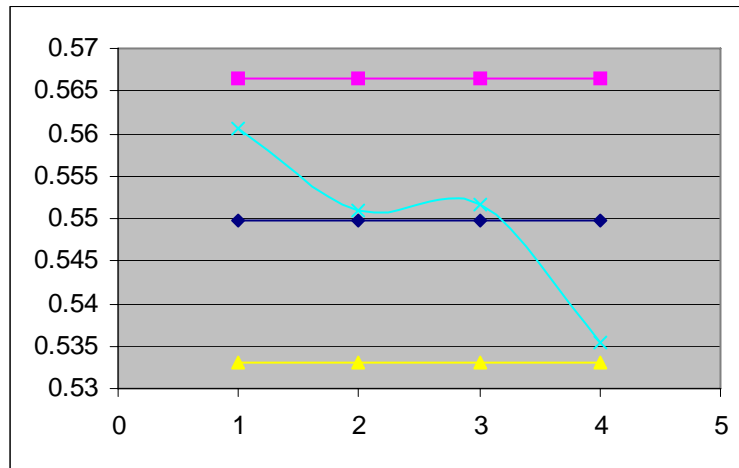


Figura #9. Carta control para la Prueba de Repetibilidad del Método

En la carta control se observa que todos los puntos se encuentran dentro de la zona de seguridad. (Los datos de la carta control, ver anexo #8)

5.7 Estudio del efecto de los factores de tiempo y la preparación de los estándares en la respuesta de la medición analítica.

Para ver el efecto de la preparación de los estándares y los días se realizó un estudio según el diseño experimental de la figura # 10.

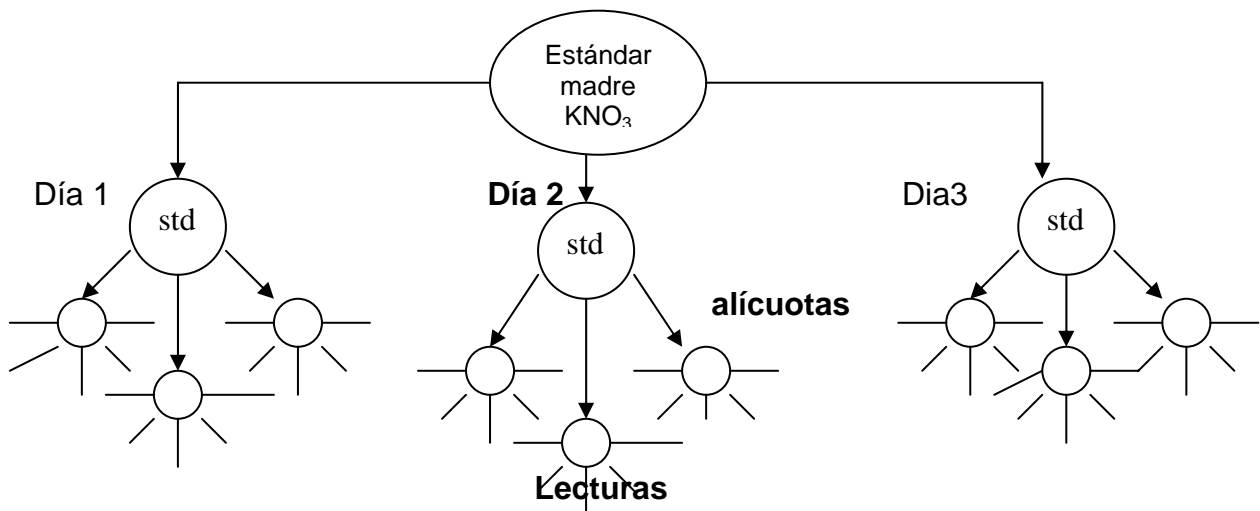


Figura # 10

De acuerdo con este diseño los resultados que se obtuvieron se presentan en la tabla #12. El análisis de varianza de 2 factores se presenta en la tabla #13, donde se puede observar que no existen diferencias significativas entre los diferentes factores; lo que significa que en un solo día y basta una sola preparación del estándar para obtener repetibilidad en las mediciones.

Tabla #12. Valores experimentales obtenidos para el análisis ANOVA de 2F.

Estándares	alícuotas	Dia1	Dia2	Dia3	Dia4	Dia5
		Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
H2O dest.		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
blanco		0.090	0.090	0.011	0.010	0.010
blanco		0.010	0.080	0.011	0.010	0.011
blanco		0.010	0.090	0.011	0.010	0.010
0.5mg/L	M1	0.357	0.371	0.373	0.380	0.404
0.5mg/L	M1	0.391	0.388	0.399	0.414	0.392
0.5mg/L	M1	0.410	0.387	0.402	0.419	0.402
0.5mg/L	M2	0.397	0.386	0.393	0.372	0.377
0.5mg/L	M2	0.383	0.394	0.363	0.393	0.383
0.5mg/L	M2	0.394	0.377	0.368	0.380	0.371
0.5mg/L	M3	0.389	0.361	0.383	0.368	0.385
0.5mg/L	M3	0.387	0.389	0.375	0.373	0.398
0.5mg/L	M3	0.395	0.361	0.365	0.380	0.402

Tabla #13. Resultados de Anova de 2 Factores

Fuente de variación	CM	GL	Fc	FA 5%	Significancia
Días	0.000346	2	2.652199	3.55	No
Estándar	0.00390	2	2.990922	3.55	No
Interacción	0.000253	4	1.938156	2.93	No
lecturas	0.000131	18			

Ver que $F_c < F_{A\ 5\%}$ y por lo tanto no hay significancia.

