

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTOMA DE NICARAGUA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA



**“VALIDACION DEL METODO DE LA BRUCINA PARA LA
DETERMINACION DE NITRATO EN AGUAS SUBTERRANEAS”**

MONOGRAFIA

PRESENTADA POR:

Br. Eva Isabel Gutiérrez Olivas.

Br. Hermenegildo Rene Díaz Blanco.

Previo a optar al titulo de:

Licenciado en Química

TUTOR: Msc. Amada Carrasco.

León, Nicaragua 2003

INDICE

	Pág.
Resumen	
Indice.....	2-3
Introducción.....	4
Objetivos.....	6

Capítulo I

Marco Teórico.....	7
1.1 Ciclo del Nitrógeno.....	7
1.2 Agua subterráneas.....	8
1.3 Selección del Método de análisis.....	10
1.3.1 Fundamento teórico del método.....	11
1.4 Método Espectrofotométrico.....	12
1.4.1 Leyes de la Espectrofotometría.....	12
1.4.2 Ley de Beer.....	13
1.4.3 Desviación de la ley de Beer.....	13
1.4.4 Tratamiento de los datos Espectrofotometricos.....	15
1.4.5 Logaritmo de transmitancia o absorbancia frente a concentración.....	16
1.5 Tratamiento estadístico de los resultados.....	17
1.6 Tipos de errores.....	18
1.7 Validación de un método analítico.....	20
1.7.1 Tipos de validación.....	21
1.7.2 Reglas de la validación de un método analítico.....	22
1.8 Parámetros que definen la eficiencia de un método.....	23

Capítulo II

PARTE EXPERIMENTAL.....	26
2.1 Equipos, Materiales y Reactivos	26
2.2 Procedimiento.....	28
2.2.1 Preparación de soluciones.....	28
2.2.2 Calibración del equipo UV/V.....	29
2.2.3 Error relativo de concentración (Metodo de la Brucina).....	29
2.2.4 Preparación de curvas de calibrado con Estándares externos.....	30
2.2.5 Muestreo.....	31
2.2.6 Análisis de muestra.....	32
2.2.7 Preparación de curvas de calibración por Adicción patrón.....	32

Capitulo III

RESULTADOS Y ANALISIS.....	34
3.1 Calibración de equipo.....	34
3.2 Error relativo de concentración del método de la Brucina.....	37
3.3 Curvas de calibración Espectrofotometrica para El método de la Brucina.....	39
3.4 Linealidad y Rango.....	44
3.5 Sensibilidad.....	44
3.6 Limite de detección del método, limite de Cuantificación y limite de cuantificación practico.....	44
3.7 Repetibilidad.....	45
3.8 Efecto de matriz y concentración de muestras.....	47
3.8.1 Cálculos de concentraciones.....	50
CONCLUSION.....	53
RECOMENDACIONES.....	54
BIBLIOGRAFIA.....	55
ANEXOS.....	57

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso esencial para la vida, la salud, alimentos, el desarrollo económico y el medio ambiente sostenible. El agua potable es aquella apta para la alimentación y para usos domésticos; debe ser limpia, sin olor, libre de materias en suspensión y de microorganismos patógenos

El volumen total del agua en el mundo permanece constante lo que cambia es la calidad y la disponibilidad. El agua está constantemente reciclándose a través de un sistema conocido como EL CICLO DEL EL AGUA o CICLO HIDROLÓGICO, este dura ocho días. En términos de volumen total, el 97.5% del agua del mundo es salina donde un 99% de ellas se encuentra en los océanos, el resto forma los lagos salinos. Esto significa que solamente el 2.5% del volumen del mundo es actualmente no salina.

Tiene un gran número de aplicaciones y usos, es la materia prima de cualquier producción industrial, agrícola y ganadera, además sirve de soporte para la vida acuática y almacén de sustento para la humanidad. El agua que consumen las comunidades se utiliza para muchos fines, el uso potable es el más importante.

La utilidad del agua para varios fines se ve afectada por su contenido de minerales disueltos. Si uno o más exceden de la cantidad que puede tolerarse para un uso determinado, debe aplicarse al agua algún tratamiento que elimine el mineral indeseable y torne al agua apta para el propósito al que se le va destinar.

La concentración total de minerales disueltos en el agua es un índice general de la adaptabilidad del agua para diversos usos. Los términos sólidos totales (ST) se usan más o menos como sinónimos.

La variación del contenido de nitrato en diferentes aguas es grande, y en muchas aguas subterráneas no parece guardar relación con ninguna formación geológica. El contenido de nitrato del suelo, sin embargo, ha provenido de varias fuentes.

Aunque las fuentes de contaminación de aguas subterráneas tiene diferentes orígenes, la agricultura se puede considerar como el más importante, son los nitratos y pesticidas los contaminantes más usuales.

Los nitratos se reducen a nitritos en el organismo y reaccionan con las aminas para formar nitrosaminas que es un agente cancerígeno de los más potentes que se conocen; una alta concentración de nitrato en agua puede ser muy peligrosa para niños, especialmente en los primeros meses de vida, pudiendo provocar una enfermedad conocida como metahemoglobinemia. ⁽²⁾

Es muy necesaria la validación del método de la Brucina para la determinación de nitratos en aguas subterráneas, con el propósito de conocer la eficiencia del método bajo las condiciones del laboratorio en el que se hace el ensayo.

Para conocer la eficiencia del método se seleccionaron adecuadamente los parámetros a determinar en el estudio, ya que ellos permitirán evaluar la información general y conocer el grado de confiabilidad en los resultados obtenidos.

OBJETIVOS

Objetivos General:

- Validar espectrofotométricamente el método de la brucina para la determinación de nitrato en aguas subterráneas.

Objetivos Específicos:

- Establecer parámetros: Precisión, límite de detección, linealidad, rango, límite de cuantificación y sensibilidad del método.
- Determinar nitrato por el método de la Brucina en muestras de agua subterráneas.

I. MARCO TEORICO

1.1 CICLO DEL NITRÓGENO

La forma en que el nitrógeno circula sobre la superficie de la tierra y en su atmósfera, por lo general, se representa como EL CICLO DEL NITROGENO.

Muchas de las reacciones del ciclo del nitrógeno son reacciones redox catalizadas por microorganismo

Estas reacciones son la oxidación de NH_4^+ a NO_2^- y después a NO_3^- (nitrificación), la reducción de NO_3^- a NO_2^- y posteriormente a NH_4^+ (reducción del nitrato), la reducción de NH_4^+ a N_2 g (desnitrificación) y la materia orgánica que contiene nitrógeno (aminación) o su desprendimiento (desaminación o amonificación) es la única reacción del ciclo del nitrógeno en que se verifica una transformación de este elemento y que no corresponde al tipo de oxidación - reducción.

La desnitrificación (la conversión de NO_3^- a N_2 ac) es una reacción común catalizada por muchas bacterias y se verifica con rapidez. Sin embargo, los catalizadores microbianos son incapaces de catalizar la reacción inversa a la desnitrificación (N_2 ac- NO_3^-).

El Nitrógeno total: Es la suma del orgánico más el inorgánico. El nitrógeno orgánico es definido como el nitrógeno unido a materia orgánica en estado de oxidación trinegativo. El nitrógeno inorgánico que sus formas inorgánicas (mas oxidadas) del nitrógeno son en orden creciente: $\text{NH}_4^+ = \text{NO}_2^- = \text{NO}_3^-$ ⁽²⁾

1.2 AGUA SUBTERRÁNEAS

De forma general, se afirma, que las aguas subterráneas son la fuente de agua potable más importante para la población en países desarrollados.

Aunque las fuentes de contaminación de aguas subterráneas tienen diferentes orígenes, la agricultura se puede considerar como el más importante y son los nitratos y pesticidas los contaminantes más usuales.

Investigaciones múltiples a lo largo de las décadas, han demostrado que la presencia de nitrato en aguas subterráneas ha sido debida a los excesos de fertilizantes nitrogenados usados por los agricultores; asumiendo que 10 mg/l es el límite máximo de concentración de nitrógeno en forma de nitrato en agua de bebida y que a partir de 3 mg/l ya se puede detectar sus efectos en los seres vivos, no es extraño, por tanto, en climas áridos con agricultura intensiva y suelos arenosos, encontrar nitratos en aguas subterráneas y a concentraciones peligrosas.

Hasta hace algunas décadas, se pensaba que los pesticidas no serían móviles y por consiguiente, no alcanzarían las aguas subterráneas excepto en aquellas zonas con suelos muy arenosos, o bien con alta tasa de aplicación de pesticidas.

La mayoría de las aguas subterráneas no contiene materia en suspensión y prácticamente está libre de bacterias. Por lo general es clara y sin color.

Estas características contrastan con las del agua superficial, puesto que esta última es corrientemente turbia y contiene considerable cantidad de bacterias. Por esta razón, el agua subterránea resulta ser de buena calidad sanitaria. Su temperatura es relativamente constante, factor muy importante en algunos casos.

La utilidad del agua para varios fines se ve afectada por su contenido de minerales disueltos. Si uno o más minerales exceden de la cantidad que puede tolerarse para un uso determinado, debe aplicarse al agua algún tipo de tratamiento que elimine el mineral indeseable y torne al agua apta para algún fin específico. Las altas concentraciones de nitrato en las aguas de los pozos, puede deberse a un escurrimiento directo de agua superficial dentro de estos, o a percolación de agua contaminada dentro del acuífero y desde el suelo sobreyacente.⁽³⁾

1.3 SELECCIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

La determinación de nitrato (NO_3^-) es difícil debido a los procedimientos relativamente complejos que se precisan, la elevada probabilidad de que se hallen sustancias interferentes y los rangos limitados de concentración de las diferentes técnicas.

Una técnica con luz ultravioleta (UV-V) que mide la absorbencia de NO_3^- a 220 nm es adecuada para el estudio de aguas no contaminadas (con bajo contenido en materias orgánicas).

Entre otros métodos para determinar nitrato se puede mencionar: La cromatografía iónica, método de reducción de cadmio, método de cloruro Titanoso, método de reducción de Hidracina y el método de la Brucina. Cuando las concentraciones de nitrato son muy elevadas se debe diluir hasta el rango del método seleccionado. Los métodos colorimétricos requieren una muestra ópticamente clara. Las muestras turbias deben filtrarse usando filtro de membrana con 0.45 micras de diámetro de poro.

Aunque el método de la Brucina no es recomendado en las últimas ediciones de los Estándar Método este es un método que aún es utilizado en la mayoría de los laboratorios dado que sus resultados han sido satisfactorios. La mayoría de los laboratorios carecen de recursos económicos para aplicar la cromatografía iónica. ⁽⁴⁾

1.3.1 MÉTODO DE LA BRUCINA

Este método se basa en la reacción de los iones nitrato de una muestra de agua con la Brucina en medio ácido sulfúrico, formándose un complejo de color amarillo medible a 410 nm. La intensidad de color amarillo es proporcional a la concentración de ion nitrato de la muestra.

El rango de concentración máxima permisible de nitrato según las normas Internacionales de calidad para el agua potable (OMS y CAPRE) es de 50mg/l. ⁽⁴⁾

1.4. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Uno de los métodos fisicoquímico más empleados en análisis es el de la medida de la absorción o emisión de la energía radiante. La gran difusión de esta es consecuencia de los factores siguientes:

- El amplio intervalo de longitudes de onda o de frecuencia de energía radiante y sus diferentes modos de interacción con la materia.
- La existencia en el mercado de instrumentos de medida cada vez más precisos
- Las ventajas inherentes al método. Generalmente, el análisis es muy rápido, una vez que se ha establecido el método, a no ser que se requiera un tratamiento previo para eliminar interferencias. El método es por tanto, muy cómodo para medidas repetidas de un mismo constituyente.

Además, el método es, en general, aplicable a la determinación exacta de cantidades de constituyente mucho menores que con los métodos gravimétricos o volumétricos; es por tanto, muy adecuado para el análisis de trazas.

