



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN
DE NITRITOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE LUZ
VISIBLE EN AGUA SUPERFICIAL Y POTABLE EN LA
EMPRESA PÚBLICA METROPOLITANA DE AGUA POTABLE
Y SANEAMIENTO (EPMAPS)**

AUTOR: SÁNCHEZ NACEVILLA ALEXANDER WLADIMIR

DIRECTOR: Ing. VARGAS VERDESOTO RAFAEL EDUARDO

SANGOLQUÍ

2017



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA

AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE NITRITOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE LUZ VISIBLE EN AGUA SUPERFICIAL Y POTABLE EN LA EMPRESA PÚBLICA METROPOLITANA DE AGUA POTABLE Y SANEAMIENTO (EPMAPS)”, realizado por el señor SÁNCHEZ NACEVILLA ALEXANDER WLADIMIR, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor SÁNCHEZ NACEVILLA ALEXANDER WLADIMIR para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 14 de Agosto del 2017

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'R. Vargas', written over a horizontal line.

Ing. Rafael Vargas

DIRECTOR



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA

AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **ALEXANDER WLADIMIR SÁNCHEZ NACEVILLA**, con cédula de identidad N° 1721996385, declaro que este trabajo de titulación **“VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE NITRITOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE LUZ VISIBLE EN AGUA SUPERFICIAL Y POTABLE EN LA EMPRESA PÚBLICA METROPOLITANA DE AGUA POTABLE Y SANEAMIENTO (EPMAPS)”** ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 14 de Agosto del 2017

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'W. Sánchez', written over a horizontal line.

Sánchez Nacevilla Alexander Wladimir

C.C. 1721996385



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA

AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **ALEXANDER WLADIMIR SÁNCHEZ NACEVILLA**, Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación **“VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE NITRITOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE LUZ VISIBLE EN AGUA SUPERFICIAL Y POTABLE EN LA EMPRESA PÚBLICA METROPOLITANA DE AGUA POTABLE Y SANEAMIENTO (EPMAPS)”** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 14 de Agosto del 2017

Sánchez Nacevilla Alexander Wladimir

C.C. 1721996385

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico de todo corazón a mi hija Jhuliana quien ha sido la razón principal por la cual he podido dar mi mayor esfuerzo, dándome motivación para lograr este gran logro en mi vida para poder tener un futuro mejor en nuestras vidas.

A mí amada Priscila quien me ha acompañado a lo largo de mi carrera profesional dándome inspiración y confianza en mi capacidad.

A mis Padres Jorge y Marcia por creer en mí y por el gran esfuerzo que han dado para que yo siga adelante, cumpliendo mis metas y sin desfallecer en momentos difíciles, logrando ser la gran persona y profesional que soy ahora.

A mis amigos, compañeros y familiares quienes han estado junto a mí brindándome su apoyo incondicional sin esperar nada a cambio.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme vivir este momento después de haber pasado muchos sacrificios, alegrías y tristezas; junto con las personas que más aprecio en la vida que han estado a mi lado en los momentos que más los necesite apoyándome incondicionalmente.

A mis padres Jorge Sánchez y Marcia Nacevilla por ser el pilar fundamental en mi vida que han forjado en mi los más valiosos valores y principios a base de esfuerzo y sacrificio siendo las personas más admirables que he tenido en mi vida por todo lo que me han sabido inculcar.

A Priscila por haberme dado el cariño, amor, paciencia y ser una extraordinaria persona que siempre supo apoyarme en las buenas y en las malas.

A mi hermano Jorge Luis que ha estado a mi lado cada momento de mi vida sabiendo darme las mejores palabras de aliento para poder seguir adelante.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE especialmente a todo el equipo de trabajo que forma la carrera de Ingeniería en Biotecnología por brindarme todos los conocimientos necesarios para formarme profesionalmente.

A mi tutor el Ingeniero Rafael Vargas por guiarme en el trayecto de mi investigación, sus consejos, su confianza durante toda esta experiencia que me ha servido para formarme como persona y profesionalmente.

A la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento EPMAPS por permitirme desarrollar mi trabajo de titulación brindándome las herramientas necesarias para que toda la investigación se lleve a cabo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
LISTADO DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación	2
1.3. Objetivos	3
1.3.1. Objetivo general	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4. Marco teórico	3
1.4.1. Recurso Agua	3
1.4.1.1. Propiedades del agua.....	5
1.4.1.2. Tratamiento del agua.....	9
1.4.2. NITRÓGENO	12
1.4.2.1. Nitritos	17

1.4.2.2. Problemas de los nitritos en la salud	18
1.4.3. Espectrofotometría	19
1.4.4 Espectrofotómetro Agilent 8453	21
1.5. Implementación de métodos Químicos.....	24
1.6. Validación de métodos Químicos	24
1.6.1. PROCESO DE VALIDACIÓN	25
1.6.2. LINEALIDAD	27
1.6.3. EXACTITUD	28
1.6.4. PRECISIÓN	30
1.6.5. ESPECIFICIDAD	31
1.6.6. LÍMITE DE DETECCIÓN	32
1.6.8. INTERVALO DE TRABAJO O RANGO	32
1.6.9. ROBUSTEZ	33
1.6.10. INCERTIDUMBRE.....	33
1.7. Hipótesis.....	36
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.1. Localización del ensayo	37
2.1.1 Obtención de las muestras de agua tratada y superficial.....	37
2.2. Fase inicial de Laboratorio.....	37
2.2.1 Puesta en marcha del Espectrofotómetro Agilent 8453	38
2.2.2 Elaboración de la curva de calibración	41
2.3. Fase de Campo	44
2.4. Segunda fase de laboratorio	45
2.4.1. Análisis del efecto matriz.....	45

2.4.2. Análisis de la exactitud del método	47
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	49
3.1 Datos obtenidos para la curva de calibración.....	49
3.2 Curvas de calibración individual.....	51
3.3 Curva de calibración global	55
3.4 Resultados del Análisis de la varianza (ANOVA).....	57
3.5 Reproducibilidad y repetibilidad.....	63
3.6 Efecto Matriz.....	65
3.7 Exactitud	71
3.8 Incertidumbre	73
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	74
4.1. Análisis de la curva individual.....	74
4.2. Análisis de la curva global	75
4.3. Análisis de la varianza ANOVA.....	76
4.4 Análisis de la Reproducibilidad y la repetibilidad	76
4.5 Análisis del efecto matriz.....	76
4.6 Análisis de la exactitud	77
4.7 Análisis de la incertidumbre	78
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	79
CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES	81
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Constante dieléctrica de algunos líquidos	8
Tabla 2. Tipo de contaminante con su operación unitaria.	11
Tabla 3. Formas del Nitrógeno Inorgánico	13
Tabla 4. Análisis simple de la varianza ANOVA	31
Tabla 5. Preparación de estándares de nitrito.....	43
Tabla 6. Repeticiones de lecturas durante un día.....	43
Tabla 7. Diseño experimental.	44
Tabla 8. Diseño del análisis del efecto matriz en agua superficial	46
Tabla 9. Diseño del análisis del efecto matriz en agua potable	46
Tabla 10. Análisis para el cálculo de la exactitud	48
Tabla 11. Absorbancias obtenidas experimentalmente para el blanco.	49
Tabla 12. Absorbancias obtenidas experimentalmente de Nitrito.	49
Tabla 13. Absorbancias obtenidas experimentalmente de Nitrito.	50
Tabla 14. Absorbancias obtenidas experimentalmente de Nitrito.	50
Tabla 15. Absorbancias obtenidas experimentalmente de Nitrito.	50
Tabla 16. Absorbancias obtenidas experimentalmente de Nitrito.	51
Tabla 17. Promedio de absorbancias obtenidas experimentalmente de Nitrito.	51
Tabla 18. Análisis de la curva de calibración día 1.....	52
Tabla 19. Análisis de la curva de calibración día 2.....	53
Tabla 20. Análisis de la curva de calibración día 3.....	54
Tabla 21. Análisis de la curva de calibración día 4.....	55
Tabla 22. Intervalos de confianza de la calibración.	56
Tabla 23. Análisis de la curva de calibración global.	57
Tabla 24. Determinación de la varianza del blanco.	57
Tabla 25. Análisis de la varianza del blanco.	58
Tabla 26. Determinación de la varianza del estándar 1 (0.5 mg/L).	58
Tabla 27. Análisis de la varianza del estándar 1 (0.5 mg/L).	59
Tabla 28. Determinación de la varianza del estándar 2 (1 mg/L).	59