5.8 Linealidad

La linealidad del modelo de calibración está determinada por el coeficiente de determinación (R^2), una linealidad ideal indica un valor de $R^2 = 1$, esta condición es importante en los análisis con espectrofotómetros, ya que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del analito y a través de una curva de calibración se puede hallar una concentración desconocida. (Ver los R^2 en la tabla # 14).

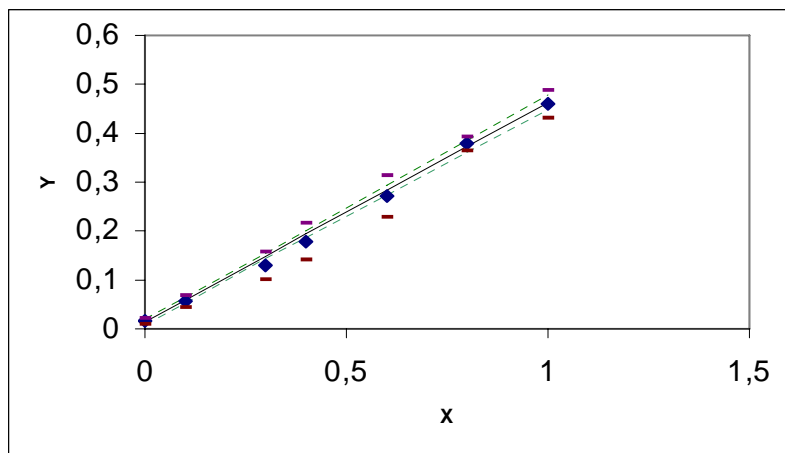
5.9 Estudio de variación del flujo en las curvas de calibración

Con el fin de mostrar la importancia de mantener el flujo constante; se realizó un estudio de la variación del flujo de la columna reductora y su influencia en las curvas de calibración.

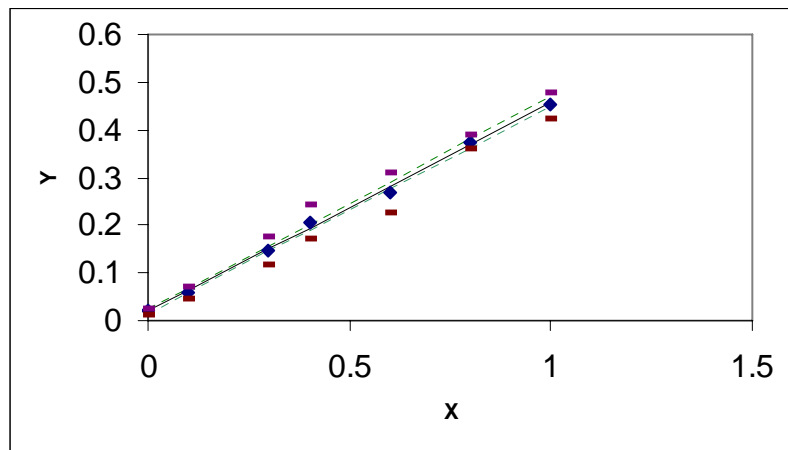
Según la bibliografía, la variación del flujo en la columna debe mantenerse en el intervalo entre 7 y 10 ml/ minuto para obtener los mejores resultados. Con el objeto de ver el efecto de la variación del flujo en la curva de calibración, este se estudio durante 3 días consecutivos haciendo variar los flujos en el intervalo especificado en la literatura (16).

La Anexo #4, muestra los resultados para los diferentes días. En estas tablas se evaluaron las varianzas para cada punto de la curva, demostrándose heterogeneidad en las varianzas. Por lo tanto, es necesario aplicar el análisis de regresión lineal ponderado.

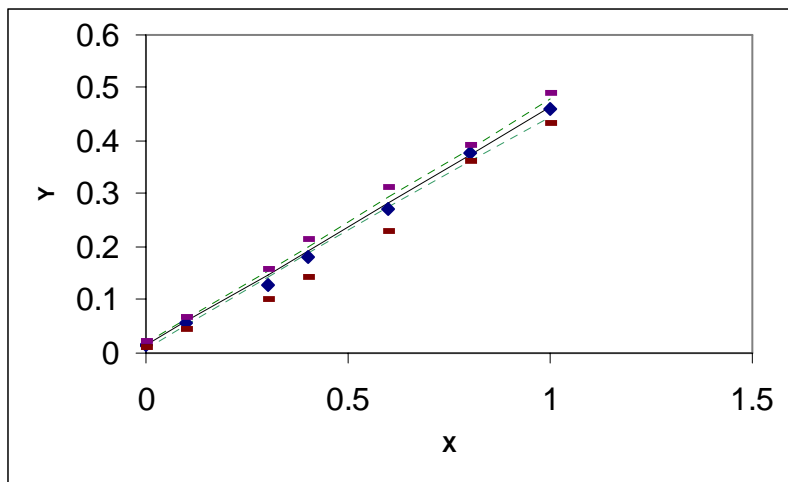
Los resultados de la regresión pueden verse en las figuras # 11 ,12 y 13 respectivamente. En las curvas de las figuras se puede observar, que en la mayoría de los casos, a medida que aumenta la concentración aumenta la dispersión de los resultados.