Los métodos espectrofotométrico tienen tal importancia, que son los más utilizados en casi todos los laboratorios industriales, clínicos, de investigación o de enseñanza.⁽⁵⁾

1.4.1 LEYES DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA

Cuando un haz de energía monocromática incide sobre una capa homogénea de una sustancia transparente, parte de la energía es absorbida y el resto transmitida (En realidad, también una pequeña parte es reflejada, por lo que cuando se diseña un aparato para hacer estas medidas se tiene en cuenta este factor, de tal forma que se elimine su influencia). Si la energía radiante incidente tiene longitudes de onda en la región visible del espectro y el medio a través del cual tiene que pasar, absorbe selectivamente ciertas longitudes de onda, el color observado corresponderá a las longitudes de onda de la energía transmitida.

1.4.2 LEY DE BEER

La ley de Beer establece que la absorbancia es proporcional a la concentración de las especies absorbente.

$A = abc$, esta ecuación, fundamental para aplicar la Espectrofotometría en química se denomina ley de Beer.

En donde:

a = es la absorbancia

b = longitud del trayecto óptico

c = la concentración de la muestra

Absorbancia, A , es el logaritmo en base 10 del recíproco de la transmitancia, T , en el que el disolvente puro es el material de referencia; es, $A = \log_{10} 1 / T = - \log_{10} T$.

1.4.3 DESVIACIONES DE LA LEY DE BEER

Normalmente se emplea como comprobante, de conformidad con la ley de Beer o como prueba de la desviación, una gráfica de A o de $\log T$ en función de la concentración, que sirve, también como curva de calibración para el análisis de disoluciones. La mayor parte de esas desviaciones son más aparentes que reales y son debidas a una de las siguientes causas:

- Carencia de monocromatismo de la luz incidente. Aparecen con frecuencia desviaciones aparentes de la absorbancia cuando se mide con un fotómetro de filtro, en el que la radiación incidente está incluida en una banda amplia de longitudes de onda, sobre todo si el centro de la banda no coincide con la longitud de onda para la que se mide el sistema con máximo de absorción.
- Cambios químicos en el sistema, de tal forma que las especies absorbentes no representan la totalidad de la concentración. Los cambios más frecuentes son la asociación, disociación, interacción con el disolvente (Por ejemplo, hidrólisis), efectos de pH , etc.

Las desviaciones reales de la ley de Beer son insignificantes a concentraciones menores de 0.01 M, pero pueden aumentar porque el termino constante en la ley no es la absortividad, si no una función de la absortividad y del índice de refracción. También a altas concentraciones las partículas de soluto quedan tan juntas entre si que se altera su distribución de carga y la capacidad para absorber radiaciones de una determinada longitud de onda.

1.4.4 TRATAMIENTO DE LOS DATOS ESPECTROFOTOMÉTRICO

Curvas espectrales:

El color de una disolución puede representarse mediante una grafica de transmitancia o absorbancia frente a longitudes de onda. Cada sustancia absorbente posee su espectro característico.

Curvas de Calibrado:

Después de determinar la longitud de onda a la cual deben de realizarse las medidas, se calibra el método (lo que incluye el instrumento que se ha de utilizar) midiendo una serie de patrones del constituyente estudiado. Las medidas de transmitancia (o absorbancia) se realizan comúnmente ajustando la escala de medida del instrumento a 100% de transmitancia (absorbancia cero) cuando el rayo luminoso pasa a través de un blanco, que debe ser idéntico a la muestra en todo, excepto en que no debe contener el constituyente que se ha de determinar.

El blanco deberá contener los reactivos, aditivos, disolvente, etc., en la misma naturaleza y concentración que las utilizadas en cada muestra desconocida en la que se desarrolle color; de esta manera, las lecturas de las muestras están corregidas automáticamente para cualquier absorción pequeña por acción de los reactivos y del disolvente. Con los datos de transmitancia o absorbancia para las diferentes concentraciones de las series patrón se construye una curva de calibrado, representado las absorbancias en las ordenadas y las concentraciones en las abscisas, haciendo uso de esta por interpolación se determinan las concentraciones de las muestras de composición desconocida.

1.4.5 LOGARITMO DE TRANSMITANCIA O ABSORBANCIA FRENTE A CONCENTRACIÓN

La forma matemática de la ley de Bouguer – Beer, $-\log T = A = abc$, muestra que $\log T$ y A son funciones lineales de la concentración. La representación de $\log T$ frente a concentración es una línea recta de pendiente negativa, la representación de A frente a la concentración es una línea recta de pendiente positiva. La pendiente a por unidad de camino óptico b , es la absorptividad características de la sustancia absorbente a la longitud de onda utilizada para la medida. Diferentes sustancias, o la misma sustancia a diferentes longitudes de onda, poseen absorptividades diferentes y dan lugar a líneas rectas de diferentes pendiente. Los datos fotométricos de la medida de transmitancia para una serie de patrones se representan como una curva de calibrado del método, en la que se determinan las muestras desconocidas viendo la concentración que corresponde a la transmitancia para la muestra de composición desconocida. Las muestras desconocidas se preparan con los mismos reactivos y se miden en las mismas condiciones que los patrones de concentración similar. Cualquier desviación aparente de una podría aparecer también en las otras, y se anularan estas desviaciones al leer en la curva de calibrado la concentración de la muestra de composición desconocida; sin embargo resulta mas fácil trazar una línea continua para una serie de puntos que están en línea recta, que si estos forman una curva. Esto no significa que no pueda utilizarse una curva de calibración que relacione la transmitancia con la concentración.

Error Relativo de Concentración

Es una equivocación pensar que si la línea de calibrado es una recta, la exactitud es la misma en todo el intervalo que comprende; el error relativo es diferente a distintos niveles de concentración y transmitancia

$$\frac{\Delta C / C}{\Delta T} = \frac{0.4343}{T \log T} \quad \text{Ec. No.1}$$

$\Delta C / C$ es el error relativo en la concentración que corresponde a ΔT , que es un intervalo determinado de transmitancia; para un valor de $\Delta T = 0.01$ (es decir, una diferencia de 1% en la transmitancia); puede calcularse fácilmente el error relativo del análisis $\Delta C / C$ para cualquier valor de T .⁽⁵⁾

1.5 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Mediante el uso de los procedimientos estadísticos, se busca potenciar y aumentar el rendimiento del proceso analítico, para ello la estadística puede actuar sobre todas y cada una de las etapas de dichos procesos.

Una vez que se ha obtenido los datos, se trata de obtener de los mismos la mayor cantidad de información posible y de establecer los límites de confianza con los que dicha información se obtiene.

Todo analista de agua debe tratar de obtener un resultado que presente una estimación correcta del producto analizado en el medio controlado.

Es muy difícil que al realizar las diferentes operaciones para obtener el resultado, no se cometan errores los cuales deben de ser suprimidos o reducidos; para descubrir estos errores y para mejorar las precisiones de los resultados analíticos se necesita el empleo de los métodos estadísticos.

1.6 TIPOS DE ERRORES

Los errores se clasifican en aleatorios y sistemáticos, y son los errores sistemáticos la principal causa de la inexactitud en un proceso analítico. ⁽⁶⁾

Los errores aleatorios no pueden predecirse y varían de signo y magnitud, se evidencian cuando al realizar una serie de análisis repetitivos de una misma muestra se obtienen resultados que oscilan alrededor de un valor central. A medida que aumenta el número de repeticiones, el efecto de los errores aleatorios sobre medidas que estiman el valor central, tienden a disminuir, dado que se compensan unos a otros. ⁽⁷⁾

La presencia de errores aleatorios afecta a la precisión de los resultados, es decir, a la concordancia de los distintos valores obtenidos al realizar una serie de medidas repetitivas e independientes unas de otras bajo unas condiciones específicas. Los errores aleatorios son tratados estadísticamente. Esto significa que el buen uso de la estadística esta ligado a la condición siguiente:

Los errores sistemáticos deben ser despreciables ante los errores aleatorios. Las técnicas estadísticas pueden ser utilizadas en la búsqueda de los errores sistemáticos y una vez determinados, corregidos. La característica principal de los errores sistemáticos es que pueden determinarse y puede ser signo positivo o negativo mientras que los otros pueden ser positivos y negativos. ⁽⁶⁾

Los errores sistemáticos: las diferentes fuentes de errores sistemáticos se clasifican en:

1. Instrumentales:

- a) Defectos o limitaciones de la instrumentación. Tales como desperfectos en el detector de señales
- b) Inestabilidad de la fuente de alimentación, ocasionando problemas de ruido de fondo, alterando la señal, etc.

2. Operacionales:

- a) Errores personales
- b) Errores de calibración en la instrumentación
- c) Reactivos inadecuados o contaminados
- d) Tratamiento inadecuado de la muestra, etc.

3. Metodológico

- a) Modelo de calibración inadecuados
- b) Interferencia de fenómenos no tomados en cuenta.

Los errores sistemáticos pueden ser constante (o absolutos) y proporcionales (o relativos).

Los errores constantes son independientes de la concentración del componente que se requiere analizar (analito), y los últimos dependen de la concentración de este.

Las principales fuentes de errores constantes son:

- **Selectividad insuficiente (interferencia)**, el cual es provocado por otro componente que tiene el mismo comportamiento que el analito, obteniéndose resultados con valores mas altos.
- **Efecto de matriz**, esta fuente de error es debido a la presencia de componentes que inhiben o aumentan la intensidad de la señal de respuesta. Estas interferencias son también causa de insuficiente selectividad.
- **Correcciones inadecuadas del blanco**, Los errores proporcionales: Son provocados por los errores en la calibración y más específicamente por diferentes pendientes de las líneas de calibración para la muestra y el estándar. Esto se debe a modelos de calibración inadecuados. ⁽⁶⁾

1.7 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método requiere diferentes etapas experimentales que van desde la preparación de la muestra, hasta el análisis estadístico de los datos que nos proporcionan los experimentos del método de validación. El analista por lo tanto, debe tener conocimiento sólido de las diversas técnicas estadísticas.

Según las normas de INTERNACIONAL STADAR ORGANIZATION (ISO) para la acreditación de laboratorios y la guía para su interpretación, elaborada por el grupo de trabajo europeo (EURACHEM // WELAC 1993), la validación de un método analítico consiste en una serie de verificaciones necesarias para asegurar la características de eficiencia del medio y demostrar que el método esta científicamente regido bajo las condiciones para las cuales debe de ser aplicado. La validación de un método establece que las características de eficiencia del método reúnen las especificaciones relacionadas con los objetivos de los resultados analíticos. ⁽⁶⁾

La calidad de los resultados del análisis químico dependerá de la exactitud y la reproducibilidad en el proceso de medición.

Los diferentes tipos de errores son la causa de la inexactitud de las mediciones analíticas. Si logramos descubrir su origen podemos minimizarlos y para ello es necesario hacer una búsqueda sistemática a través del proceso de calibración utilizando las técnicas quimiométricas apropiadas. ⁽⁷⁾

1.7.1 TIPOS DE VALIDACIÓN

Se pueden distinguir dos tipos de validación de un método: Validación interna (dentro del laboratorio) y validación externa (inter laboratorios).

Validación interna: Consiste en realizar las diferentes etapas de la validación y se efectúa cuando se ha desarrollado un nuevo método o cuando se quiere adaptar o modificar un método que se ha tomado de otras fuentes. Para llevar a cabo la validación es necesario que todo el instrumental y el material volumétrico a utilizar este calibrado.

Dentro de la validación interna podemos considerar la validación prospectiva, verificación de adaptabilidad, validación retrospectiva y control de calidad de las mediciones analíticas.

Validación prospectiva: Se lleva a cabo cuando un nuevo método se va a utilizar en un análisis. En este caso es necesario que el método sea probado en su globalidad, utilizando los criterios de eficiencia.

Verificación de adaptabilidad: Esta etapa es aplicable cuando se transfiere un método de un laboratorio donde ha sido valido a otro.

Validación retrospectiva: Esta consiste en coleccionar los resultados durante un periodo de tiempo de un cierto número de determinaciones y hacer un estudio de la reproducibilidad en un amplio periodo de tiempo.