Tabla 29. Análisis de la varianza del estándar 2 (1 mg/L).....	60
Tabla 30. Determinación de la varianza del estándar 3 (2 mg/L).....	60
Tabla 31. Análisis de la varianza del estándar 3 (2 mg/L).....	61
Tabla 32. Determinación de la varianza del estándar 4 (3 mg/L).....	61
Tabla 33. Análisis de la varianza del estándar 4 (3 mg/L).....	62
Tabla 34. Determinación de la varianza del estándar 5 (3.5 mg/L).....	62
Tabla 35. Análisis de la varianza del estándar 5 (3.5 mg/L).....	63
Tabla 36. Reproducibilidad expresada en mg/L.	64
Tabla 37. Reproducibilidad expresada como porcentaje de recuperación.	64
Tabla 38. Repetibilidad expresada en mg/L.....	64
Tabla 39. Repetibilidad expresada en porcentaje de recuperación.	65
Tabla 40. Lectura de nitritos en agua cruda de bellavista.	65
Tabla 41. Lectura de nitritos en agua cruda de bellavista.	66
Tabla 42. Lectura de nitritos en agua cruda de bellavista.	66
Tabla 43. Lectura de nitritos en agua potable de bellavista.	67
Tabla 44. Lectura de nitritos en agua potable de bellavista.	67
Tabla 45. Lectura de nitritos en agua potable de bellavista.	68
Tabla 46. Lectura de nitritos en agua cruda de Puengasí.....	68
Tabla 47. Lectura de nitritos en agua cruda de Puengasí.....	69
Tabla 48. Lectura de nitritos en agua cruda de Puengasí.....	69
Tabla 49. Lectura de nitritos en agua potable de Puengasí.....	70
Tabla 50. Lectura de nitritos en agua potable de Puengasí.....	70
Tabla 51. Lectura de nitritos en agua potable de Puengasí.....	71
Tabla 52. Porcentaje máximo y mínimo de recuperación.....	71
Tabla 53. Datos obtenidos en la lectura de las muestras con dilución $\frac{1}{4}$	72
Tabla 54. Datos obtenidos en las lecturas de las muestras sin dilución.....	72
Tabla 55. Datos transformados de NO_2 a N-NO_2	72
Tabla 56. Análisis de exactitud del material de referencia	73
Tabla 57. Materiales utilizados durante el desarrollo de la curva de calibración	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Porcentaje de Agua en el cuerpo humano.....	4
Figura 2 Molécula de agua en forma de tetraedro rodeada de otras 4 moléculas de agua.	6
Figura 3 Formación de una micela.....	9
Figura 4 Estructura de un aminoácido	12
Figura 5 Reacciones que regulan la distribución de compuestos nitrogenados en medio acuoso.	14
Figura 6 Ciclo biogeoquímico del nitrógeno.	15
Figura 7 Reacciones presentes en la nitrificación.	16
Figura 8 Reacción del nitrito con Sulfanilamida y el 1-naftiletildiamina	18
Figura 9 Transmitancia.	19
Figura 10 Ilustración de la absorbancia y transmitancia con la concentración y longitud de onda.	20
Figura 11 Curva de calibración.....	21
Figura 12 Sistema óptico Agilent 8453.....	22
Figura 13 Espectrofotómetro Agilent 8453.....	23
Figura 14 Barra de herramientas del software.	39
Figura 15 Cuadro de tareas del software.....	39
Figura 16 Cuadro de tareas spectrum/peaks del software.	39
Figura 17 Espectro de nitrito.....	40
Figura 18 Curva de calibración de nitrito día 1.....	52
Figura 19 Curva de calibración de nitrito día 2.....	53
Figura 20 Curva de calibración de nitrito día 3.....	54
Figura 21 Curva de calibración de nitrito día 4.....	55
Figura 22 Curva de calibración global	56

LISTADO DE ABREVIATURAS

EPMAPS: Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento.

L3C: Laboratorio Central de Control de Calidad.

NTE: Norma Técnica Ecuatoriana.

INEN: Servicio Ecuatoriano de Normalización.

ISO: Organización Internacional de Normalización.

mg/ L N-NO₂⁻¹: Miligramos por litro de nitrógeno de nitritos.

mg/ L NO₂⁻¹: Miligramos por litro de nitritos.

SAE: Servicio de Acreditación Ecuatoriana.

%μ: Porcentaje de Incertidumbre.

SR: Reproducibilidad

Sr: Repetibilidad

r²: coeficiente de correlación lineal.

RESUMEN

El laboratorio de control de la calidad del agua L3C de la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento EPMAPS se encarga de realizar análisis de laboratorio de agua superficial y potable, basándose en la norma NTE-INEN 1108 2014, uno de los requisitos son los nitritos NO_2^{-1} con un máximo permisible de 3mg/L de NO_2^{-1} . El objetivo de este trabajo es implementar y validar el método de determinación de nitritos por espectrofotometría de luz visible en agua superficial y potable. Como primera fase se analizó la necesidad del laboratorio y se planteó el rango de trabajo siendo de 0.5 mg/L a 3.5 mg/L de NO_2^{-1} , se realizó la curva de calibración con un diseño completamente al azar a x b donde a eran los días y b las repeticiones. Después se recolecto muestras de dos plantas de tratamiento (Bellavista y Puengasí) de agua superficial y potable, para realizar lecturas y enriquecimientos. Con los datos obtenidos durante los días del ensayo se determinó los parámetros de validación que son: linealidad con un coeficiente de correlación lineal de 0.9966, rango de trabajo de 0.5, 1, 2, 3 y 3.5 mg/L de NO_2^{-1} , límite de cuantificación de 0.5 mg/L NO_2^{-1} , exactitud de 90 a 110%, reproducibilidad y repetibilidad menor al 10% en todos los puntos y una incertidumbre menor al 30% en todos los puntos, cumpliendo con todos los parámetros de validación por lo que se concluye que el método puede ser implementado y utilizado en el L3C.

PALABRAS CLAVE:

- **NITRITOS**
- **AGUA SUPERFICIAL**
- **AGUA POTABLE**
- **VALIDACIÓN**

ABSTRACT

The water quality control laboratory (L3C) of the “Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento” (EPMAPS) is responsible for performing laboratory analysis of surface water and drinking water, based on the standard NTE-INEN 1108 2014, one of the requirements are nitrites with a maximum permissible of 3 mg/L of NO_2^{-1} . The objective of this work is to implement and validate the method of determination of nitrites by spectrophotometry of visible light in surface and drinking water. As the first phase, the laboratory's need was analyzed and the range of work was considered from 0.5 mg/L to 3.5 mg/L of NO_2^{-1} , the calibration curve was performed with a completely randomized a x b design where a were the days and b the repetitions performed per day. Samples were then collected from two treatment plants (Bellavista and Puengasí) for surface and potable water, for three different days, to perform readings and enrichments. With the data obtained during the test days, validation parameters were determined: linearity with a linear correlation coefficient of 0.9966, working range of 0.5, 1, 2, 3 and 3.5 mg/L of NO_2^{-1} , limit of quantification of 0.5 mg/L NO_2^{-1} , accuracy of 90 to 110%, reproducibility and repeatability less than 10% in all points and an uncertainty less than 30% in all points, complying with all validation parameters. So it is concluded that the method can be implemented and used in the L3C.

KEY WORDS:

- **NITRITE**
- **SUPERFICIAL WATER**
- **DRINKING WATER**
- **VALIDATION**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

El Laboratorio Central de control de calidad del agua L3C de la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento EPMAPS se encarga de los análisis Físico - Químicos y Microbiológicos del agua superficial y potable, destinada al consumo humano, y se encuentra certificada por el Servicio de Acreditación Ecuatoriana SAE bajo la norma de la Organización Internacional de Normalización ISO 17025 de buenas prácticas de laboratorio, por lo que se ve en la necesidad de validar los métodos que se van implementando en el Laboratorio.

El L3C no cuenta con un método de determinación de nitritos por espectrofotometría, a pesar de que los nitritos son un parámetro fundamental en la Norma Técnica Ecuatoriana del Servicio Ecuatoriano de Normalización NTE INEN en su norma 1108 del año 2014 que describe los requisitos para el agua potable, en la cual se basa el laboratorio para asegurar que el agua que se potabiliza en las diferentes plantas de tratamiento es de muy buena calidad y apta para el consumo humano, además de que la Organización Mundial de la Salud OMS advierte sobre la presencia de nitritos en el agua de bebida por que puede ocasionar problemas de salud especialmente en niños y personas inmunocomprometidas.

El agua superficial está destinada a ser el producto primario que va a ser potabilizado y va a llegar a los hogares para ser consumido por todas las personas, por ello es indispensable analizar las impurezas que se encuentren y uno de ellos es la concentración de nitritos.

Por ello es indispensable la implementación y validación de un método de determinación de nitritos que cuantifique la concentración del analito en el agua de

bebida y superficial para asegurar que su concentración se encuentre dentro de la NTE INEN 1108 2014 asegurando que no cause daños en la salud de los consumidores.

1.2. Justificación

El recurso hídrico es el componente principal de la vida, por ello la importancia de asegurarnos de cumplir los estándares de calidad ambiental, debido a que la disponibilidad y calidad del agua determinan en gran medida la salud de una población y no cumplir con los estándares establecidos llevan a que la población se han muy susceptibles a diversas enfermedades (Caparrós, *et al* 2014).

Uno de los requisitos de calidad del agua superficial y potable, es la concentración de nitritos que pueden provenir de diferentes lugares como:

- Efluentes domésticos e industriales.
- De los abonos nitrogenados utilizados en la agricultura.
- De forma natural formando parte del ciclo del nitrógeno.

El ion nitrito en grandes cantidades es tóxico para peces y también para los humanos debido a que tiene una gran capacidad de oxidar la hemoglobina a metahemoglobina oxidando al Hierro de Fe^{+2} a Fe^{+3} , inhibiendo la función de transportar el oxígeno por la sangre especialmente en niños (Escolástico, *et al* 2013).

Muchas de las decisiones que se toman en las plantas de tratamiento de agua potable de la EPMAPS se llevan a cabo por los resultados obtenidos en el L3C, por ello es importante que los métodos que se implementan y se desarrollan en el L3C estén acreditados por el servicio de acreditación ecuatoriana SAE, siendo la validación parte fundamental de este proceso, en la cual se establece el procedimiento adecuado de ejecutar el método asegurando que los datos obtenidos son los correctos con alta confiabilidad, tomando en cuenta los requisitos del INEN brindando seguridad y respaldo.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Validar el método para la determinación de nitritos por espectrofotometría de luz visible en agua superficial y potable en la empresa pública metropolitana de agua potable y saneamiento (EPMAPS).