**Figura #11. Análisis de regresión lineal ponderada Día
Variación del flujo 9.2 a 7.8 ml/ minuto**



**Figura #12. Análisis de regresión lineal ponderada Día 2
Variación del flujo 9.2 a 7.8 ml/ minuto**



**Figura #13. Análisis de regresión lineal ponderada Día 3
Variación del flujo 9.2 a 7.4 ml/ minuto.**

A través de esta prueba, nos dimos cuenta que el flujo es un parámetro que afecta directamente a la linealidad y por ende a la concentración; ya que para una misma concentración se obtienen valores dispersos de absorbancia. A partir de esto, cuando se decidió trabajar a flujo constante se observó que la linealidad mejoró significativamente en las curvas de calibración.

5.10 Estudio de Linealidad controlando el flujo de la columna de reducción

Debido a los problemas de la repetibilidad de la linealidad para flujos variables, se repitieron las experiencias manteniendo un flujo constante de 8.9 mL/min durante 3 días consecutivos y dos días con un flujo de 8.6 y 8.0 ml/min



respectivamente. El rango de concentraciones de nitrato utilizado va desde 0.1 a 1.0 mg /L.

Los resultados del análisis de regresión se pueden ver en la tabla #14

Tabla #14: Parámetros de regresión y flujo de columna reductora de cadmio

Día	b0	b1	R ²	Flujo
1	0.0289	0.8142	0.9992	8.9 ml/min
2	0.0228	0.7861	0.9995	8.9 ml/min
3	0.0351	0.7795	0.9978	8.9 ml/min
4	0.0076	0.7674	0.9967	8.6 ml/min
5	0.0222	0.7098	0.9956	8.0 ml/min

Se observa que durante los 5 días los valores de R² obtenidos son muy buenos, ya que estos valores se acercan a la unidad e indican una buena linealidad para cada día.

En la figura #14, se presentan los 5 gráficos de calibración donde se observa claramente el efecto de la disminución de la pendiente en función de los días. Se puede ver que la curva de los días 4 y 5 muestran pendientes diferentes a los 3 primeros días. Lógicamente son condiciones muy diferentes, los 3 primeros días, se trabajó con un flujo de 8.9 ml/ minuto; mientras que en los días 4 y 5 se trabajó a un flujo de 8.6 y 8.0 ml/ minuto respectivamente. Como puede observarse las pendientes de los tres primeros días son más próximas que la de los días 4 y 5. En anexo #3 aparecen los datos para la construcción de las curvas de calibración.

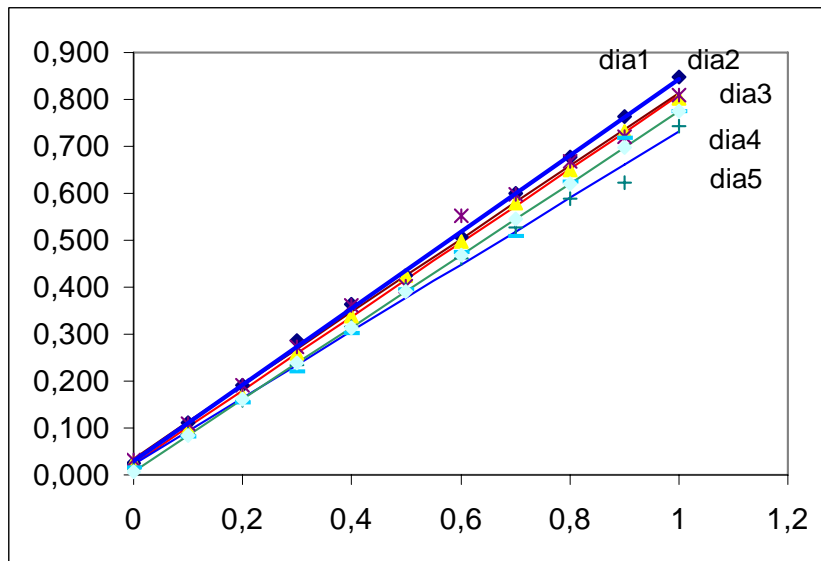


Figura #14. Linealidad vs. Días

Para estudiar bien las diferencias tanto de b_0 como b_1 , fue necesario elaborar una carta control bidimensional poniendo como ordenada b_0 y como abcisa b_1 . La curva se elaboró con 11 puntos. Con los coeficientes del modelo y sus intervalos de confianza se elaboró la carta de control. Como los parámetros b_0 y b_1 están correlacionados, la carta control más precisa debe ser una elipse (23). Los valores de b_0 y b_1 obtenidos a partir de las curvas de calibración durante el período de 5 días, son ubicados en la carta de control. Como puede observarse en la figura #15, los puntos que representan los parámetros de regresión de los tres primeros días están dentro de los límites tolerables, pero ninguno cae dentro de la elipse, eso significa que hay una pobre repetibilidad en la linealidad. En cambio los puntos que representan los días 4 y 5 están totalmente fuera control, esto quiere decir que las curvas de calibración son muy diferentes que para los tres primeros días.