Control de calidad: Se realiza con el análisis de una o pocas muestras de composición conocida (muestras de referencia o de control) con el fin de elaborar cartas de control donde se refleje el bias y la reproducibilidad. ⁽⁶⁾

Validación externa: Se lleva a cabo comparando nuestros resultados con el de otros laboratorios de reputación nacional e internacional, utilizando la misma muestra (Ring - test). El número de laboratorios que debe participar en el “Ring – test” deben ser al menos 8 laboratorios con la capacidad de llevar a cabo el análisis especificado en el procedimiento analítico.

1.7.2 REGLAS DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Validar el método completo: Muy frecuentemente se valida solamente las determinaciones propiamente dichas (la medición analítica). Debemos validar las etapas preparatorias, tales como disolución, digestión de la muestra etc.

Validar en un intervalo de concentraciones: Un método puede trabajar muy bien a altas concentraciones, pero puede ser inadecuado a bajas concentraciones. Se sabe muy bien que la precisión del método depende de la concentración del analito en la solución muestra.

Validar sobre una amplia gama de matrices: Esto es probar el método para la determinación de un analito que puede estar presente ya sea, por ejemplo: en agua, suelos, alimentos, muestras biológicas, etc. ⁽⁶⁾

1.8 PARÁMETROS QUE DEFINEN LA EFICIENCIA DE UN MÉTODO

Los parámetros de eficiencia pueden clasificarse en primarios y secundarios.

Los parámetros primarios son:

- **La precisión:** Se define como grado de concordancia mutua entre los datos que se han obtenido de una misma forma. La precisión mide el error aleatorio, o indeterminado de un análisis
- **La exactitud:** Mide el error sistemático o determinado de un método analítico. El concepto de exactitud se refiere a la similitud entre el valor estimado y el valor verdadero de la concentración de un analito en una muestra. ⁽⁶⁾

De acuerdo al criterio de los Método Normalizados ⁽³⁾ y la IUPAP, el límite de detección se define como:

- **El Limite de Detección del Método (LDM):** Se define a partir de la más pequeña cantidad detectable por encima del ruido en un procedimiento y dentro de un límite declarado de aceptación. Los límites de aceptación se establecen de modo que las probabilidades de que se presentan errores de tipo I y tipo II sean razonablemente pequeños.
- **Error de tipo I:** También denominó error alfa, es la probabilidad de determinar que un componente está presente cuando en realidad está ausente.
- **Error de tipo II:** También denominado error beta, es la probabilidad de no detectar un componente que en realidad está presente. El LDM se calcula multiplicando la desviación estándar del blanco por 3.

$$\text{LDM} = Y - Y_B = 3S_B$$

Los criterios secundarios son lo que tiene influencia en los primarios. Esto son los siguientes:

- a) **Linealidad:** Que describe el comportamiento entre la respuesta y la concentración a través del modo lineal de calibración (una desviación de modelo representa un bias). Es un parámetro que sirve para observar si el modelo de un determinado método es lineal.
- b) **Rango:** Es el intervalo (niveles inferior y superior del analito) de concentraciones en el que es posible la utilización analítica del método, intervalo en el cual puede establecerse una relación matemática útil entre señal y concentración .,
- c) **Limite de cuantificación: (LDC):** Concentración de componente que produce una señal suficientemente mayor que el blanco. Es la concentración típica que produce una señal diez veces la desviación estándar de la señal del blanco.

$$\text{LDC} = Y_B + 10 S_B$$

Si bien el LDC resulta de utilidad dentro de un laboratorio, es mayor la utilidad del limite de cuantificación practico (LCP) definido como el nivel inferior registrable en los limites especificados a lo largo de las operaciones rutinarias de laboratorios.

El LCP tiene un especial importancia por cuanto que laboratorios diferentes producirán LDM distintos incluso si se utilizan idénticos procedimientos de análisis, instrumentos y matrices de muestra.

El LCP equivale aproximadamente cinco veces el LDM y representa un limite de detección practico alcanzable de forma rutinaria con una certeza relativamente elevada de que los valores comunicados son fiables. ⁽³⁾

- d) Selectividad:** Es cuando el método responde preferentemente a un determinado tipo de especie $g(x)$ siendo mucho menor o incluso nula la respuesta del método a otras especies; tienen una sensibilidad alta para un tipo o grupo de analito. Este parámetro asegura que la señal medida no es influenciada por otras sustancias presentes en la muestra y en caso contrario garantizar la remoción de las mismas.
- e) Sensibilidad:** Se define como la pendiente de una línea de calibración y siempre que la representación sea lineal puede ser medida en cualquier punto de ella.
- f) Robustez:** Es la capacidad de producir resultados exactos en presencia de pequeños cambios de las condiciones experimentales factibles de producirse durante su utilización. Estos cambios introducidos reflejan aquellos cambios que pueden ocurrir cuando un método es transferido entre diferentes laboratorios, diferentes experimentadores, diferentes instrumentos, diferentes días, diferentes suministradores de un mismo reactivo, etc.

II. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Equipos, Materiales y Reactivos

Equipos:

- Espectrophotometer UV – Vis 1203 Shimadzu,
- Balanza analítica Ac 210 Sartorius.
- pH –Metro

Materiales:

- Soporte y clamp.
- Probeta de 100ml.
- Bureta de 50 ml.
- Balones aforados de 100, 250 , 500 y1000ml.
- Pipetas serologicas de 10 ml.
- Pipetas volumétricas de 1 y 2 ml.
- Termómetro.
- Espátula.
- Horno eléctrico.
- Pichangas plásticas.
- Pizeta.
- Goteros.
- Beaker de 50, 100, 250 y 1000 ml.
- Palangana.

Reactivos:

- Nitrato de potasio (MERCK)
- Sulfato de Brucina (FISHER CHEMICAL, FISHER SCIENTIFIC)
- Acido Sulfanílico (M &BAKER LTD.)
- Acido Sulfúrico (MERCK)
- Acido Clorhídrico (MERCK)
- Cromato de potasio (MECK)
- Hidróxido de potasio (MERCK)

2.2 PROCEDIMIENTO

2.2.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- **Solución patrón de nitrato de 100 mg/l:**

Pesar 0.1630 g de nitrato potásico anhídrido (secado a 110 °C durante 2 horas), disolver en unos 600 ml de agua destilada y enrasar a un litro en un matraz aforado.

- **Solución de Sulfato de Brucina – ácido Sulfanílico:**

Pesar 0.59 g de Sulfato de Brucina y 0.025 g de Acido Sulfanílico disolver en 18 ml de agua; Añadir 0.75 ml de HCl conc. Y enrasar con agua destilada a 250 ml en matraz aforado.

- **Solución de ácido sulfúrico:**

Añadir con cuidado 500ml Acido Sulfúrico conc. a 75 ml de agua destilada, de forma lenta, añadiendo pequeñas proporciones de volumen y dejando enfriar.

- **Solución de Hidróxido de Potasio 0.05M:**

Pesar 0.84 g Hidróxido de Potasio disolver en agua bidestilada hasta enrase 300ml

- **Solución de Cromato de potasio en Hidróxido de potasio:**

Cromato de potasio 4 mg, mas solución de hidróxido de potasio 100ml.

2.2.2 CALIBRACIÓN DEL EQUIPO: ESPECTROFOTÓMETRO UV/V

Para realizar la calibración del equipo: espectrofotómetro UV/V, se realizó un barrido espectral para comprobar la longitud de onda en el máximo de absorción utilizando una solución de 40 ppm de Cromato de Potasio en KOH 0.05M. Se determinó la precisión de la absorbancia en el máximo de absorción midiendo el %T 30 veces.⁽⁹⁾

2.2.3 ERROR RELATIVO DE CONCENTRACIÓN

(MÉTODO DE BRUCINA)

Para comprobar la longitud de onda del método, se realizó un barrido espectral utilizando una solución patrón de nitrato de 30 ppm, en el cual se procedió igual que con las curvas de calibración por estándar externo, una vez determinada la absorbancia en el máximo de absorción se procedió a medir el % T 30 veces.⁽⁹⁾

2.2.4 PREPARACIÓN DE CURVAS DE CALIBRADO CON ESTÁNDAR EXTERNO

Para la elaboración de la curva de calibrado en el rango de 5-40 mg/l de nitrato, se introdujeron en matraces aforados de 100 ml, volúmenes de 5, 10, 20, 30 y 40 ml de solución patrón de 100 mg /l de nitrato y se diluye hasta la marca. Luego de cada matraz se toman 2 ml de estándar. Se añade 1ml de la solución sulfato de brucina – ácido Sulfanílico y 10 ml de solución ácido sulfúrico. Se mezclan bien y se dejan en la oscuridad durante 10 minutos. A continuación, se añade agitando, 10 ml de agua destilada y se dejan en oscuridad durante 15 minutos, se efectúan las lecturas a una longitud de onda de 410 nm en el espectrofotómetro UV-V frente al blanco. Se realizaron 7 curvas de calibración en días y horas diferentes. ⁽¹⁾

PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN. TABLA # 1.

Nº. de matraces	B	1	2	3	4	5
Sol. Patrón de nitrato (ml)	0	5	10	20	30	40
Agua destilada (ml)	100	95	90	80	70	60
De cada matraz se tomó (ml)	2	2	2	2	2	2
Sol. Sulfato de brucina (ml)	1	1	1	1	1	1
Acido Sulfúrico (ml)	10	10	10	10	10	10
Añadir agua destilada (ml)	10	10	10	10	10	10
Concentraciones en mg / l.	0	5	10	20	30	40

2.2.5 MUESTREO

El muestreo se realizo en nueve pozos de los repartos de la ciudad de León:

-  Carlos Canales
-  El almendro
-  Félix Pedro Quiroz

Las medidas de pH y temperatura se practicaron en el mismo lugar y las muestras se identificaron de la siguiente manera.

Lugar de captación

Nº de pozo

Fecha

Hora

Temperatura

pH

En el muestreo se utilizaron envases plásticos, previamente lavados con abundante agua destilada.

Para la captación de la muestra se utilizo un balde plástico atado a una cuerda. Antes de depositar la muestra en el envase se enjuagaba este con el agua que se iban analizar; luego se deposito el agua en los recipientes destinados para el análisis y posteriormente se introdujo en un termo con hielo, una vez que la muestra se había etiquetado para su posterior análisis.

2.2.6 ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Se tomaron 2 ml de la muestra en un beacker de 100 ml y se opero exactamente igual que en la preparación de la curva de calibrado.

Etaa de medición:

Preparada la muestra se deo enfriar durante 15 minutos y se efectuaron las lecturas frente al blanco a 410 nm.

2.2.7 PREPARACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN POR ADICIÓN PATRÓN

La técnica de adición patrón se utiliza para evaluar el efecto matriz de la muestra; la curva de calibrado se prepara de forma que todos los patrones contengan la muestra en la misma cantidad. El primer punto de la curva de calibración es una dilución de muestra a la que no se le ha añadido patrón, y por lo tanto contiene la cantidad de analito original de la muestra. La concentración de la muestra se calcula como: $X = a/b$ esto es igual a la razón entre la ordenada en el origen y la pendiente.

Se introdujo en seis matraces aforados de 100 ml, 2 ml de muestra agregándose volúmenes de 0, 5, 10, 20, 30, 40 ml de solución patrón de nitrato de 100 mg /l NO_3^- respectivamente y se aforo con agua destilada. Luego de cada matraz se tomaron 2ml y se introdujeron en beackeres, a continuación se añadió a cada beackerer 1 ml de la solución sulfato de brucina – ácido sulfanilico y 10 ml de acido sulfúrico. Se mezcla bien y se deja en reposo en la oscuridad durante 10 minutos. A continuación se añade agitando 10 ml de agua estilada y se deja en reposo en la oscuridad durante 15 minutos, se efectúan las lecturas de la absorbencia frente al blanco a una longitud de onda de 410nm⁽¹⁾.

PREPARACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN POR ADICIÓN PATRÓN**TABLA # 2**

Nº de matraces	B	M	1	2	3	4	5
Volumen de muestra (ml)	0	2	2	2	2	2	2
Sol. Patrón de nitrato (ml)	0	0	5	10	20	30	40
Agua destilada (ml)	100	98	95	90	80	70	60
De cada matraz se tomó (ml)	2	2	2	2	2	2	2
Sulfato de brucina (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Acido sulfúrico (ml)	10	10	10	10	10	10	10
Añadir agua destilada (ml)	10	10	10	10	10	10	10

III. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 CALIBRACIÓN DEL EQUIPO.