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar los parámetros de validación del nuevo método desarrollado como lo son: Selectividad y especificidad, linealidad, coeficiente de correlación, límite de cuantificación, intervalo de trabajo, precisión, exactitud e incertidumbre.
- Implementar el método de determinación de nitritos por espectrofotometría en agua superficial y potable en el Laboratorio Central de Control de Calidad (L3C) de la EPMAPS.
- Determinar la concentración de nitritos en muestras de agua superficial y potable de diversas plantas de tratamiento y posibles interferencias en el método.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Recurso Agua

Denominamos agua al conjunto de elementos en la cual cada molécula está formada por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno que se encuentra en estado líquido, es el principal componente de la vida y el más abundante compuesto de la mayoría de organismos, como por ejemplo en una persona adulta el agua representa el

setenta por ciento del peso corporal, aunque existe una gran variabilidad dependiendo del estado y la actividad del tejido de cada persona; por ejemplo en una persona mayor que tiene menor actividad física el porcentaje de agua se reduce hasta el cincuenta por ciento como se observa en la figura 1 (Caparrós, et al 2014).

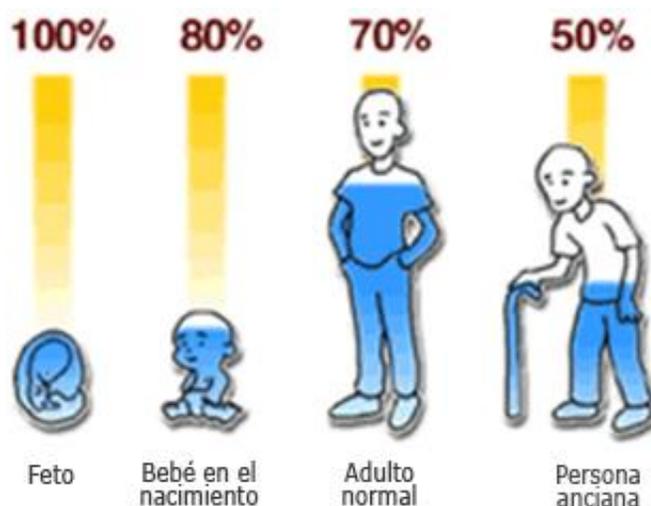


Figura 1 Porcentaje de Agua en el cuerpo humano

Fuente: (Caparrós, et al 2014)

El agua en el organismo actúa como vehículo de nutrientes y productos de desechos entre tejidos y órganos. En los pulmones por ejemplo el agua es fundamental debido a que recubre a los pulmones, superficies en donde ocurre el paso de oxígeno y el anhídrido carbónico entre el aire que ingresa y los capilares de los alveolos. Además el agua disuelve los productos de desecho que se eliminan en las heces y la orina, es decir, sirve como medio de transporte de excreción. Por otro lado lubrica y proporciona soporte estructural para tejidos y articulaciones, y sin olvidar la función más importante la cual es regular la temperatura del organismo (Mora, 2009).

Según el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA, 2003), el agua envuelve el 75% de la superficie del planeta terrestre, sin embargo el 97.5% de todo el agua es salada, y sólo el 2.5% del agua es dulce, y además casi toda

esta congelada en los glaciares y los polos. De la poca cantidad de agua dulce que nos resta en estado líquido el 30% es subterránea y en lagos y ríos sólo hay 0.3%. El agua permanece en un ciclo hidrológico en el cual se evapora, condensa y precipita, haciendo posible la vida en la Tierra (Morcillo, et al 2013).

1.4.1.1. Propiedades del agua

El agua tiene varias propiedades como la tensión superficial, capacidad calorífica, conductividad eléctrica, capilaridad, entre otras siendo una de las más importantes para este estudio la capacidad para disolver sustancias, el agua es conocida como el disolvente universal y se debe a que es una molécula dipolar, que tiene un polo positivo por parte de los átomos de hidrógeno y negativo en el átomo de oxígeno, unidas por una unión covalente que son las fuerzas que mantienen unidos entre sí a los átomos (Morcillo, *et al* 2013). Obteniéndose cargas opuestas en las moléculas permitiendo que moléculas vecinas se atraigan y se unan por puentes de hidrógeno (Borderías, Roda, 2012).

Las reacciones químicas que ocurren en las células se producen debido al medio acuoso en las que se encuentran, por ello lo hace un líquido con diversas propiedades químicas y físicas (Morcillo, *et al* 2013).

El agua tiene un comportamiento especial que se logra debido a la estructura de las moléculas y a la naturaleza de los enlaces que se forman y que las mantiene unidas, en el espacio esta ordena como un tetraedro irregular con el átomo de oxígeno situado en el centro y los enlaces de hidrógeno dirigidos hacia los vértices como es observa en la figura 2 (Teijón, 2006).

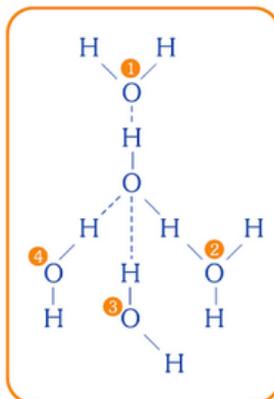


Figura 2 Molécula de agua en forma de tetraedro rodeada de otras 4 moléculas de agua.

Fuente: (Teijón, 2006)

Esta formación espacial permite que en el agua se produzca una elevada cohesión interna que es la base de las propiedades que tiene, entre las más destacadas por su importancia biológica son las siguientes:

Calor específico

Se define como la cantidad de calor necesario para elevar la temperatura de 1 gramo de líquido un grado centígrado; el valor para el agua es de una caloría cuando se sube de 14.5°C a 15.5°C (Cabrerizo, et al 2008).

Calor de vaporización

Es la cantidad de calor que se necesita para pasar a un elemento del estado líquido al gaseoso, en el caso del agua el calor de vaporización es elevado y corresponde a 536 calorías por gramo a una atmósfera de presión, el cuerpo humano pierde constantemente agua por la piel y los pulmones y el calor de vaporización le permite mantener la temperatura del cuerpo más baja que la del ambiente cuando el calor en este es elevado (Cabrerizo, et al 2008).

Conductividad Térmica

La elevada conductividad térmica del agua permite que la temperatura del organismo este regular conduciendo el calor entre las diferentes partes del cuerpo igualando y manteniendo la temperatura (Cabrerizo, et al 2008).

Tensión Superficial

Se denomina así a la fuerza de cohesión que se produce entre las moléculas de agua que se encuentran en la superficie, esta propiedad en el agua pura es elevada, sin embargo en el organismo esta fuerza disminuye debido a la presencia de biomoléculas facilitando el transporte de sustancias dentro del organismo, la osmosis entre las células y permitiendo el intercambio de fluidos (Cabrerizo, et al 2008).

Como se mencionó anteriormente una de las propiedades más importantes del agua es la de disolvente universal, la cual le permite disolver con facilidad ciertos compuestos tales como:

Compuestos iónicos

Las redes cristalinas que forman las sales inorgánicas como el NaCl les permiten estar estables por la atracción electrostática. El agua debido a su carácter dipolar es capaz de introducirse en la red de las sales inorgánicas rodeando los iones y debilitando la atracción entre ellos consiguiendo que se separen (Teijón, 2006).

La tendencia a oponerse a la atracción electrostática entre iones negativos y positivos, se define como la constante dieléctrica D que se expresa como:

$$D = \frac{e_1 * e_2}{F * r^2}$$

Donde:

F: es la fuerza de atracción entre los iones.

r: es la distancia entre los dos iones.

e1 y e2: son las cargas de los iones

En caso del agua la constante Dieléctrica es alta en comparación con otros líquidos como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1
Constante dieléctrica de algunos líquidos

Líquido	Constante dieléctrica D
Agua	80
Metanol	33
Etanol	24
Acetona	21.4
Benceno	2.3
Hexano	1.9

Fuente: (Teijón, 2006)

Compuestos polares no iónicos

Debido a la tendencia del agua a formar enlaces de hidrógeno con grupos polares como los alcoholes, hidroxilo de los carbohidratos y el oxígeno del grupo carbonilo de los aldehídos y de las cetonas, el agua puede disolver compuestos iónicos no polares como azúcares, aldehídos, cetonas y alcoholes sencillos (Teijón, 2006).

Disoluciones de compuestos lipídicos

El agua puede solubilizar muchos compuestos denominados anfipáticos, que contienen simultáneamente grupo polar denominados hidrófilos y no polares denominados hidrófobos. Debido a que el agua no puede solubilizar los grupos no polares, para disolver los compuestos anfipáticos se forman micelas en donde los grupos polares se colocan al exterior encerrando en el interior a la parte hidrófoba como se observa en la figura 3 (Teijón, 2006).