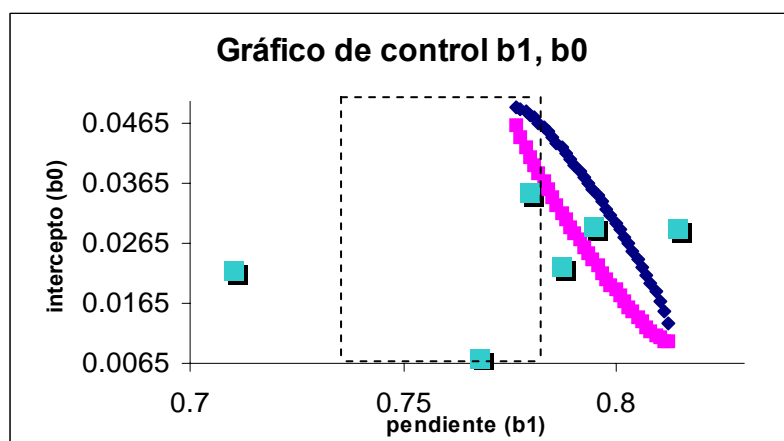


Figura #15. Carta Control de Calidad de la Curva de Calibración

En base a estos resultados es lógico pensar que no se puede usar una misma curva de calibración durante varios días; y por lo tanto, se recomendaría que para cada día se construya una nueva curva de calibración. También, podemos

observar que el cambio de flujo afecta la repetibilidad de los análisis entre días. Para verificar esta hipótesis es necesario evaluar los intervalos de confianza de las concentraciones de nitrato en aguas aplicando los diferentes modelos de calibración.

5.11 Discusión sobre el problema de dispersión de los puntos de la carta control de la figura #15.

Para observar si la falta de una buena repetibilidad en los parámetros de las curvas de calibración de los 5 días es significativa comparado con la determinación de la concentración de nitratos en la muestra de agua, se evaluaron sus intervalos de confianza utilizando los diferentes modelos de calibración de los 5 días. Los resultados se observan en la tabla #16, donde se presentan los diferentes modelos de calibración, el tipo de regresión utilizado, los intervalos de confianza y el flujo de la columna de reducción del nitrato.

Tabla #16. Diferentes modelos y los intervalos de confianza de la concentración de nitrato en la muestra de agua

Días	Y = bo +b1x	Tipo de regresión	C +/-Δ C	Flujo de columna
1	0.8142x +0.0289	simple	0.467437+/- 0.0066	8.9 ml/min
2	0.7861x +0.0228	simple	0.4921406+/- 0.0053	8.9 ml/min
3	0.7795x +0.0351	simple	0.4804128+/- 0.0115	8.9 ml/min
Promedio	0.7936x +2.72-2	ponderada	0.48194+/- 0.0146477	8.9 ml/min
Promedio	0.7945x +0.0295	simple	0.478446 +/- 0.0061	8.9 ml/min
4	0.7674x +0.0076	simple	0.5239356 +/- 0.0141	8.6 ml/min
5	0.7098x +0.0222	simple	0.5458555+/- 0.0169	8.0 ml/min

Se puede observar claramente que los intervalos de confianza de los días 4 y 5 son muy diferentes, pues el flujo de la columna influye en la pendiente y se obtienen concentraciones mayores. Esto se verifica en la figura #16.

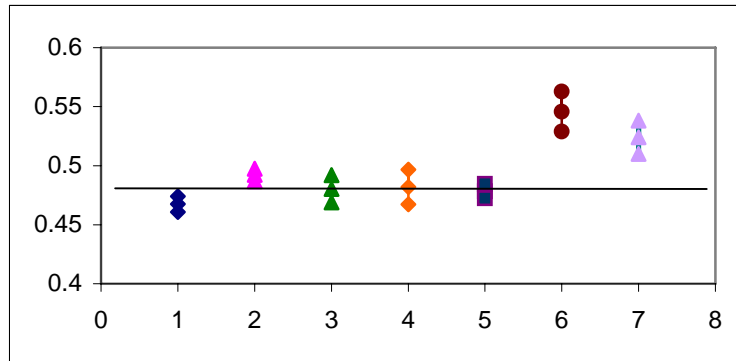


Figura #16. Intervalo de confianza de la concentración de nitratos en una muestra de agua, utilizando los modelos de calibración por regresión simple y ponderada.