ESPECTROFOTÓMETRO UV/VIS 1203.

El equipo utilizado: Espectrofotómetro UV/V 1203 Shimadzu se calibró con una solución de Cromato de potasio de 40 ppm en Hidróxido de potasio 0.05M. De acuerdo a la literatura ésta solución presenta un pico de absorción en la región visible a una longitud de onda de 375 nm con absorbancia de 0.991.

El espectro obtenido experimentalmente para el Espectrofotómetro, UV/V mostró un pico de absorción máxima a una longitud de onda de 373 nm con absorbancia de 0.985. Se presenta una disminución en la señal, esto se puede atribuir al deterioro sufrido por el equipo y uso frecuente del mismo.

Para evaluar el error fotométrico fue necesario realizar 30 lecturas de transmitancia (ver en anexos tabla 10.1) en los máximos de absorción del equipo y luego se estimó la desviación estándar. El resultado se muestra en la tabla siguiente:

TABLA N°. 3

EQUIPO	S	ΔT
Espectrofotómetro UV-V	0.0626	0.1252

La desviación estándar del equipo se calculó para evaluar la dispersión de las lecturas. De acuerdo al resultado de la tabla; el espectrofotómetro UV/V tiene poca dispersión en sus lecturas. El error fotométrico está dado por la expresión que se presenta en la ecuación:

$$\Delta C / C = (\Delta T * 0.4343) / (T * \log.T)$$

Donde:

ΔT : 2 S (Dos veces la desviación estándar de las 30 lecturas de transmitancia)

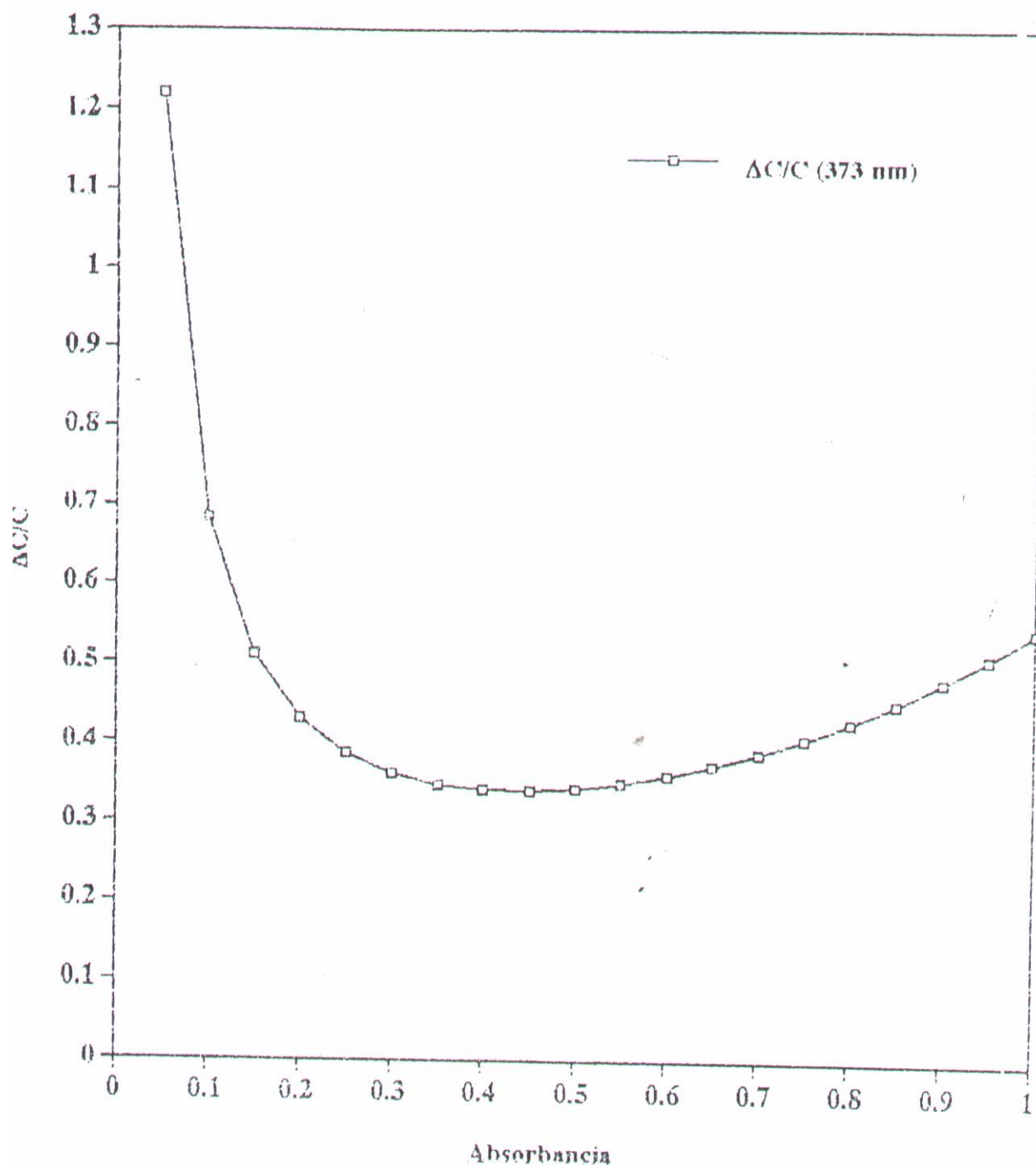
T: Transmitancia teórica

Introduciendo ΔT en la ecuación 1 y haciendo variar la transmitancia se obtuvo la curva del error fotométrico que se muestra en la figura 1 y se puede observar que en un rango aproximado de absorbancia entre 0.15 y 0.95, el error fotométricos es menor del 0.6% para el espectrofotómetro UV/V.

Podemos decir que a valores de absorbancia en los extremos de estos intervalos el porcentaje de error relativo aumenta.

Figura 1.

Error Fotométrico medido en el Espectrofotómetro UV-Vis 1203 - Shimadzu con una solución 40 ppm de cromato de potasio en hidróxido potásico 0.05 M, $\lambda = 373 \text{ nm}$.



3.2 ERROR RELATIVO DE CONCENTRACIÓN (MÉTODO DE LA BRUCINA)

Para determinar el error relativo de concentración por el método de la Brucina se realizó un barrido espectral para encontrar la longitud de onda óptima del método, siendo esta de 403 nm en el espectrofotómetro UV/V. Para llevar a cabo éste barrido se utilizó una solución estándar de 30 ppm de KNO_3 . Una vez que se encontró la longitud de onda óptima se realizaron 30 lecturas de absorbancia. Estimando su desviación estándar se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla N° 4.

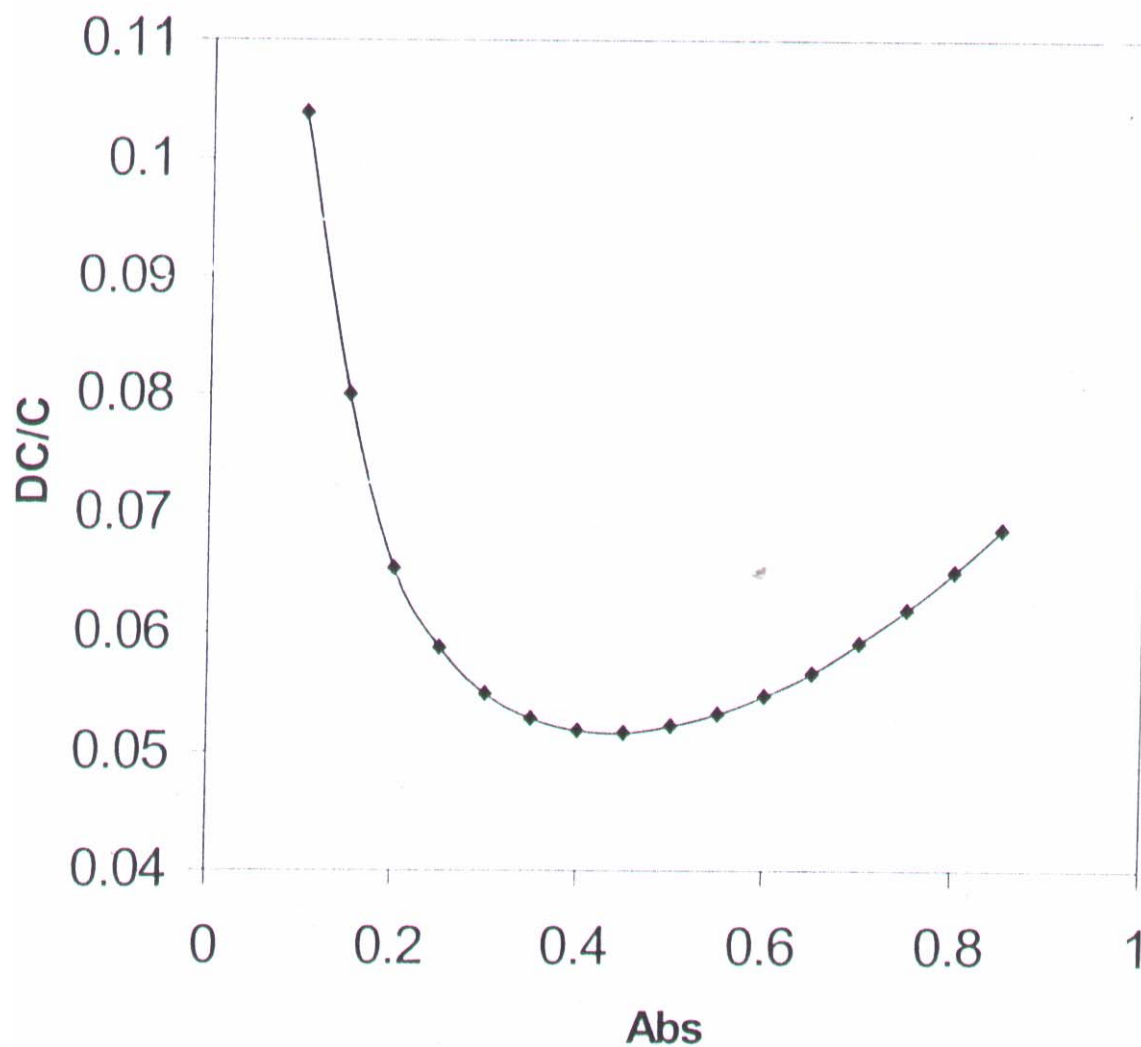
TABLA N° 4

EQUIPO	S	ΔT
Espectro fotómetro UV-V	0.0096	0.0192

Para un intervalo de absorbancias entre 0.01 - 0.1 el error relativo es grande a concentraciones altas y a concentraciones bajas. Para absorbancias próximas de 0.39 a 0.48 el error relativo de concentración es menor del 0.051 %. En este intervalo de absorbancias se obtuvo buena linealidad y pendiente para las curvas de calibración.