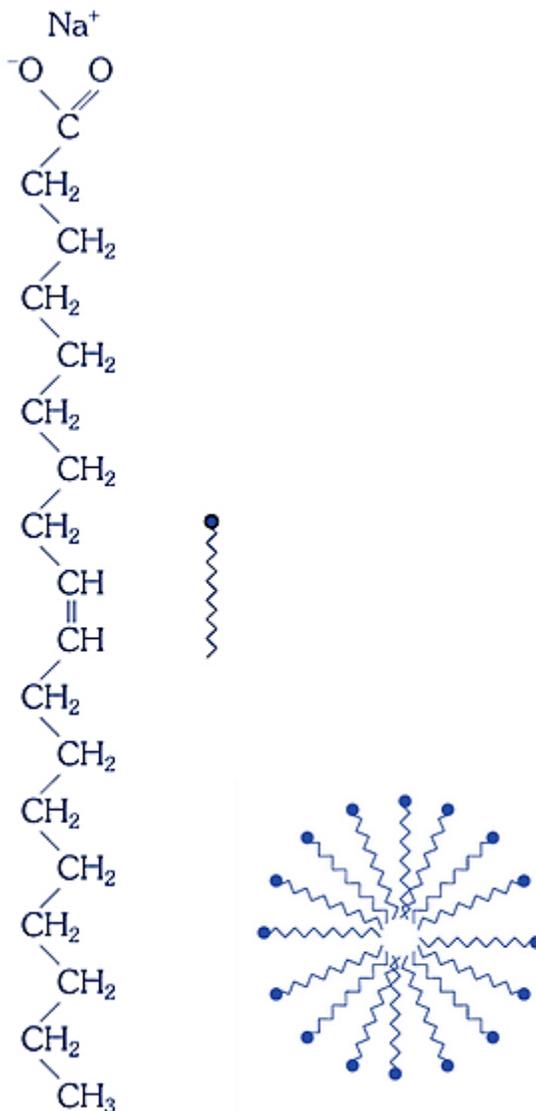


Figura 3 Formación de una micela.

Fuente: (Teijón, 2006)

1.4.1.2. Tratamiento del agua

El tratamiento del agua ha sido indispensable a lo largo de la historia centrándose al principio en sus cualidades físicas para mejorar la estética del agua a la vista de las personas. Desde hace siglos se ha implementado sistemas para acercar el agua a las

casas como en Babilonia donde se construyeron canales y acueductos desde sus fuentes a lugares más cercanos a las viviendas. En la antigüedad los pueblos orientales potabilizaban el agua usando arena y barro poroso filtrándola y eliminando varios residuos que acarreaban las corrientes, también los romanos fabricaron una red de acueductos y estanques que les permitía traer agua dulce desde fuentes que se encontraban a noventa kilómetros de distancia, instalaron filtros para mejorar la calidad del agua, y solían hervir el agua de peor calidad que se obtenía de otras fuentes, que utilizaban para riegos y limpiezas, acciones que hoy en día se debería realizar ya que existen muchas ciudades que utilizan el mismo agua para beber en usos tales como limpieza de inodoros o carros, en donde se podría usar agua de menor calidad sin problema (Torres, et al 2012).

Se ha encontrado registros griegos en donde proponían utilizar varios métodos de tratamiento de agua como por ejemplo la utilización de carbón para realizar filtración, exponer al agua a los rayos solares y en algunos casos ebullición. En el antiguo Egipto se aplicaba un método de sedimentación que consistía en dejar reposar el agua en vasijas de barro permitiendo que las partículas e impurezas vayan al fondo y luego de varios meses mediante una especie de bomba extraían el agua de la parte superior, en ocasiones utilizaban ciertas sustancias minerales y vegetales para que las partículas se acumulen y ganen peso facilitando la precipitación de partículas y logrando clarificar el agua. Aproximadamente en la época del 1500 antes de Cristo, se tiene escritos de que los egipcios usaban alumbre para lograr precipitar las partículas suspendidas que se encontraban en el agua, método que hoy en día se sigue utilizando con un diferente coagulante (Escolástico, et al 2013).

Desde hace varios años y hasta la fecha se utiliza varias operaciones unitarias físicas y químicas para realizar el tratamiento de potabilización del agua con el fin de clarificar el agua, eliminando las partículas sedimentables y suspendidas para luego desinfectarla eliminando todos los microorganismos que afectan a los consumidores (Muñoz, Grau, 2013).

A continuación, se detalla algunas operaciones unitarias que se utiliza en las plantas de tratamiento para eliminar los diferentes tipos de contaminantes.

Tabla 2

Tipo de contaminante con su operación unitaria.

TIPO DE CONTAMINANTE	OPERACIÓN UNITARIA
Operaciones que no deben faltar en una planta de tratamiento	
Sólidos gruesos	Desbaste
Partículas coloidales	Coagulación + Flocculación + Decantación
Sólidos en suspensión	Filtración
Gérmenes Patógenos	Cloración
Operaciones que se realizan en caso de necesitarlas	
Materia Orgánica	Carbón Activado
Amoniaco	Cloración al Breakpoint
Metales no deseados	Precipitación por Oxidación
Iones	Osmosis Inversa

Fuente: (Muñoz, Grau, 2013)

Para asegurar un buen tratamiento se debe realizar análisis físico químicos y microbiológicos del agua potabilizada que sale de las plantas de tratamiento y de muestras que llegan a las casas a través de la red, asegurando la buena calidad del agua y después tomando medidas correctivas en el tratamiento (Escolástico, et al 2013).

1.4.2. NITRÓGENO

El Nitrógeno es una de los elementos imprescindibles para la vida junto con el Carbón, Hidrógeno, Oxígeno y Fósforo, los denominados CHONP. Todos estos elementos desempeñan funciones vitales para las moléculas que están formando, en el caso del nitrógeno los compuestos orgánicos más fundamentales que existen son: los aminoácidos, que son el compuesto básico para formar las proteínas, los ácidos nucleicos, azúcares aminadas y ciertos polímeros (Pozo, 2011).

En la figura 4 se muestra la estructura general de un aminoácido, en donde R representa un radical que es diferente en todos los aminoácidos.

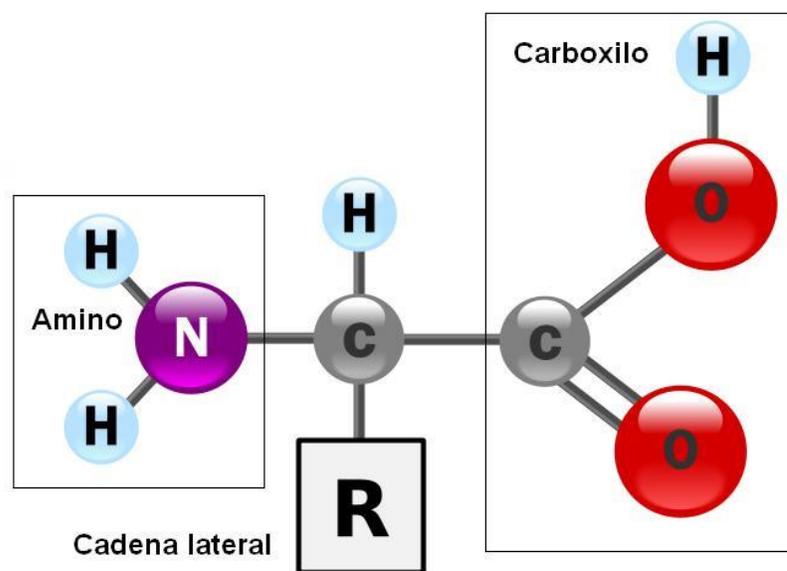


Figura 4 Estructura de un aminoácido

Fuente: (Pozo, 2011)

Además el nitrógeno también está presente en la naturaleza en forma inorgánica variando según su estado de oxidación como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3
Formas del Nitrógeno Inorgánico

Compuesto	Símbolo	Estado de Oxidación
Amoniaco	NH ₃	-3
Nitrógeno Gaseoso	N ₂	0
Óxido nitroso	N ₂ O	+1
Monóxido de nitrógeno	NO	+2
Dióxido de nitrógeno	NO ₂	+4
Ácido Nítrico	HNO ₃	+5
Ácido Nitroso	HNO ₂	+3
Nitrito	NO ₂ ⁻¹	+3
Nitrato	NO ₃ ⁻¹	+5

Fuente: (Pozo, 2011)

N₂ es la fórmula para el nitrógeno gaseoso, la cual es la forma más estable del nitrógeno. Las demás formas existentes de nitrógeno se transforman a Nitrógeno gaseoso cuando existen condiciones de equilibrio. Por ello se entiende que el N₂ es el principal compuesto de nitrógeno para todos los organismos vivos (Pozo, 2011).

Sin embargo solo pocos organismos como las arqueobacterias y eubacterias fototróficas y heterotróficas tienen la capacidad de fijar el nitrógeno gaseoso. No obstante en los demás organismos se debe reciclar el nitrógeno y esto depende de transformaciones químicas de otras formas nitrogenadas disponibles, a través de reacciones bioquímicas que ocurren en medio acuosos como se observa en la figura 5 (Grande, 2017).