Si se observa el intervalo de confianza obtenido por la regresión ponderada (Figura #16, posición 4), vemos que no tiene diferencias significativas con los intervalos obtenidos en los tres primeros días ni con el intervalo obtenido por la regresión simple de los promedios (posición 5 de la figura). Esto significa, que los valores de b_0 y b_1 de estos días representados en la carta control no son diferentes cuando se determinan las concentraciones de nitrato utilizando el modelo de regresión lineal ponderado. Pese a que los valores b_0 y b_1 de los tres días están fuera de la elipse, (figura #15) la mejor curva de calibración que representa a los tres días es la curva promedio ponderada. Por tanto puede afirmarse que la linealidad es repetible en tres días consecutivos, manteniendo un flujo constante de 8.9 ml / minuto.

5.12 Evaluación de la Exactitud del Método

Para evaluar la exactitud del método, se construyó una curva de calibración por adición patrón que representa el efecto matriz y se comparó con la curva de calibración normal o de estándares puros. Los resultados se pueden observar en la figura #17. La exactitud se expresa evaluando el porcentaje de recobro, calculado por la siguiente fórmula:

$$Rc\% = \frac{AP b_1}{CN b_1} 100$$

Donde $AP b_1$ es la pendiente de la curva de calibración obtenida por adición patrón y $CN b_1$ representa la pendiente de la curva de calibración con estándares puros.

La incertidumbre de Rc% se evalúa por la ecuación siguiente:

$$U_{Rc\%} = Rc\% \sqrt{\left(\frac{S^{AP} b_1}{AP b_1}\right)^2 + \left(\frac{S^{CN} b_1}{CN b_1}\right)^2}$$

El intervalo de confianza a un 95% de probabilidad será:

$$Rc\% \pm 2 * U_{Rc\%}$$

Los valores de las pendientes y sus desviaciones estándares se muestran en la siguiente tabla:

Prueba	b1	Sb1
AP	0.827228916	0.019827973
CN	0.778818182	0.01232298

Aplicando la formulación anterior se obtiene que el porcentaje de recobro es:

(106 ± 6) %

De acuerdo a estos resultados, la exactitud del método es buena, no obstante su poca precisión en los modelos lineales.

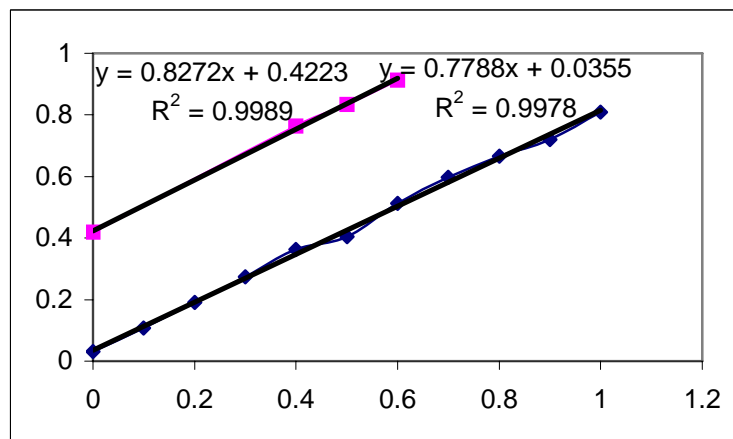


Figura #17: Curva de calibración a) Adición Patrón b) Con estándar puro.

5.13 Limite de detección y cuantificación

El límite de detección se determinó a partir de una curva de calibración normal para la cual se prepararon soluciones estándares diluidas, cercanas a la concentración del blanco los datos se muestran en la Tabla #17. Se hizo un análisis de regresión simple obteniéndose un valor de la pendiente de $b_1=0.860732077$, el valor de la desviación estándar del intercepto es $Sb_0=0.000601461$

De acuerdo a las normas ISO y IUPAC la señal de detección se define como $SD = 3.29 * Sb_0$. Utilizando la pendiente del modelo de regresión se obtiene el límite de detección:

$$LD = \frac{(b_0 + 3.29 * Sb_0)}{b_1}$$

y el límite de cuantificación está dado por:

$$LC = \frac{(b_0 + 10 * Sb_0)}{b_1}$$

Sustituyendo los valores de Sb_0 y b_1 en las ecuaciones anterior se obtuvo el valor de 0.0160066 nitrógeno-nitrato mg/L para el límite de detección y 0.0207 mg /L para el de cuantificación.

Tabla #17. Concentración de N-NO³⁻ en mg/L y absorbancias

ppm	abs
0	0.011
0.011	0.023
0.014	0.024
0.018	0.026
0.02	0.028
0.023	0.031
0.045	0.052
0.068	0.072
0.09	0.089
0.113	0.108

5.14 Evaluación de la incertidumbre en el cálculo de la concentración de nitratos en una muestra de agua a través de una curva de calibración.

Para estimar la incertidumbre, se dedujo la expresión de la concentración de nitratos en la muestra de agua a partir del modelo de regresión y los factores de dilución y luego se aplicó la ley de propagación del error. Las ecuaciones se presentan a continuación.

$$C_x = \frac{A - b_0}{b_1'} \left(\frac{V_1}{V_0} \right) \left(\frac{V_0'}{V_1'} \right) mg / L$$

$$U_{cx} = C_x \sqrt{\left(\frac{U_{Ax}^2}{(Ax - b_0)^2} \right) + \left(\frac{U_{b0}^2}{(Ax - b_0)^2} \right) + \left(\frac{U_{b1}^2}{V_{b1}^2} \right) + 2 \left(\frac{U_{V0}^2}{V_0^2} \right) + 2 \left(\frac{U_{V1}^2}{V_1^2} \right)}$$

En la tabla #18 se encuentran los diferentes valores para realizar los cálculos.