Figura No 2

Error relativo de concentración (Método de la Brucina) Espectrofotómetro UV Vis-
1203 Shimadzu $\lambda = 403 \text{ nm}$



3.3 CURVAS DE CALIBRACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA EL MÉTODO DE LA BRUCINA

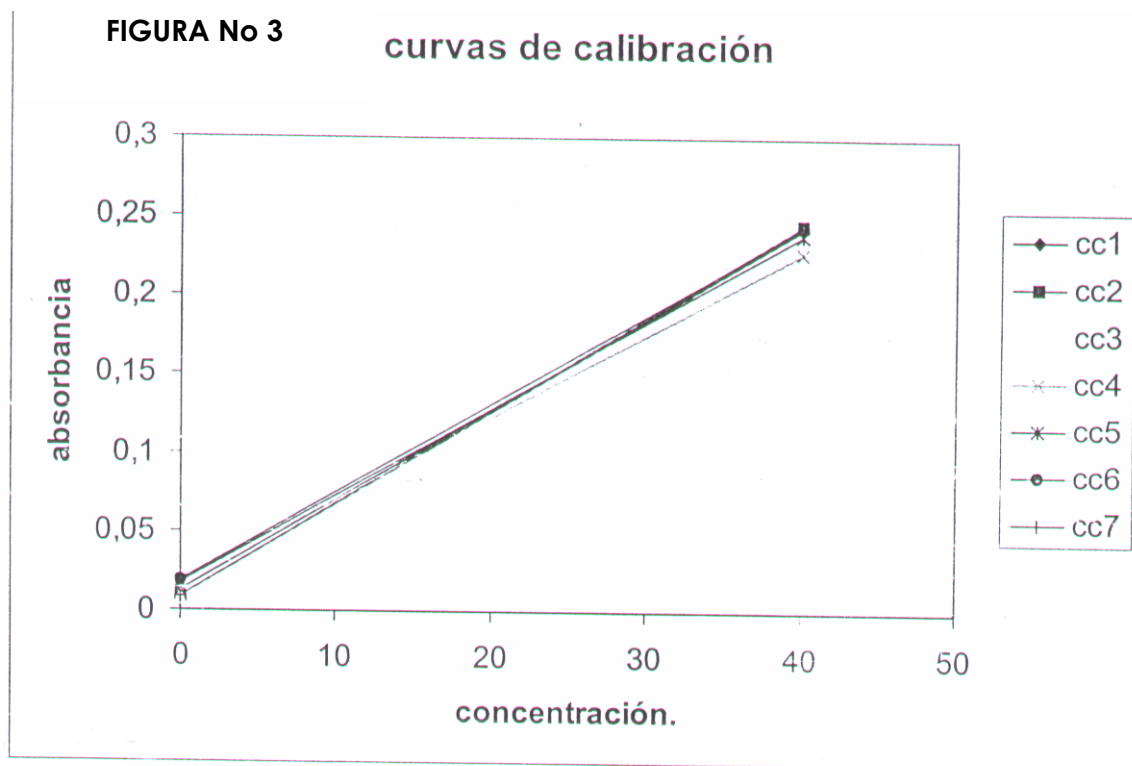
Para la elaboración de la curva de calibrado con los estándares externos se efectuaron cinco lecturas para cada patrón a los cuales se les resto el valor del blanco. Se obtuvieron siete curvas de calibración con el espectrofotómetro UV/V en diferentes días y horas, a los valores de concentración y absorbancia para las respectivas curvas de calibración se le aplicó un análisis de regresión lineal simple dando como resultado un coeficiente de correlación lineal entre la señal dada por el instrumento de medida y la concentración del analito.

Se comparó la similitud de las pendientes de las curvas de calibrado realizadas en diferentes días utilizando sus respectivos intervalos de confianza. Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas entre las pendientes, esto permitió representar una curva de calibración media llamada curva de calibración por estándar externo. Los resultados de estas curvas se representan en la tabla N° 5.

CURVA DE CALIBRACION POR ESTÁNDAR EXTERNO

TABLA N°. 5

Concentración	Abs.	r^2	Intercepto (a)	Pendiente (b)
5.0	0.038			
10.0	0.069			
20.0	0.131	0.9948	0.0110 ± 0.1755	0.0058 ± 0.0008
30.0	0.186			
40.0	0.233			

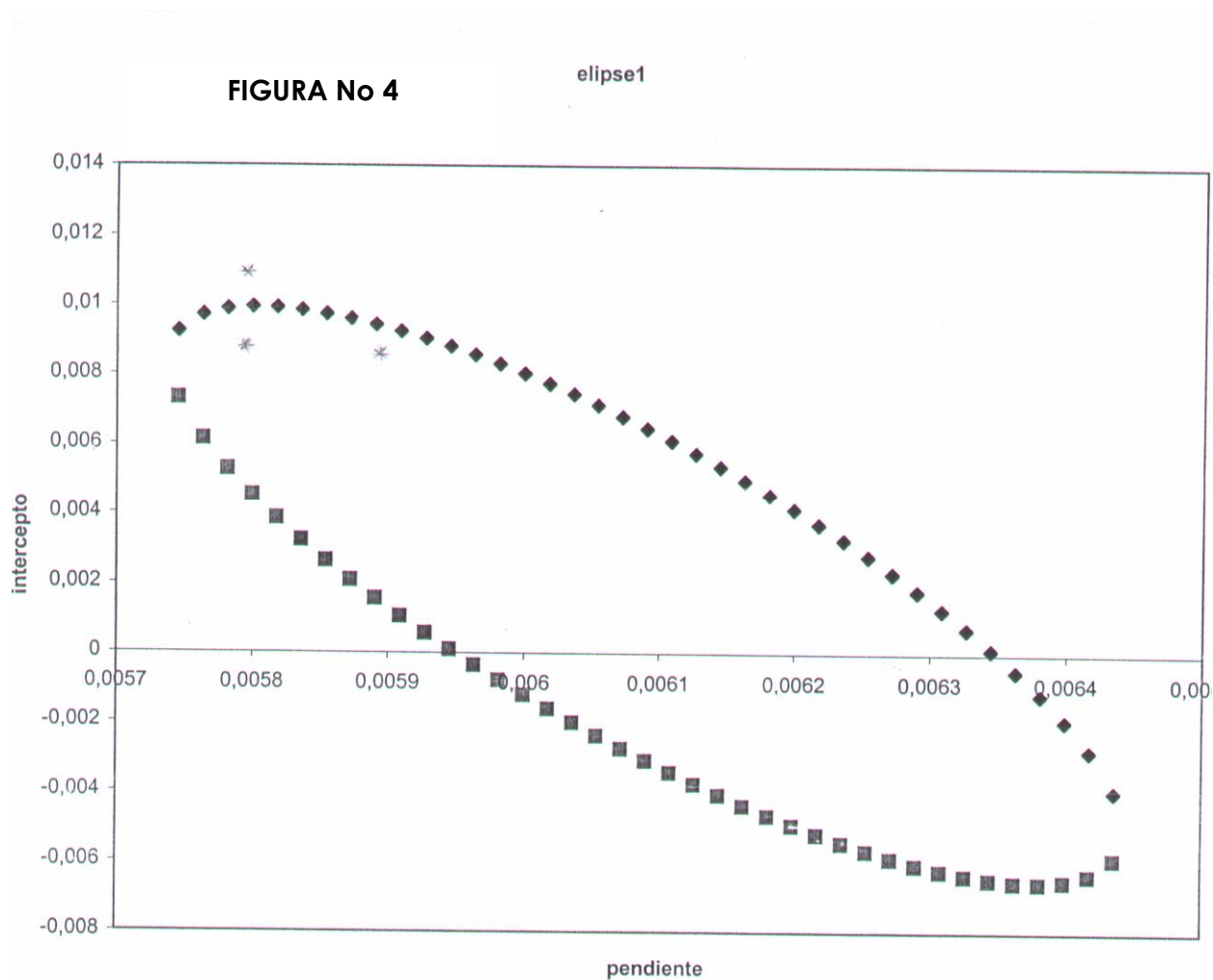


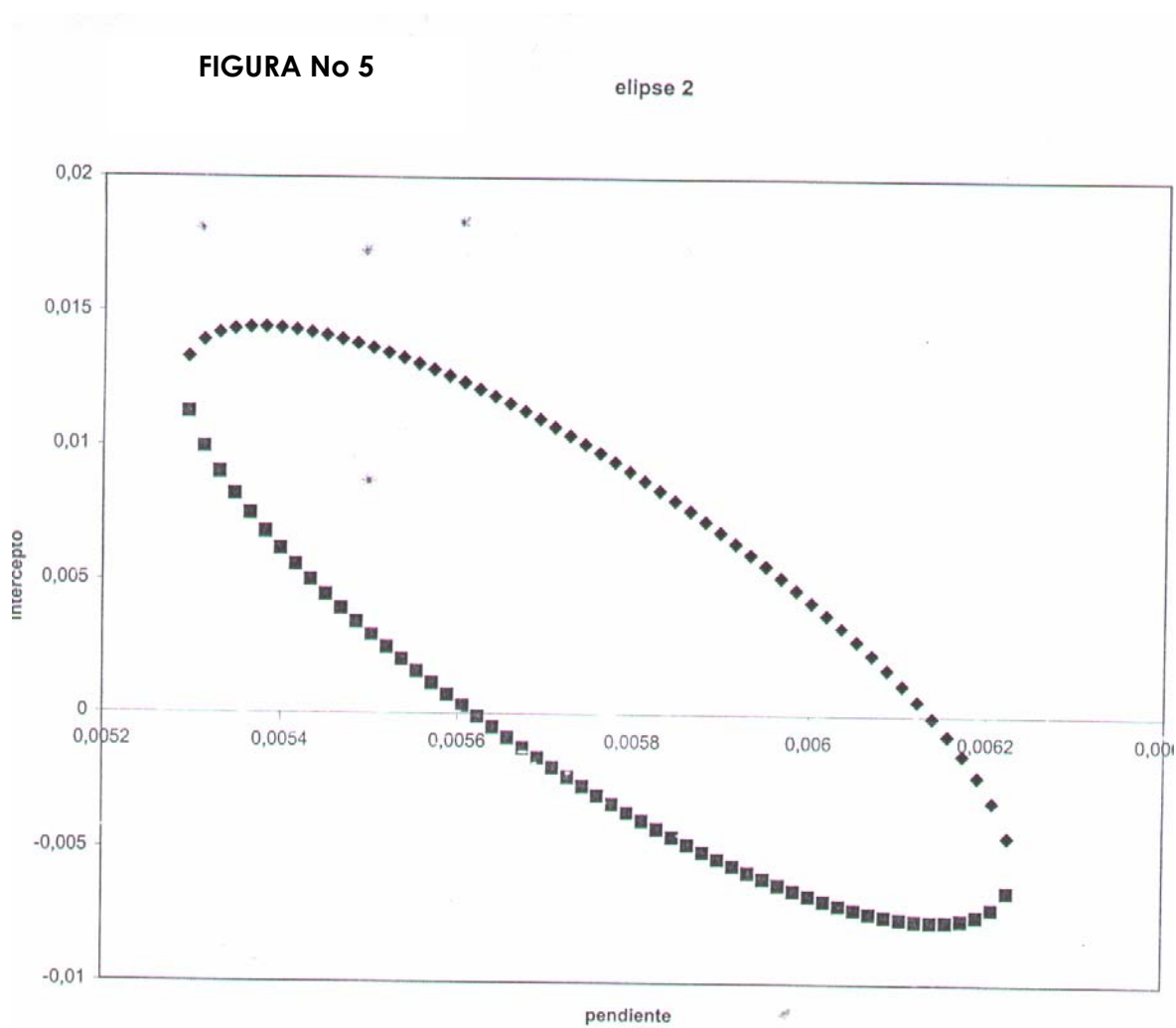
Al aplicar un control más riguroso a las pendientes e interceptor de las rectas de calibración obtenidas en días diferentes a través de una elipse, se observó que éstos se salían del control, esto se evidencia cuando al representar los puntos respectivos para cada recta de calibración, aparecen fuera de la elipse figura N° 4 y N° 5.

La figura N° 4 corresponde a datos de muestras tomadas en el período del mes de Julio de mil novecientos noventa y ocho y la figura N° 5 corresponde a datos de muestras tomadas en el período del mes de Octubre del mismo año.

La causa de esta variación puede ser atribuida a la inestabilidad de reactivos entre ellos la Brucina que es muy sensible a la luz y la temperatura, y al grado de pureza del ácido sulfúrico

.





3.4 LINEALIDAD Y RANGO

El coeficiente de determinación " r^2 " para las curvas de calibración utilizando el espectro fotómetro UV/V fue de 0.9987, lo que indica que en el rango de concentración de 0 a 40 ppm existe una buena linealidad lo cual se observa en la figura N° 3. Sin embargo debido a las múltiples manipulaciones de las muestras, este es afectado.

3.5 SENSIBILIDAD

Los valores de las respectivas pendientes para el espectrofotómetro UV/V b₁: 0.0058 nos proporciona información acerca de la sensibilidad del método, y se puede apreciar que el método es sensible a pequeños cambios de concentración.