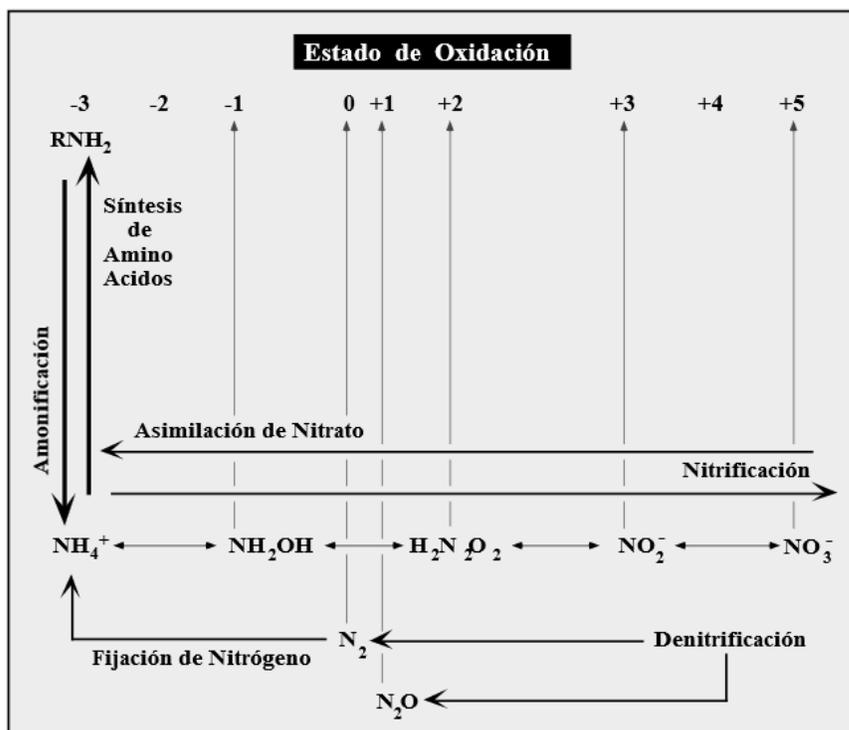


Figura 5 Reacciones que regulan la distribución de compuestos nitrogenados en medio acuoso.

Fuente: (Grande, 2017)

El conjunto de estas reacciones componen el ciclo biogeoquímico del nitrógeno en el cual intervienen algunas reacciones como se muestra en la figura 6, en donde:

- 1) Fijación o reducción de nitrógeno molecular N_2 a amoníaco NH_3 .
- 2) Asimilación del amoníaco NH_3 a R-NH_3 .
- 3) Nitrificación $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^{-1} \rightarrow \text{NO}_3^{-1}$.
- 4) Desnitrificación $\text{NO}_3^{-1} \rightarrow \text{NO}_2^{-1} \rightarrow \text{NH}_3$.
- 5) Reducción asimilativa de nitrato $\text{NO}_3^{-1} \rightarrow \text{R-NH}_2$.
- 6) Amonificación $\text{R-NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3$.

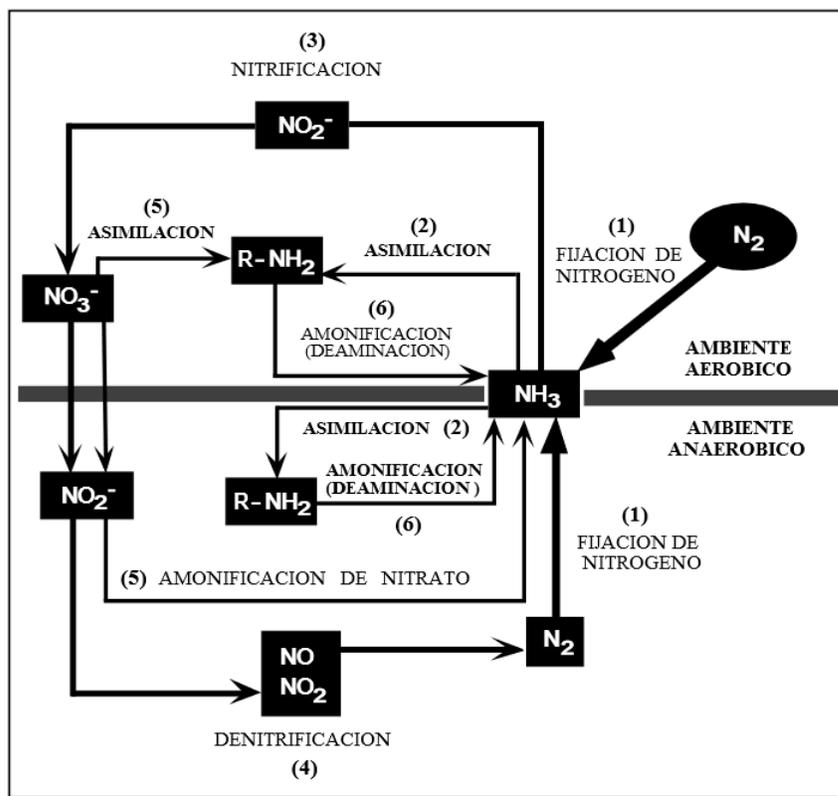


Figura 6 Ciclo biogeoquímico del nitrógeno.

Fuente: (Grande, 2017)

Nitrificación

El proceso de nitrificación es la oxidación biológica del NH_3 (amoníaco) a nitrato en medio estrictamente aerobio debido a que los microorganismos que intervienen utilizan al oxígeno como aceptador de electrones del amoníaco oxidándolo hasta nitrato. Debido a que el amoníaco es un compuesto estable se requiere un potencial redox alto, oxidantes fuertes o agentes catalíticos denominadas enzimas, existen bacterias estrictamente aerobias que poseen estas enzimas y se las conoce como bacterias nitrificantes (Grande, 2017).

Para que ocurra la reacción es necesario además un ambiente óptimo como por ejemplo en suelos con buen drenaje y un pH neutral o en agua que tenga alto oxígeno disuelto y pH neutral, cuando ocurre la reacción las bacterias nitrificante ganan energía y

continúan creciendo y multiplicándose. La inhibición de estas bacterias se puede dar en condiciones de alta acidez o de anoxia (Grande, 2017).

El proceso total de nitrificación ocurre en dos procesos.

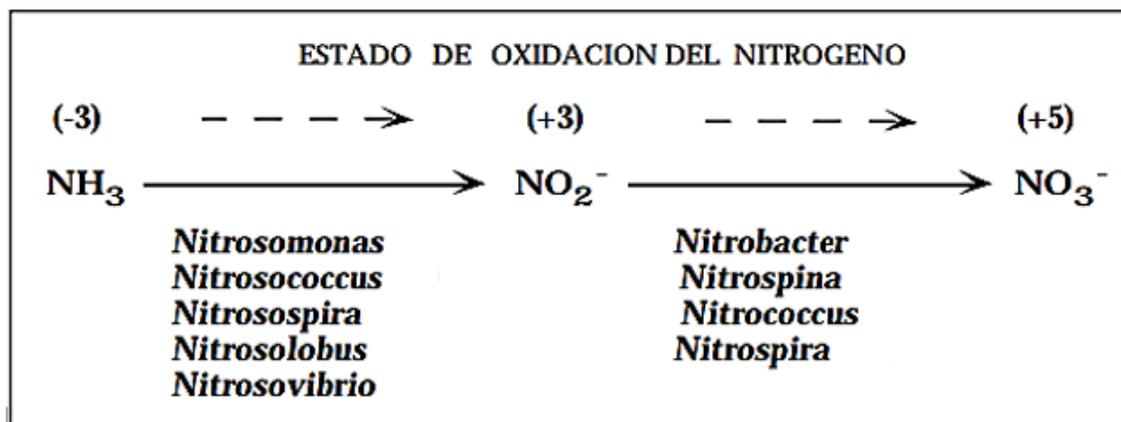


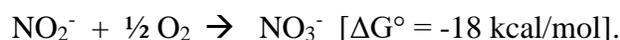
Figura 7 Reacciones presentes en la nitrificación.

Fuente: (Grande, 2017)

En el primer proceso el amoníaco se oxida a nitritos realizado por bacterias principalmente del género *Nitrosomona* debido a que se encuentran mejor adaptadas al medio acuoso en el que suelen darse las reacciones, también existen otros tipos de bacterias que pueden realizar el primer paso de nitrificación como *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio*, pero con menos eficiencia debido a los estrictos requerimientos nutricionales que necesitan (Samir, 2004).



El segundo paso donde ocurre la oxidación del nitrito a nitrato es llevado a cabo principalmente por bacterias del género *Nitrobacter* y como en la oxidación a nitrito también existen otras bacterias menos eficientes como *Nitrospina*, *Nitrococcus*, y *Nitrospira* (Samir, 2004).



1.4.2.1. Nitritos

El anión nitrito es débilmente básico y no posee color, además actúa como oxidante o reductor. En medio ácido está como HNO_2 , siendo inestable, depende de la temperatura mientras más se eleve será más inestable, transformándose en el anión NO_3 y en NO . Se utiliza en la industria para varios fines entre ellos la fabricación de colorantes y muchos productos químicos orgánicos, también en la industria alimenticia para adobar carnes. En fuentes de agua dulce natural también se lo puede encontrar en concentraciones variables, y será en esta matriz donde procederemos a determinarlo (Vallespí, 2013).

Para su análisis se han empleado métodos muy diversos, siendo los más frecuentes los métodos espectrofotométricos, basados en la formación de productos coloreados, mediante la adición de diversos reactivos (Contreras, Meneses, 2012).

La concentración de nitritos en agua pueden elevarse en fuentes donde estén influenciadas por la agricultura debido a que existe un abuso en la utilización de abonos químicos considerablemente en época de invierno en donde los químicos son arrastrados por la lluvia y no permiten que los vegetales metabolicen completamente el nitrógeno permitiendo que estos compuestos se trasladen hacia ríos o lagunas que corresponden al agua superficial que se utiliza en el tratamiento de agua potable (Contreras, Meneses, 2012).

Además, en aguas crudas de fuentes naturales los nitritos pueden estar presentes por procesos de mineralización y nitrificación de la materia orgánica por las bacterias del género de las Nitrosomonas y por procesos de desnitrificación (Muñoz, Grau, 2013).