Tabla #18.
Parámetros utilizados en el cálculo de la incertidumbre de la concentración de nitratos en una muestra de agua

C_x	0.48807
U_{ax}	0.012216
U_{b0}	0.00186494
U_{b1}	0.00553293
A_x	0.4145
b₀	2.72E-05
b₁	0.79358544
V₀	25 ml
V₁	100 ml
UV₀	0.01224745
UV₁	0.032659

Donde:

b_0 = intercepto (Modelo de regresión Lineal Ponderada para cada análisis)

U_{b0} = Incertidumbre del intercepto (S_{b0} , del modelo de regresión lineal Ponderado)

b_1' = pendiente (Modelo de regresión Lineal Ponderada para cada análisis)

U_{b1} = Incertidumbre de la pendiente (S_{b1} , del Modelo de regresión Lineal Ponderada para cada análisis)

$V_1' = V_1$ = volumen de la muestra

$V_0' = V_0$ = volumen de dilución

U_{V0} = Incertidumbre de pipeta de 25 ml.

U_{V1} = Incertidumbre de matraz volumétrico de 100 ml.

A_x = Lectura de absorbancia debido a la muestra

U_{Ax} = incertidumbre de la medición analítica (representada por S_r , de la repetibilidad de las mediciones)

U_{V0} = Incertidumbre de pipeta de 25 ml.

U_{V1} = Incertidumbre de matraz volumétrico de 100 ml.

Al final, el valor de la incertidumbre obtenido a partir de la ecuación de (U_{cx}) es 0.014869784 y el valor de la concentración de la muestra (C_x) expresado como

intervalo de confianza es: 0.48807+/-2 (0.014869784). (anexo #6, Cálculos de la incertidumbre Ucx)

5.15 Prueba de íter-laboratorio

Durante el periodo, de la validación se realizó una prueba de inter-laboratorio el día 22 de noviembre 2002. En este ensayo participaron un total de 53 laboratorios (Tabla en anexo #7), 37 laboratorios Chilenos, 15 laboratorios de Latinoamérica y 1 Laboratorio de la Unión Europea (Alemania).

Gracias a la participación en esta prueba, nuestro laboratorio, tuvo la posibilidad de conocer el comportamiento de sus procesos de medición respecto a un material de referencia preparado y certificado por la Corporación de Investigación Tecnológica de Chile (INTEC) Al mismo tiempo se pudo evaluar el desempeño del laboratorio respecto a otros laboratorios y en los casos necesarios dar los pasos para mejorar estos procesos.

A partir de una curva de calibración construida el mismo día y cuyo modelo de linealidad es $y = 0.617x + 0.6677$, se obtuvieron las concentraciones de tres muestra de referencia preparadas y pasadas por la columna a un flujo 8.4 ml/min. Las lecturas de absorbancia para cada replica fueron respectivamente 0.603, 0.606 y 0.611 (Ver tabla #19)

Nuestro laboratorio participó en esta prueba con el código n^o 13, reportando los resultados que se observan en la tabla #20. El error cuadrático medio relativo fue del 2.5%. Con esto nos dimos cuenta que estamos cerca de conseguir las condiciones óptimas para el análisis de la determinación de nitrato por el método de reducción con cadmio.

Tabla #19. Curva de calibración, Prueba de Inter.-laboratorio, Absorbancia de muestra		Tabla #20. Resultados reportados de nitratos	
conc./4	abs	Replicas	conc.(mg/L)
0	0.062	M1	4.45
0.1	0.158	M2	4.5
0.3	0.215	M3	4.4
0.4	0.316	Promedio	4.5
0.6	0.426	S	0.1
0.8	0.54	Sesgo (b)	0.4
1	0.682	ECM	0.4
Muestra	0.603	$E = (b^2 + s^2)^{1/2}$	
Muestra	0.606		
Muestra	0.611		

A continuación se presenta un resumen de los resultados de la prueba de interlaboratorio.



CONCLUSIÓN

Las condiciones óptimas para el análisis no están bien definidas en el método estándar. Son muchos los parámetros que pueden influir en los resultados de las mediciones. El método de referencia habla de trabajar con una columna de 18.5 cm de altura de cadmio, con un flujo entre 7 y 10 ml /minuto, que toda la muestra que pase por la columna debe tener un pH entre 7 y 9, el tamaño de los gránulos de cadmio deben estar entre 40 y 60 mesh y el tiempo de desarrollo del color es para la sulfamida de 2 a 8 minutos y para el Reactivo NED de 10 minutos a 2 horas.