3.6 LIMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO, LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN, Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN PRÁCTICO

De acuerdo a la IUPAC y al criterio de los métodos normalizados para determinar los diferentes límites de detección:

$$\text{L.D.M} = Y - Y_B = 3 S_B, \text{ L.D.C} = Y_B + 10 S_B, \text{ L.C.P} = 5 \text{ L.D.M.}$$

Se utilizaron las lecturas del blanco obtenidas en los diferentes días que se realizaron las curvas de calibración, se estimó la desviación estándar y obtuvieron los diferentes límites para el método utilizando Espectrofotómetro. Los resultados se muestran en la tabla No 6:

TABLA N°. 6

EQUIPO	L.D.M	L.D.C	L.C.P
Espectrofotómetro UV-V	2.7 mg/l	9.0 mg/l	13.6 mg/l

3.7 REPETIBILIDAD

Para medir la repetibilidad del método utilizando el ESPECTROFOTOMETRO UV/V, se prepararon estándares de concentraciones de 25 y 35 ppm; a los que se les aplicó igual procedimiento que a los estándares externos; para cada estándar se efectuaron replicas en días diferentes, los resultados fueron los siguientes:

TABLA No. 7**Valores de repetibilidad del estándar 1 (25 ppm)**

REPLICAS	PRIMER DÍA	SEGUNDO DÍA
1	0.166	0.165
2	0.166	0.166
3	0.167	0.166
4	0.167	0.167
5	0.166	0.166
Medias	0.1664	0.166
Desviaciones estándares	0.0005	0.0007
S^2	0.0000003	0.0000003
R.S.D %	0.3001	0.3001

TABLA No. 8**Valores de repetibilidad del estándar 2 (35 ppm)**

REPLICAS	PRIMER DIA	SEGUNDO DIA
1	0.214	0.216
2	0.215	0.215
3	0.215	0.216
4	0.214	0.215
5	0.215	0.215
Medías	0.2146	0.2154
Desviaciones estándares	0.0005	0.0005
S^2	0.0000003	0.0000003
R.S.D. %	0.2330	0.2321

Para probar la precisión del método en el equipo se utilizó el test F de Fisher que compara las varianzas muestrales, es decir, los cuadrados de las desviaciones estándar de los conjuntos de datos; la hipótesis nula adoptada es que las poblaciones de donde se toman las muestras sean normales y que las varianzas sean iguales. Para aceptar o rechazar ésta hipótesis se comparó el F_{cal} con el F_{tab} , y como el valor del F_{cal} no excede el valor de F_{tab} se acepta la hipótesis nula y se concluye que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas estudiadas a un nivel de confianza de 0.05.

3.8 EFECTO DE MATRIZ Y CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para el estudio de las concentraciones en las muestras de aguas subterráneas de los repartos: Feliz Pedro Carrillo, Carlos Canales y El Almendro, se elaboraron 3 curvas de calibración por adición patrón para cada muestra; la preparación de éstas curvas se detalla en la tabla N° 2, los valores de absorbancia correspondiente para cada estándar por la técnica de adición patrón se presentan en anexos; las cuales fueron analizadas al igual que las curvas de calibración por estándares externos por un programa llamado Chemstat, donde se comparó la similitud de varianzas y pendientes entre curvas de calibración por adición patrón realizadas con una misma muestra. Los resultados mostraron que no existe diferencia significativa entre ellas, permitiendo representar una curva de calibración media para cada muestra.

Los valores de pendiente y sus intervalos de confianza para la curva de estándares externos como para la curva media de adición patrón para cada muestra se representan en la tabla No 9.

TABLA No .9

Curvas de calibración	Valores de las pendientes	Incertidumbre en el valor de la pendiente (b)	Intervalo de Valor superior	Valor de Confianza inferior
Estándar externo	0.0058	± 0.00083	0.0066	0.0050
Adición patrón M₁	0.0052	± 0.00018	0.0054	0.0050
Adición patrón M₂	0.0052	± 0.00075	0.0060	0.0045
Adición patrón M₃	0.0053	± 0.00049	0.0058	0.0048

De los valores mostrados en la tabla No. 9 se puede observar que existe intersección entre los intervalos de confianzas de las pendientes de la curva por estándares externos con los de la curva de adición patrón, esto indica que no existe efecto de matriz por lo que fue necesario realizar un test que comparó la similitud de varianzas y pendientes entre dos curvas de calibrado a un nivel de significación de 0.05, resultando que no existe diferencia significativa entre las varianzas y pendientes por lo que se comprueba que no existe efecto de matriz entre las muestras. En las figuras 6,7, y 8 se presentan las curvas de calibración de estándares externos con las respectivas curvas de adición patrón para las muestras.

Comparación de las Curvas de Adición Patrón con la Curva de Estándar Externo (M)

FIGURA No 6

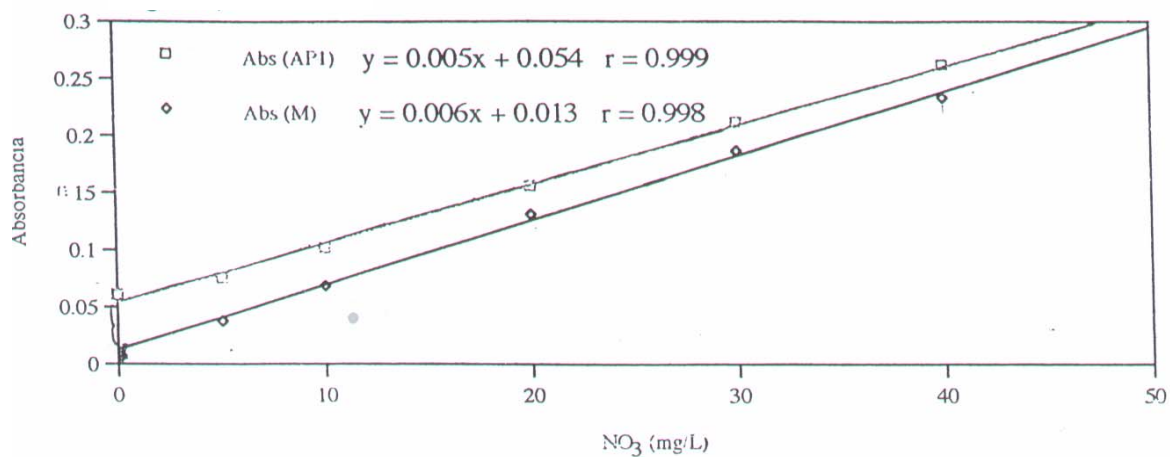


FIGURA No 7

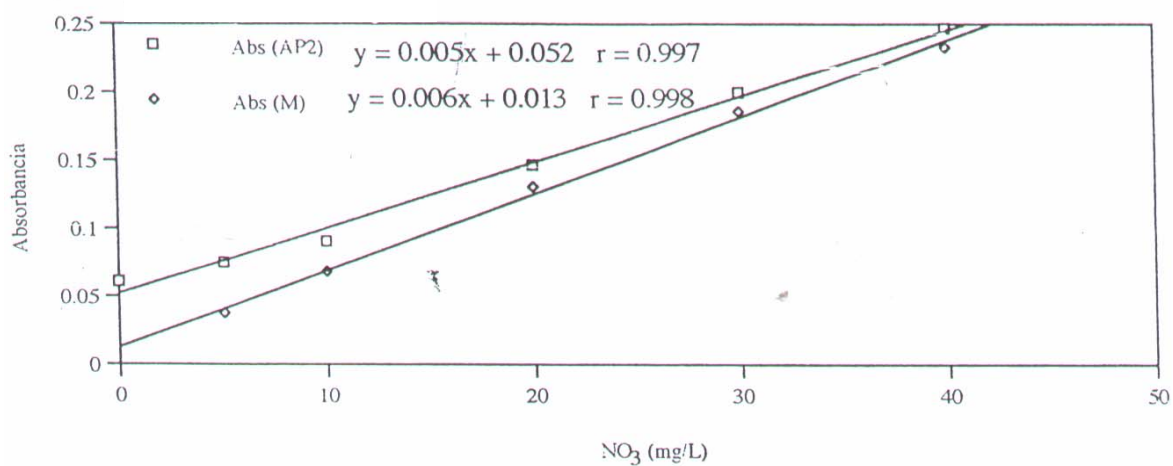
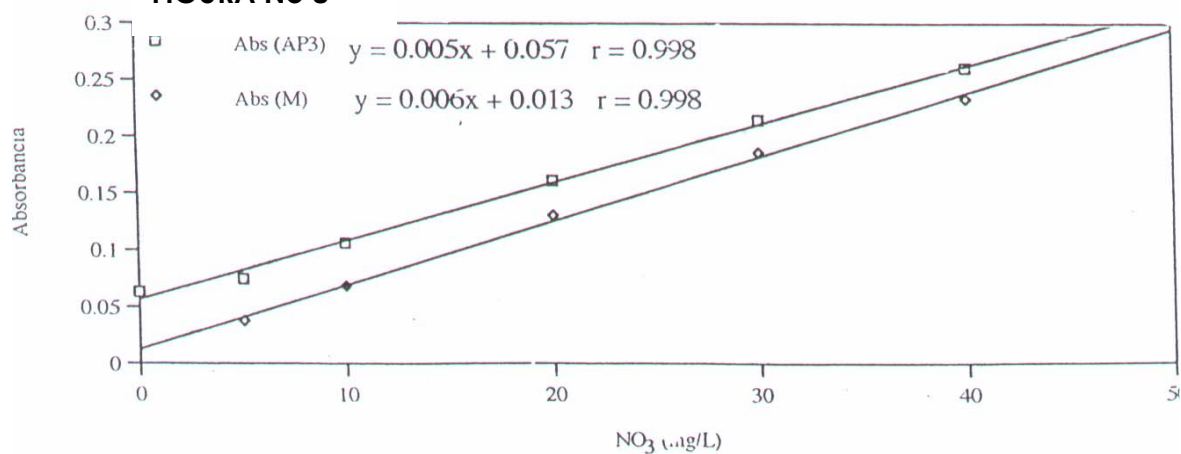


FIGURA No 8



3.8.1 CÁLCULO DE CONCENTRACIONES

Para calcular la concentración de nitrato total en cada una de las muestras se elaboraron las respectivas curvas de adición patrón. La concentración de la muestra calculada por éste procedimiento fue comparada con la concentración de la muestra a partir de la curva de calibración de los estándares externos.

Ejemplificaremos el procedimiento de cálculo con una de las muestras.

$$\text{Sea: } Y_1 = b_{01} + b_{11} * X \quad (\text{Ec. \# 2})$$

La recta de regresión de la curva de adición patrón y

$$\text{Sea: } Y_2 = b_{02} + b_{12} * X \quad (\text{Ec. \# 3})$$

La recta de regresión de estándar externo.

Específicamente para una muestra obtenida de aguas provenientes del Reparto El Almendro. Los valores del intercepto y la pendiente son los siguientes:

$$b_{01} = 0.0548 \quad b_{02} = 0.0110$$

$$b_{11} = 0.0050 \quad b_{12} = 0.0058$$

Por tanto la ecuación de la recta de la curva de adición sería la siguiente:

$$Y_1 = 0.0548 + 0.0050 * X$$

$$Y_2 = 0.0110 + 0.0058 * X$$

que es la ecuación de la recta de la curva de estándar externo.