La diazotación de la sulfanilamida en medio ácido y su posterior reacción con la 1-naftiletildiamina da un color rojizo que puede ser cuantificado colorimétricamente con la ayuda de un espectrofotómetro de luz visible, a nivel de reacciones se puede representar de la siguiente forma:

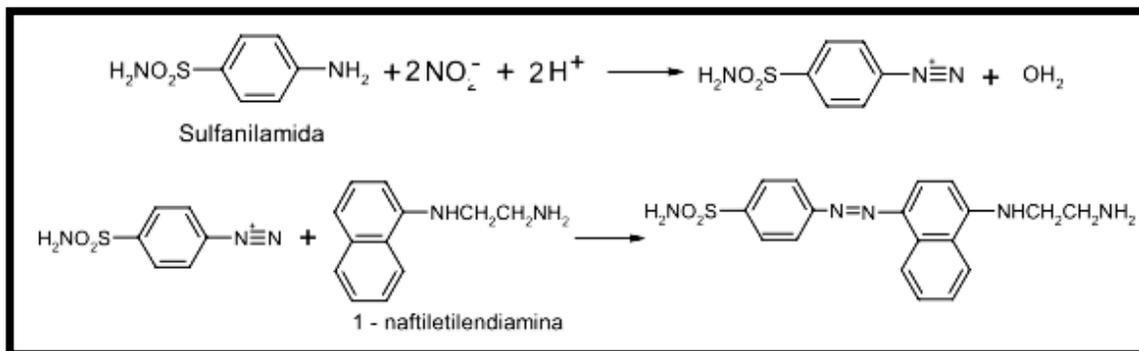


Figura 8 Reacción del nitrito con Sulfanilamida y el 1-naftiletilendiamina

Fuente: (Muñoz, Grau, 2013)

1.4.2.2. Problemas de los nitritos en la salud

Los nitritos pueden causar varios problemas en la salud especialmente en niños menores de seis meses en donde existe el mayor riesgo debido a que los nitritos pueden reaccionar con la hemoglobina (molécula que transporta el oxígeno en la sangre), específicamente con el Hierro que se encuentra en estado de oxidación Fe⁺² oxidándolo a Fe⁺³ produciendo una inhibición de la hemoglobina impidiendo la transportación de oxígeno por la sangre. El cambio de estado de oxidación del Hierro en la molécula de la hemoglobina la transforma a otro tipo de hemoglobina denominada metahemoglobina adquirida y la acumulación anormal de esta molécula provoca la enfermedad metahemoglobinemia llamado también el síndrome del bebé azul por la coloración del cuerpo que se produce, uno de los síntomas de esta enfermedad además de la producción de fatiga, dificultad respiratoria, dolor de cabeza, falta de energía (Morcillo, et al 2013).

Otro problema que pueden causar los nitritos es la posible formación de nitrosaminas, cuando reaccionan con las aminas, que son compuestos cancerígenos. Esta reacción química entre los nitritos y las aminas aportadas por alimentos proteicos que originan las nitrosaminas se produce en medio ácido, es decir, en el estómago, pero en adultos no existe demasiado problema porque el estómago de una persona adulta es muy acida y no permite la proliferación de bacterias reductoras de nitrato a nitrito, los nitratos

no reaccionan con las aminas y salen del organismo sin producir problemas, sin embargo existe un riesgo en niños menores de seis meses debido a su escasa acidez estomacal, que permite la proliferación de la flora bacteriana reductora del nitrato a nitrito permitiendo que se de las reacciones mencionadas anteriormente.(Santamera, Álvarez, 2014).

En general los adultos están absueltos de estos riesgos causados por los nitritos, sin embrago se debe tener cuidado en personas con enfermedades crónicas, como problemas del corazón, pulmones o deficientes de enzimas, debido a que pueden tener niveles elevados de nitritos o nitratos que por su condición se pueden transformar en nitritos. Las mujeres en estado de gestación o durante la lactancia deberían beber agua libre de nitratos o nitritos, hirviendo al agua, porque los efectos pueden ser pasados al feto o infante (Morcillo, et al 2013).

1.4.3. Espectrofotometría

Transmitancia

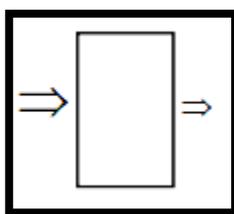


Figura 9 Transmitancia.

Fuente: (Camacho, Grau, 2013)

En la figura dos se observa una flecha de izquierda a derecha que representa un haz de radiación que atraviesa una capa de solución contenido en una celda de cuarzo que tiene un espesor de una longitud determinada y la solución lleva una concentración x de una especie absorbente. Como consecuencia ingresa una cantidad determinada de fotones en el haz de luz que interaccionan con las partículas absorbentes y sale un haz de luz más atenuado. (Camacho, Grau, 2013).

Absorbancia

Con la transmitancia obtenida se puede determinar la absorbancia de una solución con la siguiente ecuación.

$$A = -\log T$$

La mayor parte de los trabajos analíticos se realizan con soluciones de manera que vamos a desarrollarla relación que existe entre la concentración de la solución y su capacidad de absorber radiación (Camacho, Grau, 2013).

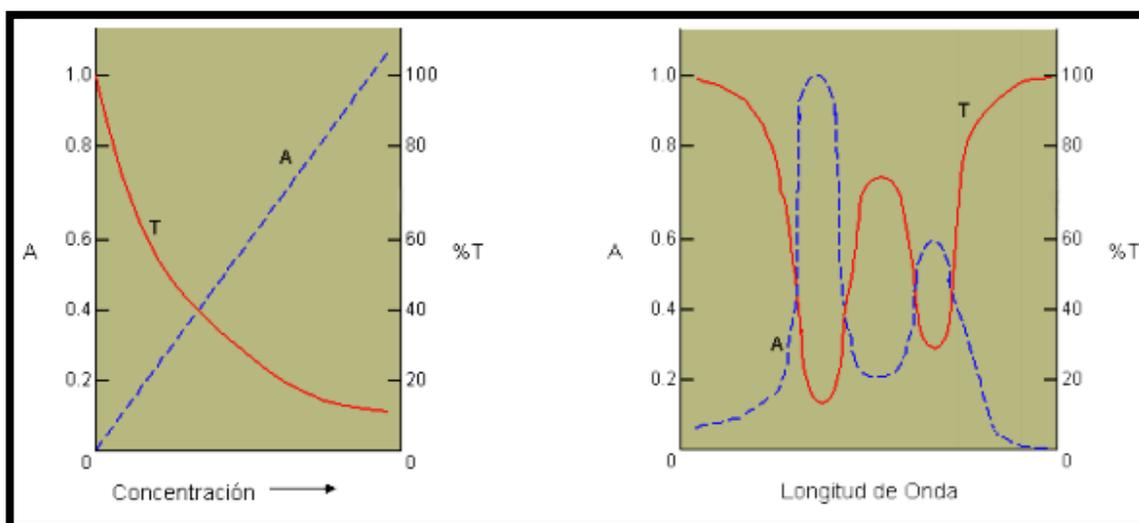


Figura 10 Ilustración de la absorbancia y transmitancia con la concentración y longitud de onda.

Fuente: (Camacho, Grau, 2013)

Curva de calibración

Se denomina espectro de un analito a la representación de la absorbancia en función de longitud de onda (λ), el gráfico producido presenta ondulaciones con picos máximos y mínimos que representan absorbancias a las cuales el analito se le identifica. Para realizar la determinación cuantitativa de una sustancia se elige la longitud de onda

donde existió un pico máximo, pues el error es mínimo y la sensibilidad máxima. Con ello se puede realizar la curva de calibración verificando el cumplimiento de la ley de Beer, en donde el eje de las abscisas corresponde a la concentración y el eje de las ordenadas a la absorbancia, para lo cual se preparan soluciones del analito de concentraciones conocidas a partir de un patrón primario y con agua libre de sustancias que puedan interferir en la medición o el método que se realice, entonces se puede medir la absorbancia a la longitud de onda elegida (Escolástico, *et al* 2013).

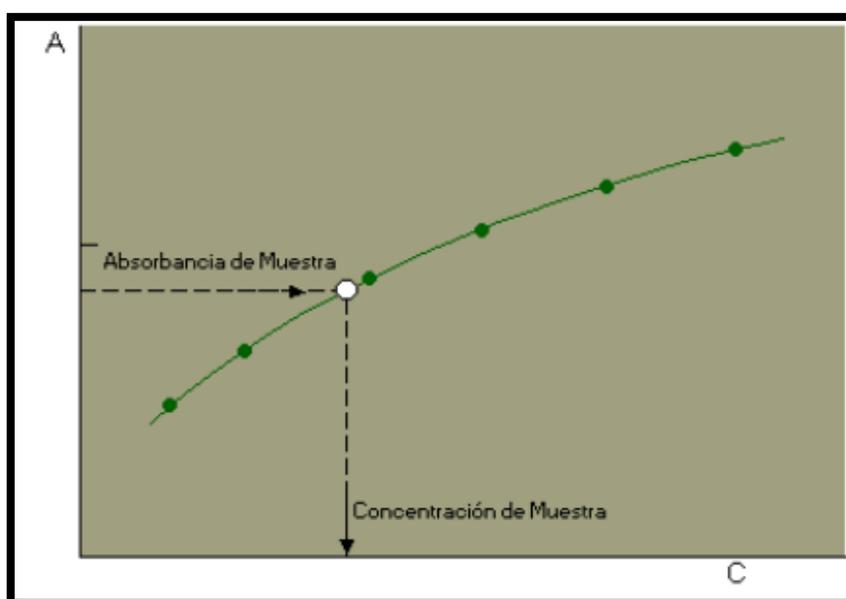


Figura 11 Curva de calibración

Fuente: (Camacho, Grau, 2013)

1.4.4 Espectrofotómetro Agilent 8453

En este estudio se utilizó el espectrofotómetro Agilent 8453 en el rango de luz visible el cual consiste en una lámpara de wolframio que abarca al rango visible y también se utiliza para longitudes de onda corta que corresponden al infrarrojo, además el sistema óptico del espectro tiene una lámpara de deuterio para longitudes de onda ultravioleta. Se puede visualizar el sistema interno del espectrofotómetro Agilent 8453 en la figura 12.