A pesar de las limitaciones de tiempo y de recursos, que se necesitó para lograr completar la optimización del método, logramos estudiar ciertas características de este método, concluyendo que de todos los parámetros que pueden afectar la medición, el flujo es el más determinante, ya que sino se controla bien puede producir lecturas de absorbancia muy dispersas. Se logró probar que cuando se mantiene el flujo constante los resultados de linealidad mejoran significativamente. Los resultados de la carta control para la linealidad sugieren que se debe preparar una curva de calibración cada día, pero si se utiliza el modelo de regresión lineal Ponderada para encontrar la concentración de nitrato nos damos cuenta que la exactitud del método es buena; a pesar de la poca precisión de los modelos lineales. Esto lo pudimos comprobar, durante el periodo de la validación cuando se realizó una prueba de interlaboratorio el día 22 de noviembre 2002, nuestro laboratorio participó en esta prueba con el código n^o 13, reportando para la prueba de nitratos un error cuadrático medio relativo del 2.5%. Con esto nos dimos cuenta que estamos cerca de conseguir las condiciones óptimas para el análisis de determinación de nitrato por el método de reducción con cadmio.



Recomendaciones

- Se sugiere realizar estudios para evaluar que factores pueden afectar la eficiencia de la columna.
- Investigar mecanismos para lograr controlar mejor el flujo que pasa por la columna.



Referencias

- (1) **Norma Cubana ISO/IEC 17025: 2000**, "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración", 1ra edición, Oficina Nacional de Normalización (NC), Cuba, 2000.
- (2) **Ministerio de Ambiente y Recursos nacionales (MARENA)**, "Curso Teórico Práctico en Aspectos Técnicos del Control de Calidad Interno del Laboratorio de Análisis", Programa Ambiental Nicaragua- Finlandia (PANIF), (Julio 1999).
- (3) **Gustavo Delgado**, "Folleto de Principio de Estadística y Técnicas de la Validación" UNAN-LEÓN, Nicaragua, 1999.
- (4) **Douglas A. Skoog y James Leary**, "Análisis Instrumental", 4ta edición, editorial McGraw-Hill, México, 1994.
- (5) "Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical chemists". Published by AOAC Internacional, 15th Edition, Volumen II, USA, 1990.
- (6) [www. Netsalud.sa.cr./ms/drc/Guía Validación.doc](http://www.Netsalud.sa.cr./ms/drc/Guía%20Validación.doc).
- (7) **Gustavo Delgado**, "Folleto de Quimiometría", Departamento de Química, UNAN-LEON, Nicaragua, (Julio 2001).
- (8) **Simón Castillo**, "Folleto Curso de Estadística" , UNAN-LEON, Nicaragua, (septiembre 2000).
- (9) "Folleto Tablas de Constantes" Departamento de Química Analítica, Unan-León, Nicaragua, 2000.
- (10) **Lic. Nelva de Daly**, "Manual de Instrucciones del Área de Volumen", Centro Experimental de Ingeniería, Laboratorio de Metrología, 1ra Edición, Universidad Tecnología, Panamá, 2002.
- (11) "Standard Graduated Glass Flasks for Verification Officers", Organization International de Metrología Legal, Recomendación n° 43.
- (12) "Informe de Resultados del Ensayo de Ínter comparación ", PEI-10-2002, Corporación Tecnológica de Chile, Chile,2002.
- (13) **Iris Chavarría**, "Control de Calidad en los Laboratorios Analíticos. Validación de Métodos", Universidad de Panamá, 1999.



- (14) **Luis Álvarez y José Villarreal**, "Folleto Investigación: Una Nueva Columna de Reducción para el Análisis de Nitratos en Agua de Mar", Laboratorio de Calidad de Agua y de Aire, Universidad de Panamá, 1980.
- (15) **V. Dean Adams**, "Water & Wastewater Examination Manual", 2da Edition, Lewis Publishers, Inc., USA, 1985.
- (16) **APHA, AWWA, WPCF**, "Standard Methods for the examination of water and wastewater", 16th Edition, USA, 1985.
- (17) **Maria Luisa Esparza**, "Manual de Control de Calidad Analítica del Laboratorio del CEPIS", Programa de Control de Calidad y Desarrollo de laboratorios, OPS/CEPIS/PUB, Perú, 1995.
- (18) **Tony Owen**, "Fundamentals of UV-Visible Spectroscopy", Hewlett Packard Company, 1996.
- (19) **H. Strobel, W Heineman**. "Chemical Instrumentation Systematic Approach" 3th Edition, John Wiley & Inc, 1989.
- (20) **G.W. Ewing**, "Analytical Instrumentation Handbook", Marcel Dekker, Inc, 1990.
- (21) **Millar J.C.; Millar J.N.** "Estadística para Química Analítica". 2da Edición, Editorial Addison-Wesley o Iberoamericana S.A. 1993.
- (22) **Ministerio de Comercio e Industria**, Dirección General de Normas y Tecnología Industrial, "Reglamento Técnico Agua. Descarga de Efluentes Líquidos Directamente a Cuerpos y masas de Aguas Superficiales y Subterráneas", Reglamento Técnico Agua DGNTI-COPANIT 35-2000, Panamá, 2000.
- (23) **Mendel y Lining**, "Artículo: Intervalo de Confianza Simultáneo de b_0 y b_1 " *Analytical Chem.* 29 (1957) ,743.
- (24) Primera Conferencia Interamericana sobre el medio Ambiente, "Contaminación ambiental: Causas. Efectos y Alternativas para su Solución", Editado por J. Valladares, H. de Lasa, San Salvador-El Salvador, (mayo 2-4, 1994)
- (25) Gustavo Delgado, "Folleto Evaluación de la incertidumbre de las mediciones Analíticas", UNAN-León, Nicaragua, (Mayo 2001)



ANEXOS

ANEXO #1. Resultados de la balanza Analítica para su calibración.