Para calcular la concentración de la muestra a partir de la curva de adición patrón, haciendo

$Y_1 = 0$, la concentración de la muestra sería:

$$X = 0.0548 / 0.0050 = 10.88$$

$$C_M = 10.88 \text{ mg/l NO}_3^-$$

Para calcular la concentración de la muestra a partir de la curva de estándares externos, despejando la concentración de la ecuación # 3, resulta:

$$X = (Y_2 - b_{02}) / b_{12}$$

$$X = (0.0632 - 0.0110) / 0.0058$$

$$X = 9$$

$$C_M = 9 \text{ mg/l NO}_3^-$$

De igual manera se calculó las concentraciones y error relativo de las muestras de los

Repartos: El Almendro y Carlos Canales, puesto que cuando se trabaja con muestras cuyas concentraciones se encuentren en los extremos de la curva se obtiene un error relativo grande como es el caso estudiado

Abs = 0.0632	Abs = 0.0510	Abs = 0.0518
--------------	--------------	--------------

$C_M = 10.88$	$C_M = 5.7$	$C_M = 5.7$
---------------	-------------	-------------

$C_{EE} = 9$	$C_{EE} = 6.9$	$C_{EE} = 7$
--------------	----------------	--------------

$E_R = 17.28$	$E_R = 21$	$E_R = 22.8$
---------------	------------	--------------

Dado que no se disponía de una muestra de referencia, el porcentaje de error relativo encontrado para cada muestra se calculó utilizando la concentración de la muestra (C_M) por el método de adición patrón como el valor verdadero y la concentración de la muestra calculada por estándares externos (C_{EE}) como el valor experimental. Conociendo los valores de las concentraciones obtenidas por los dos procedimientos, se puede calcular el respectivo porcentaje de error.

$$\% \text{ Error Relativo de concentración de las muestras} = \left| \frac{\text{C.A.P} - \text{C.E.E} \times 100}{\text{C.A.P}} \right|$$

Para la muestra del Reparto El Almendro pozo # 4 el error relativo encontrado fue de 17.28 %, para la del Reparto Carlos Canales pozo # 1 y 2 el error relativo encontrado fue de 21.0 % y 22.8 % respectivamente.

También podemos observar que a medida que aumenta la concentración el error relativo disminuye. Para minimizar el error es necesario utilizar muestras cuyas concentraciones se encuentren distintas de los extremos del intervalo estudiado.

.

CONCLUSIÓN

En la validación del método de la Brucina para la determinación de nitrato en aguas subterráneas se comprobó que los parámetros de eficiencia se ajustan a las aplicaciones realizadas al método.

El método permite un límite de detección LDM = 2.72 mg /l NO₃⁻, LDC = 9.0 mg/l NO₃⁻ y un LCP = 13.6 mg/l NO₃⁻.

Un control realizado a las pendientes e interceptos de las rectas de calibración obtenidas en el período de Julio a Octubre de mil novecientos noventa y ocho a través de una elipse, se observó que se salían de control, la causa de ésta variación se puede atribuir a la inestabilidad de la brucina, ya que esta es muy sensible a la inconstancia de la temperatura, al grado de pureza del ácido sulfúrico y la luz.

El método presenta buena linealidad en el rango de concentraciones establecidas de 0-40 ppm es de 0.9987.

Se evaluó el efecto de matriz aplicando la técnica de adición patrón, comparando las concentraciones de las curvas de calibración con estándares externos, ya que el propósito es minimizar el error al calcular las concentraciones de las muestras, utilizando una curva de calibración con estándar externo.

Una vez validado el método se aplicó al análisis de nitrato en muestras de aguas subterráneas.

Las muestras obtenidas en los diferentes repartos de la ciudad de León mostraron los siguientes valores de concentraciones de nitrato:

El Almendro pozo # 4 = 10.88 mg / l

Carlos Canales pozo # 1 = 7.7 mg / l

RECOMENDACIONES

- **Comparar los resultados del método de la Brucina con otros métodos.**
- **Por ser un método de fácil aplicación se puede utilizar en laboratorios donde no se disponga de otros equipos.**
- **Darle continuidad a este estudio evaluando la calidad de aguas subterráneas.**

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Moreno Caselles, Joaquín. "Tratamiento y control de las aguas para consumo humano." Departamento de Ciencias Experimentales y Tecnológicas, Universidad Miguel Hernández, España.**
- 2) APHA, AWWA, WPCP. "Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales." Edición Díaz de Santos, S.A. 1992.**
- 3) Ville A. Claude. "Biología General." Nueva Editorial Interamericana.", México, T).F, 1982.**
- 4) Ayres Gilbert H. "Análisis Químico Cuantitativo", 2da Edición, Ediciones del Castillo 1970.**
- 5) Delgado, Gustavo. "Validación de Métodos Analíticos.", UNAN- LEÓN, Nic. 1996.**
- 6) Varcarsel M. y A. Ríos. (Eds), "Calidad en los Laboratorios Analíticos", Reverte Barcelona, 1992.**
- 7) León Rojas, Carlos. "Métodos para lavar equipos para análisis de trazas", Centro de Electroquímica y Energía Química (CELEQ). Ciudad Universitaria. Rodrigo Facio. (1994).**
- 8) Delgado, Gustavo / Zapata, Benito. "Capacitación en el manejo del Espectro fotómetro UV/V con arreglo de Diodos acoplados a una computadora 486", Departamento de Química UNAN- LEÓN, Nicaragua, 1994.**

9) Miller J. C y J. N, Miller. "Estadística para Química Analítica.", Segunda Edición, Addison Wesley Iberoamericana, Wilmington, Delaware, 1993.

10) Ramis Ramos Guillermo. "Curso de Quimiometría" (Folleto), Universidad de Valencia- León, 1995-1996.

ANEXOS

TABLA # 10 ERROR FOTOMETRICO, MEDIDOS PARA EL ESPECTROFOTOMETRO UV / V**(CON UNA SOLUCION 40 pmm DECROMATO DE POTACIO EN HIDROXIDO DE POTASIO 0.05N)** $\lambda = 373\text{nm}$ $S = 0.0626$ $\Delta t = 0.1252$

Nº	ABS	$\Delta C/C$	Nº	ABS	$\Delta C/C$	Nº	ABS	$\Delta C/C$
1	0.01	5.5484	28	0.28	0.3699	55	0.55	0.3508
2	0.02	2.8468	29	0.29	0.3657	56	0.56	0.3526
3	0.03	1.9419	30	0.30	0.3615	57	0.57	0.3545
4	0.04	1.4897	31	0.31	0.3582	58	0.58	0.3563
5	0.05	1.2192	32	0.32	0.3549	59	0.59	0.3584
6	0.06	1.0397	33	0.33	0.3522	60	0.60	0.3608
7	0.07	0.9123	34	0.34	0.3499	61	0.61	0.3632
8	0.08	0.8177	35	0.35	0.3479	62	0.62	0.3657
9	0.09	0.7438	36	0.36	0.3459	63	0.63	0.3681
10	0.10	0.6848	37	0.37	0.3446	64	0.64	0.3709
11	0.11	0.6367	38	0.38	0.3433	65	0.65	0.3737
12	0.12	0.5975	39	0.39	0.3422	66	0.66	0.3766
13	0.13	0.5640	40	0.40	0.3415	67	0.67	0.3797
14	0.14	0.5362	41	0.41	0.3409	68	0.68	0.3826
15	0.15	0.512	42	0.42	0.3405	69	0.69	0.3859
16	0.16	0.4912	43	0.43	0.3403	70	0.70	0.3892
17	0.17	0.4732	44	0.44	0.3403	71	0.71	0.3929
18	0.18	0.4573	45	0.45	0.3405	72	0.72	0.3963
19	0.19	0.4431	46	0.46	0.3409	73	0.73	0.4001
20	0.20	0.4309	47	0.47	0.3413	74	0.74	0.4037
21	0.21	0.4119	48	0.48	0.3422	75	0.75	0.4076
22	0.22	0.4101	49	0.49	0.3428	76	0.76	0.4116
23	0.23	0.4016	50	0.50	0.3439	77	0.77	0.4157
24	0.24	0.3937	51	0.51	0.3450	78	0.78	0.4202
25	0.25	0.3867	52	0.52	0.3463	79	0.79	0.4245
26	0.26	0.3805	53	0.53	0.3477	80	0.80	0.4288
27	0.27	0.3750	54	0.54	0.3492	81	0.81	0.4326

TABLA # 10 ERROR FOTOMETRICO, MEDIDOS PARA EL ESPECTROFOTOMETRO UV / V
(CON UNA SOLUCION 40 pmm DECROMATO DE POTACIO EN HIDROXIDO DE POTASIO 0.05N)

 $\lambda = 373\text{nm}$ $S = 0.0626$ $\Delta t = 0.1252$

Nº	ABS	$\Delta C/C$	Nº	ABS	$\Delta C/C$	Nº	ABS	$\Delta C/C$
82	0.82	0.4381	89	0.89	0.4745	96	0.96	0.5164
83	0.83	0.4428	90	0.90	0.4799	97	0.97	0.5233
84	0.84	0.4479	91	0.91	0.4859	98	0.98	0.5299
85	0.85	0.4527	92	0.92	0.4916	99	0.99	0.5368
86	0.86	0.4581	93	0.93	0.4975	100	1.00	0.5437
87	0.87	0.4632	94	0.94	0.5039			
88	0.88	0.4687	95	0.95	0.5101			

TABLA # 10.1**CALIBRACION DEL ESPECTROFOTOMETRO UV / V, $\lambda = 373$ nm.**

Nº	% T	Nº	% T
1	10.3	16	10.3
2	10.4	17	10.2
3	10.3	18	10.2
4	10.4	19	10.4
5	10.4	20	10.4
6	10.3	21	10.4
7	10.4	22	10.4
8	10.4	23	10.4
9	10.4	24	10.4
10	10.4	25	10.3
11	10.4	26	10.4
12	10.4	27	10.3
13	10.3	28	10.4
14	10.3	29	10.4
15	10.3	30	10.4

TABLA No 11 ERROR MINIMO DE CONCENTRACION, MEDIDOS PARA EL METODO DE LA BRUCINA (ESPECTROFOTOMETRO UV/ VIS)

N°	X (ABS)	Y (DC/C)	N°	X (ABS)	Y (DC/C)	N°	X (ABS)	Y (DC/C)
1	0,10	0,10390	31	0,40	0,05180	61	0,70	0,05910
2	0,11	0,09960	32	0,41	0,05170	62	0,71	0,05960
3	0,12	0,09060	33	0,42	0,05170	63	0,72	0,06010
4	0,13	0,08560	34	0,43	0,05160	64	0,73	0,06070
5	0,14	0,08130	35	0,44	0,05160	65	0,74	0,06130
6	0,15	0,08000	36	0,45	0,05160	66	0,75	0,06190
7	0,16	0,07450	37	0,46	0,05170	67	0,76	0,06250
8	0,17	0,07180	38	0,47	0,05180	68	0,77	0,06310
9	0,18	0,06937	39	0,48	0,05190	69	0,78	0,06370
10	0,19	0,06730	40	0,49	0,05200	70	0,79	0,06440
11	0,20	0,06540	41	0,50	0,05220	71	0,80	0,06510
12	0,21	0,06370	42	0,51	0,05240	72	0,81	0,06580
13	0,22	0,06220	43	0,52	0,05250	73	0,82	0,06650
14	0,23	0,06090	44	0,53	0,05274	74	0,83	0,06720
15	0,24	0,05970	45	0,54	0,05300	75	0,84	0,06790
16	0,25	0,05870	46	0,55	0,05320	76	0,85	0,06870
17	0,26	0,05770	47	0,56	0,05350	77	0,86	0,06950
18	0,27	0,05690	48	0,57	0,05370	78	0,87	0,07000
19	0,28	0,05610	49	0,58	0,05410	79	0,88	0,07110
20	0,29	0,05550	50	0,59	0,05440	80	0,89	0,07190
21	0,30	0,05490	51	0,60	0,05470	81	0,90	0,07280
22	0,31	0,05430	52	0,61	0,05510	82	0,91	0,07300
23	0,32	0,05390	53	0,62	0,05550	83	0,92	0,07541
24	0,33	0,05340	54	0,63	0,05670	84	0,93	0,07631
25	0,34	0,05300	55	0,64	0,05630	85	0,94	0,07726
26	0,35	0,05280	56	0,65	0,05660	86	0,95	0,07823
27	0,36	0,05250	57	0,66	0,05710	87	0,96	0,07922
28	0,37	0,05220	58	0,67	0,05760	88	0,97	0,08022
29	0,38	0,05200	59	0,68	0,05810	89	0,98	0,08127
30	0,39	0,05190	60	0,69	0,05860	90	0,99	0,08231
						91	1,00	0,10100

TABLA No 11.1

Calibración espectrofotométrica en el máximo de absorción, $\lambda = 410$ nm (método de la brucina)