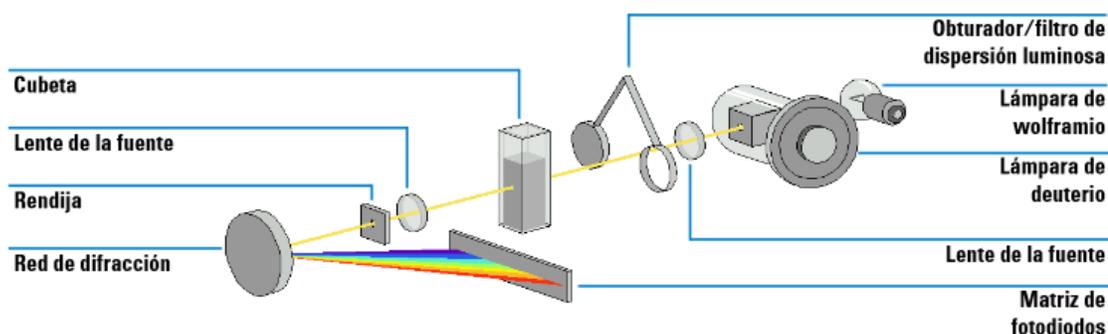


Figura 12 Sistema óptico Agilent 8453.

Fuente: (Agilent Technologies, 2003)

Como se observa en la figura 12 el espectrofotómetro Agilent 8453 consta de un diseño especial en el cual la lámpara de wolframio se encuentra posterior a la de deuterio permitiendo combinar ambas fuentes de luz y un mismo eje común. Los haces de luz provocado por las lámparas atraviesan la lente de la fuente formando un único haz, el cual pasa a través del filtro de corrección de dispersión luminosa y después atraviesa la celda que contiene la muestra hasta la lente de la fuente y la rendija del espectrógrafo, en donde se dispersa sobre una matriz de fotodiodos mediante una red de difracción holográfica. Permitiendo un acceso simultáneo de todas las longitudes de onda, obteniéndose un aumento de la velocidad a la que se pueden adquirir espectros observándose a lo largo de toda la longitud de onda en el rango de luz infrarroja, visible y ultravioleta, para después determinar la longitud de onda exacta, en donde se observa la mayor cantidad de picos formados que corresponderán a la expresión de analito encontrado en la muestra, y utilizar la lámpara correspondiente (Agilent Technologies, 2003).

En la figura 13 se muestra una imagen del espectrofotómetro Agilent 8453 y se distingue claramente de los espectrofotómetros convencionales por el compartimento de muestra el cual está abierto debido a que no se ve afectado por la luz ambiental falsa, este compartimento abierto facilita la manipulación de las celdas para un análisis más eficaz (Agilent Technologies, 2003).

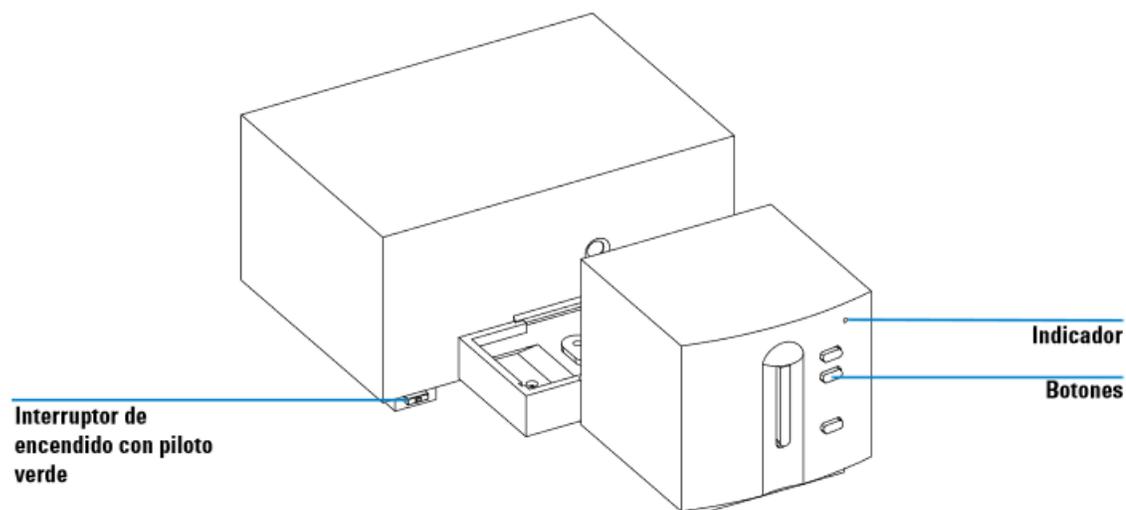


Figura 13 Espectrofotómetro Agilent 8453.

Fuente: (Agilent Technologies, 2003)

En la parte frontal del espectrofotómetro se encuentra el indicador de estado que es una luz que se enciende de diferentes colores según el estado del equipo.

Cuando está en verde indica que el equipo está preparado para realizar medidas.

Cuando el indicador estaba en verde e intermitente el espectrofotómetro está realizando una medida.

En amarillo el espectrofotómetro no está preparado debido a que una de las lámparas o ambas lámparas están apagadas, pero el espectrofotómetro está conectado al computador.

El indicador se pone en rojo cuando existe un error que no permite ejecutar análisis la mayoría de las veces porque no está conectado adecuadamente al computador o errores de software, en ese caso se debe pedir asistencia técnica (Agilent Technologies, 2003).

Como se observa en la figura 13 el espectrofotómetro Agilent 8453 consta de cuatro botones en el panel frontal:

- **BLANK (Blanco).** Se utiliza una medida de blanco como referencia a una o varias longitudes de onda determinadas, para las medidas posteriores de las

muestras que lleva la solución de dilución y el reactivo que reacciona con el analito de ser el caso.

- **SAMPLE (Muestra).** Después de encerrar el equipo se procede a realizar las medidas de las muestras en las longitudes de onda especificadas anteriormente mediante el software en el computador.
- **STANDARD (estándar).** Cuando se va a realizar un nuevo método es necesario preparar una curva de calibración en base a estándares que tienen una concentración determinada, para realizar estas lecturas se utiliza el botón STANDARD.
- **STOP (alto).** Se utiliza cuando se quiere interrumpir la actividad que se está realizando para dejar al equipo en estado preparado sin realizar la lectura.

1.5. Implementación de métodos Químicos

En una empresa de producción como la EPMAPS en la cual se potabiliza el agua para el consumo humano es de suma importancia contar con las herramientas necesarias para asegurar la calidad del agua que se produce, los análisis físicos químicos y microbiológicos que se desarrollan en el Laboratorio Central de Control de Calidad del Agua (L3C) de la EPMAPS permite a la empresa obtener indicadores de la calidad del agua dando confianza en el producto que se entrega a los consumidores.

Los análisis que se realizan en el L3C son métodos implementados y validados que certifican al laboratorio con la norma ISO 17025 sobre buenas prácticas de laboratorio.

1.6. Validación de métodos Químicos

La validación de un método analítico se puede resumir como el proceso mediante el cual se establece, por medio de análisis estadístico de datos obtenidos durante ensayos de laboratorio, que las características representativas del método cumplen con las

especificaciones del departamento certificador y es apto para aplicarlo en los análisis de determinado analito y su respectiva matriz (ASECAL, 2007).

Cuando se implementa un nuevo método en un laboratorio que consta con acreditación este debe estar soportado con suficientes datos de laboratorio a través de varios ensayos obteniendo así una validación bien documentada (Ruiz, *et al* 2010).

Un laboratorio por lo general debe validar dos tipos de métodos:

- Los no normalizados

Son métodos que se han sido desarrollados en el laboratorio, métodos nuevos o métodos que se han venido usando en el laboratorio pero no están normalizados.

- Métodos estándar

Son métodos publicados por organizaciones internacionales o nacionales, organizaciones técnicas, métodos publicados por la FDA (Food and Drug Administration), publicados en el standar methods y que se realizan tal como dice la norma.

La validación de un método es necesario para demostrar que la determinación de un analito es la correcta dentro de la matriz donde se esté trabajando, para asegurar que las modificaciones realizadas no afectan el desempeño de los ensayos ni la confiabilidad de los resultados (Ruiz, *et al* 2010).

1.6.1. PROCESO DE VALIDACIÓN

Para implementar un nuevo método o validar un método existente se siguen los siguientes pasos:

1. Necesidad de determinar un analito.

Determinada por la autoridad del laboratorio, principalmente cuando se trata de productos que se encuentran normados, en este caso el agua de consumo humano se rige bajo la norma NTE INEN 1108.