100 grs. N° de pesadas	PESO	Despues de quitar la pesa	PESO	Peso despues de tarar
1	99.9993	0.0000	99.9993	-99.9994
2	99.9993	-0.0001	99.9994	-99.9994
3	99.9994	0.0000	99.9994	-99.9993
4	99.9993	-0.0001	99.9993	-99.9993
5	99.9994	0.0000	99.9992	-99.9995
6	99.9992	-0.0002	99.9995	-99.9994
7	99.9994	0.0000	99.9993	-99.9996
8	99.9993	0.0000	99.9993	-99.9993
9	99.9993	-0.0001	99.9993	-99.9994
10	99.9993	0.0000	99.9994	-99.9994
media	99.99932	-0.0001	99.99934	-99.9994
S	6.32979E-05	7.07107E-05	8.43461E-05	9.42761E-05
Lim Inf.	99.9992567			
Lim.Sup.	99.9993833			
X	99.99933			
s(global)	0.000105456		Incertidumbre:	5.10426E-05
X - 2S	99.99911909			
X + 2S	99.99911909			
X - 3S	99.99911909			
X + 3S	99.99911909			

50 grs. N° de pesadas	PESO	Despues de quitar la pesa	PESO	Peso despues de tarar
1	50.0370	-0.0002	50.0370	-50.0371
2	50.0369	-0.0001	50.0370	-50.0372
3	50.0369	-0.0002	50.0370	-50.0372
4	50.0371	0.0000	50.0370	-50.0370
5	50.0371	0.0000	50.0369	-50.0370
6	50.0369	0.0000	50.0370	-50.0371
7	50.0370	0.0000	50.0371	-50.0372
8	50.0369	-0.0001	50.0370	-50.0372
9	50.0370	0.0000	50.0371	-50.0372
10	50.0371	0.0000	50.0371	-50.0371
media	50.0370	-0.0001	50.0370	-50.0371
S	8.75582E-05	8.43274E-05	6.32436E-05	8.23259E-05
Lim Inf.	50.0369			
Lim.Sup.	50.03707756			
X	50.037005			
S	0.00010801		Incertidumbre:	5.10437E-05
X - 2S	50.03678898			
X + 2S	50.03722102			
X - 3S	50.03668097			
X + 3S	50.03732903			



20 grs. N° de pesadas	PESO	Despues de quitar la pesa	PESO	Peso despues de tarar
1	20.0002	-0.0002	20.0002	-20.0002
2	20.0003	0.0000	20.0003	-20.0001
3	20.0001	0.0000	20.0001	-20.0002
4	20.0003	0.0002	20.0002	-20.0002
5	20.0002	0.0001	20.0001	-20.0003
6	20.0002	0.0000	20.0003	-20.0003
7	20.0002	-0.0002	20.0002	-20.0002
8	20.0002	-0.0002	20.0001	-20.0002
9	20.0001	-0.0002	20.0002	-20.0002
10	20.0002	0.0000	20.0002	-2.0003
media	20.0002	-0.0001	20.0002	-18.2002
S	6.6664E-05	0.000143372	7.37857E-05	5.692071679
Lim Inf.	20.0001			
Lim.Sup.	20.00026666			
X	20.000195			
S	9.94406E-05		Incertidumbre:	5.10402E-05
X - 2S	19.99999612			
X + 2S	20.00039388			
X - 3S	19.99989668			
X + 3S	20.00049332			

10 grs. N° de pesadas	PESO	Despues de quitar la pesa	PESO	Peso despues de tarar
1	10.0014	-0.0002	10.0015	-10.0014
2	10.0015	0.0000	10.0015	-10.0015
3	10.0012	-0.0004	10.0015	-10.0016
4	10.0016	-0.0002	10.0015	-10.0016
5	10.0016	0.0000	10.0016	-10.0016
6	10.0015	-0.0002	10.0015	-10.0015
7	10.0014	-0.0002	10.0015	-10.0014
8	10.0015	0.0000	10.0015	-10.0015
9	10.0016	0.0000	10.0016	-10.0015
10	10.0015	0.0000	10.0015	-10.0016
media	10.0015	-0.0001	10.0015	-10.0015
S	0.000122927	0.000139841	4.21639E-05	7.88813E-05
Lim Inf.	10.0014			
Lim.Sup.	10.00160293			
X(global)	10.0015			
s(global)	0.000129957		Incertidumbre:	5.10542E-05
X - 2S	10.00124009			
X + 2S	10.00175991			
X - 3S	10.00111013			
X + 3S	10.00188987			