Espectrofotómetro UV/V SHIMADZU

Nº	% T	Nº	% T
1	64.9	16	64.4
2	64.9	17	64.6
3	64.9	18	64.6
4	64.7	19	64.7
5	64.7	20	64.6
6	64.7	21	64.4
7	64.7	22	64.4
8	64.7	23	64.4
9	64.6	24	64.3
10	64.7	25	64.4
11	64.7	26	64.6
12	64.6	27	64.4
13	64.7	28	64.6
14	64.7	29	64.7
15	64.7	30	64.6

Curva de calibración # 1 21-07-98

Blanco	5 mg/l NO ₃	10 mg/l NO ₃	20 mg/l NO ₃	30 mg/l NO ₃	40 mg/l NO ₃
0.009	0.031	0.069	0.131	0.191	0.236
0.007	0.031	0.067	0.134	0.190	0.234
0.011	0.034	0.069	0.131	0.190	0.235
0.008	0.031	0.068	0.134	0.189	0.234
0.009	0.031	0.068	0.134	0.190	0.235
Media = 0.0088	Media = 0.0316	Media = 0.0682	Media = 0.1328	Media = 0.1906	Media = 0.2348
		$r^2=0.9930$			
		$a=0.0090$			
		$b=0.0058$			

Curva de calibración # 2 22-07-98

Blanco	5mg/l NO ₃	10mg/l NO ₃	20 mg/l NO ₃	30 mg/l NO ₃	40 mg/l NO ₃
0.011	0.035	0.068	0.135	0.191	0.236
0.010	0.036	0.067	0.136	0.191	0.236
0.007	0.036	0.067	0.136	0.191	0.236
0.008	0.035	0.068	0.135	0.192	0.235
0.009	0.036	0.068	0.135	0.191	0.235
Media = 0.0090	Media = 0.0356	Media = 0.0676	Media = 0.1354	Media = 0.1912	Media = 0.2356
		$r^2=0.9934$			
		$a=0.0115$			
		$b=0.0058$			

Curva de calibración # 3 28-07-98

Blanco	5 mg/l NO ₃	10 mg/l NO ₃	20 mg/l NO ₃	30 mg/l NO ₃	40 mg/l NO ₃
0.009	0.033	0.069	0.131	0.188	0.241
0.011	0.034	0.069	0.131	0.188	0.241
0.011	0.034	0.070	0.131	0.188	0.242
0.009	0.035	0.068	0.130	0.189	0.242
0.010	0.034	0.070	0.130	0.189	0.241
Media = 0.0100	Media = 0.0340	Media = 0.0692	Media = 0.1306	Media = 0.1884	Media = 0.2414
		r²=0.9980			
		a=0.0086			
		b=0.0059			

Curva de calibración # 4 05-10-98

Blanco	5 mg/l NO ₃	10 mg/l NO ₃	20 mg/l NO ₃	30 mg/l NO ₃	40 mg/l NO ₃
0.010	0.035	0.059	0.118	0.178	0.222
0.009	0.036	0.059	0.118	0.178	0.223
0.008	0.034	0.058	0.118	0.179	0.222
0.008	0.036	0.058	0.119	0.177	0.222
0.008	0.036	0.059	0.119	0.177	0.223
Media = 0.0086	Media = 0.0354	Media = 0.0586	Media = 0.1184	Media = 0.1778	Media = 0.2224
		r²=0.9972			
		a=0.0074			
		b=0.0055			

Curva de calibración #5 13-10-98

Blanco	5 mg/l NO ₃	10 mg/l NO ₃	20 mg/l NO ₃	30 mg/l NO ₃	40 mg/l NO ₃
0.008	0.042	0.067	0.130	0.180	0.221
0.007	0.042	0.066	0.131	0.180	0.222
0.006	0.042	0.067	0.130	0.179	0.223
0.007	0.042	0.067	0.131	0.180	0.223
0.006	0.042	0.067	0.131	0.180	0.223
Media = 0.0068	Media = 0.0420	Media = 0.0668	Media = 0.1306	Media = 0.1798	Media = 0.2224
		r²=0.9944			
		a=0.0180			
		b=0.0053			

Curva de calibración # 6 15-10-98

Blanco	5 mg/l NO ₃	10 mg/l NO ₃	20 mg/l NO ₃	30 mg/l NO ₃	40 mg/l NO ₃
0.011	0.040	0.073	0.133	0.189	0.232
0.011	0.039	0.073	0.133	0.189	0.233
0.010	0.040	0.073	0.132	0.189	0.233
0.010	0.041	0.073	0.132	0.190	0.232
0.010	0.041	0.073	0.132	0.189	0.233
Media = 0.0104	Media = 0.0402	Media = 0.0730	Media = 0.1324	Media = 0.1892	Media = 0.2326
		r²=0.9956			
		a=0.0171			
		b=0.0055			

Curva de calibración # 7 16-10-98

Blanco	5 mg/l NO₃	10 mg/l NO₃	20 mg/l NO₃	30 mg/l NO₃	40 mg/l NO₃
0.012	0.046	0.077	0.135	0.185	0.244
0.011	0.044	0.075	0.135	0.187	0.245
0.011	0.045	0.076	0.134	0.186	0.244
0.010	0.044	0.075	0.136	0.185	0.243
0.011	0.045	0.075	0.136	0.186	0.244
Media = 0.0110	Media = 0.0448	Media = 0.0756	Media = 0.1352	Media = 0.1858	Media = 0.2440
		r²=0.9992			
		a=0.0186			
		b=0.0056			

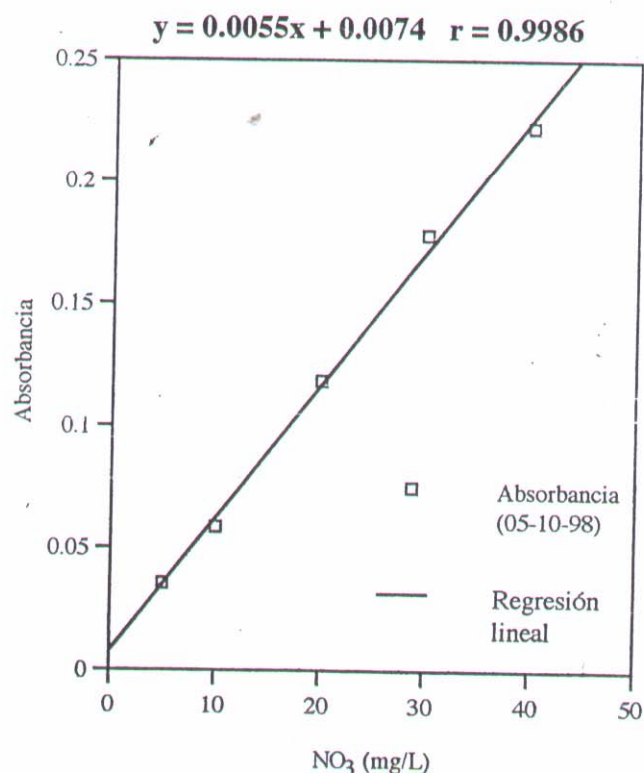
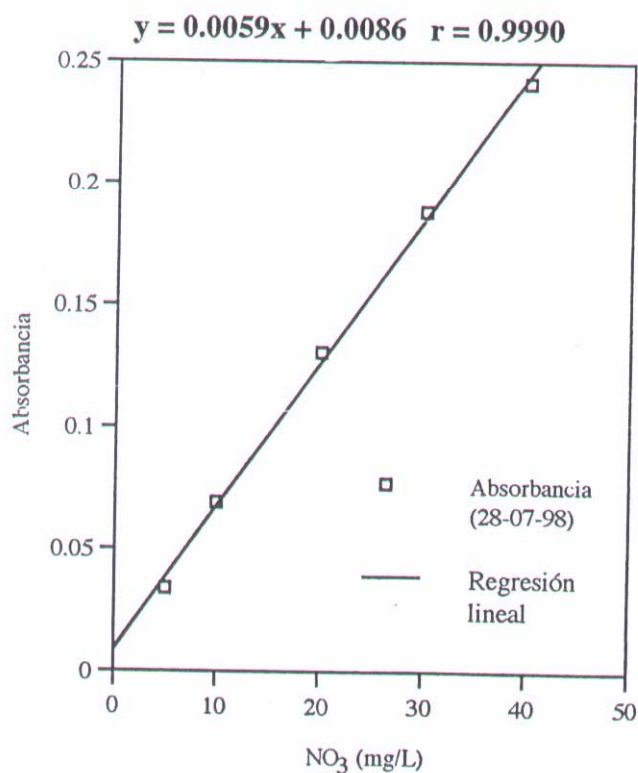
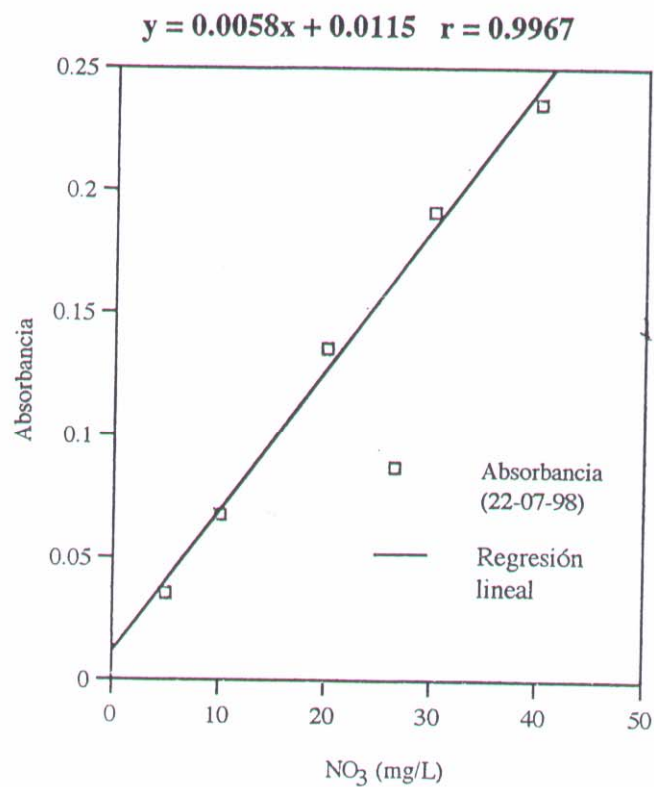
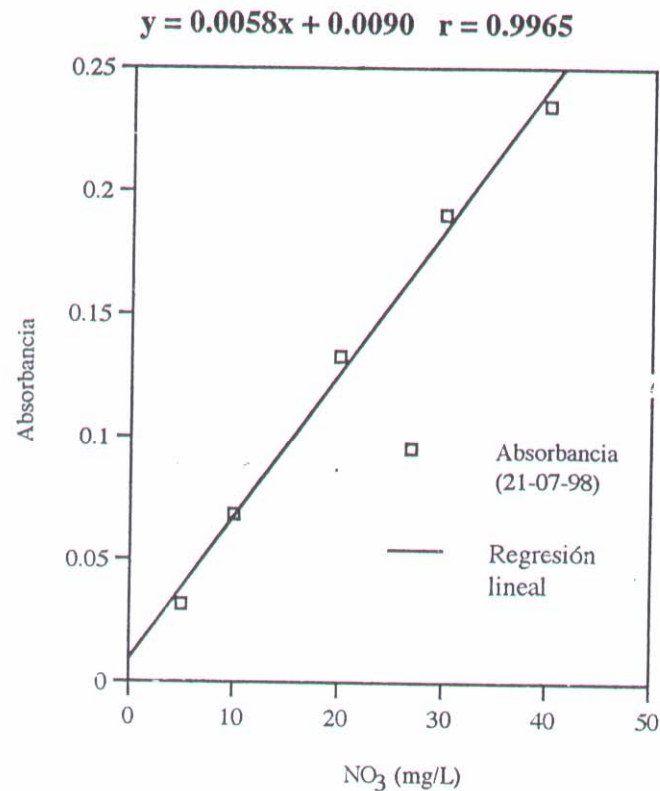
Figura # 7, 8, 9,10 Curvas de calibración (Método de la Brucina)**Espectrofotómetro UV_Vis-1203 Shimadzu (410nm)**

Figura # 11, 12, 13 Curvas de calibración (Método de la Brucina)**Espectrofotómetro UV_Vis-1203 Shimadzu (410nm)**