2. Elección del método

Se revisa los métodos disponibles y se elige el más apropiado para el fin que se utilice.

3. Análisis previo del procedimiento

Se toma en cuenta las concentraciones que se debe detectar en los requisitos de la norma con la que se trabaje o con las concentraciones que se desean detectar en el laboratorio, para elegir el rango donde se va a trabajar.

4. Puesta a punto del método

Una vez establecido el rango de trabajo se ajustan los puntos de la curva de calibración, conforme se vaya trabajando teniendo en cuenta los requisitos que queremos detectar para no desviarnos del propósito del método, realizando ajustes a las variables del método.

5. Parámetros de validación

Con la experiencia adquirida en la puesta a punto del método se determina los parámetros de validación que necesita el método para ser validado correctamente.

6. Diseño experimental

Se determina los ensayos a realizar y el análisis estadístico que se debe ejecutar para poder obtener los parámetros de validación.

7. Ejecución de los ensayos diseñados

En base al diseño experimental establecido.

8. Análisis de los datos

Tratamiento estadístico de los datos obtenidos durante la ejecución de los ensayos.

9. Declaración del método validado en el laboratorio.
10. Guardar los registros.

Finalizado el proceso de validación se debe guardar los registros ordenadamente, aprobar el método y difundir en el establecimiento.

A continuación se presentan las principales características que se deben cumplir en una validación de un método.

1.6.2. LINEALIDAD

Es la habilidad del método para obtener resultados en el ensayo proporcionales a la concentración del analito en muestras dentro de un rango dado que resulta directamente o a través de una transformación matemática bien definida (ASECAL, 2007).

Se determina realizando una regresión lineal de los datos obtenidos de concentraciones variadas conocidas del analito, lo que se denomina curva de calibración, para después aplicar la fórmula y obtener la ecuación de la recta y determinar el valor del coeficiente de correlación, mientras el coeficiente se acerque más al valor de uno la curva de calibración realizada tendrá mejor linealidad y los resultados que se obtengan serán más exactos (Ruiz, *et al* 2010).

Al realizar la linealidad del método se obtiene una ecuación de la recta representada como:

$$y = mx \pm b \qquad \text{Ecuación (Ec.) 1}$$

Donde:

y = variable dependiente.

m = pendiente de la curva.

x = variable independiente.

b = valor de y cuando x es cero.

La fórmula de la pendiente m por mínimos cuadrados es:

$$m = \frac{\sum_{i=1}^n \{(x_i - x_{media}) * (y_i - y_{media})\}}{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{media})^2} \quad \text{Ec. 2}$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n \{(y_i - m)\} * \sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Ec. 3}$$

Con la linealidad también se logra obtener el coeficiente de correlación definido por:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n \{(x_i - x_{media}) * (y_i - y_{media})\}}{\{[\sum_{i=1}^n (x_i - x_{media})^2][\sum_{i=1}^n (y_i - y_{media})^2]\}^{1/2}} \quad \text{Ec. 4}$$

Obtenido el coeficiente de correlación (r), se puede obtener el coeficiente de determinación (r^2).

1.6.3. EXACTITUD

Es el acercamiento que puede obtener un método analítico en base a los resultados obtenidos experimentalmente al valor verdadero, analizándose en porcentaje de recuperación del método de cantidades conocidas de analito agregadas a las muestras.

Para determinar la exactitud de un ensayo puede aplicarse el método analítico a un analito de pureza conocida denominado material de referencia quality control QC el cual tiene certificado con una concentración establecida (ASECAL, 2007).

La exactitud debe ensayarse mínimo realizando tres ensayos en días diferentes con tres repeticiones en cada día determinando la media de la concentración obtenida en el método y calculando el porcentaje de recuperación mediante la siguiente fórmula:

$$\%Recuperación = \frac{\text{valor obtenido}}{\text{valor real}} * 100 \quad \text{Ec. 5}$$

Además con los datos obtenidos se puede calcular el error tipo en la estimación de x ($S_{x/y}$) que se obtiene de cada curva de calibración y el valor más alto es conocido como Incertidumbre de la función respuesta (Ruiz, *et al* 2010).

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{calculada})^2}{n-2}} \quad \text{Ec. 6}$$

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{media})^2}} \quad \text{Ec. 7}$$

$$S_{Lo} = S_m \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n}} \quad \text{Ec. 8}$$

$$S_{x/y} = \frac{S_{y/x}}{m} \quad \text{Ec. 9}$$

Donde:

$S_{y/x}$ = Error en la estimación de y.

S_m = desviación estándar de la pendiente.

S_{Lo} = desviación estándar de la ordenada en el origen.

$S_{x/y}$ = Error tipo en la estimación de x.

1.6.4. PRECISIÓN

La precisión de un método analítico se la define como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos en los resultados individuales obtenidos en los días que se realizó el ensayo en una muestra con una concentración conocida en las repeticiones que se realizaron (ASECAL, 2007).

Se expresa como la desviación estándar de una serie de mediciones ya sea de la repetibilidad cuando los datos son obtenidos en un mismo laboratorio con los mismos equipos y de reproducibilidad cuando los datos obtenidos son de laboratorios diferentes (ASECAL, 2007).

Para el cálculo de la repetibilidad se aplica la ecuación 10 y para la reproducibilidad la ecuación 12.

$$S_r = \sqrt{DCM_w} \quad \text{Ec. 10}$$

$$S_L^2 = \frac{DCM_B - DCM_w}{p} \quad \text{Ec. 11}$$

$$S_R = \sqrt{S_r^2 - S_L^2} \quad \text{Ec. 12}$$

Donde:

DCM_w = Diferencias cuadráticas medias dentro del grupo Within.

DCM_B = Diferencias cuadráticas medias dentro del grupo Between.

p = Número de lecturas que se realizan cada día para cada nivel mediante el ANOVA.

Las diferencias cuadráticas medias (DCM) se calculan mediante un análisis simple de la varianza (ANOVA), utilizando las fórmulas detalladas en la tabla 4.

Tabla 4
Análisis simple de la varianza ANOVA

Origen de la varianza	Grados de Libertad	Suma de cuadráticas (SDC)	diferencias Cuadráticas Medias
Entre grupos (Between)	k - 1	$SDC_B = \sum_{i=1}^k p(\bar{x}_i - \bar{x})^2$	$DCM_B = \frac{SDC_B}{k - 1}$
Dentro del grupo (Within)	n - k	$SDC_W = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^p (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_i)^2$	$DCM_W = \frac{SDC_W}{n - k}$
Total	n - 1	$SDC_T = SDC_B + SDC_W$	$DCM_T = \frac{SDC_T}{n - 1}$

Fuente: (ASECAL, 2007)

1.6.5. ESPECIFICIDAD

La especificidad se define como la habilidad de un método analítico para determinar un analito específico en determinada matriz tomando en consideración los demás analitos o impurezas que pueden existir en la matriz donde se trabaja (Ruiz, *et al* 2010).

Si existen interferencias en la matriz donde se realiza los ensayos se puede compensar con procedimientos previos para eliminar la interferencia o atraparla para que no altere los resultados (Cárdenas, 2011).

Para determinar la especificidad de un método y analizar si tiene algún efecto matriz se debe enriquecer una muestra con una concentración conocida de analito para después realizar lecturas, como mínimo se debe realizar tres ensayos con tres repeticiones para asegurar la veracidad de los datos obtenidos, se lee la muestra con

enriquecimiento y sin enriquecimiento y se determina el porcentaje de recuperación con la ecuación 1.

1.6.6. LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección es un parámetro que nos servirá para determinar la concentración más baja que puede detectar un método con fiabilidad, no necesariamente cuantificable, bajo las condiciones establecidas para el ensayo (Cárdenas, 2011).

$$L_D = 3 * S_b \quad \text{Ec. 13}$$

S_b = Desviación estándar del blanco.

1.6.7. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación es un parámetro que nos servirá para determinar la concentración más baja que puede detectar un método necesariamente cuantificable, por lo general corresponde al valor más bajo de la curva de calibración (Cárdenas, 2011).

$$L_c = 10 * S_b \quad \text{Ec. 14}$$

1.6.8. INTERVALO DE TRABAJO O RANGO

Es el intervalo en el que se trabaja desde la concentración más baja hasta la más alta del analito en el que se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal, trabajando con un mismo método determinado para todo el rango (Cárdenas, 2011).

Para el cálculo del intervalo de trabajo se establece un límite inferior y un límite superior para cada punto, basándose en todos los datos obtenidos y se calcula utilizando las siguientes ecuaciones.

$$L_{0inf} = L_0 - (t_{student} * S_{y/x}) \quad \text{Ec. 15}$$

$$L_{0sup} = L_0 + (t_{student} * S_{y/x}) \quad \text{Ec. 16}$$

$$L_{inferior} = L_{0inf} + (c_x * m) \quad \text{Ec. 17}$$

$$L_{superior} = L_{0sup} + (c_x * m) \quad \text{Ec. 18}$$

Donde:

L_0 = Ordenada al origen.

$t_{student}$ = Prueba estadística t-student con intervalo de confianza del 95%.

L_{0inf} = Límite inferior para la ordenada al origen.

L_{0sup} = Límite superior para la ordenada al origen.

c_x = Concentración de la solución.

m = Pendiente de la curva global.

$L_{inferior}$ = Límite inferior para una concentración "x".

$L_{superior}$ = Límite superior para una concentración "x".

1.6.9. ROBUSTEZ

Es la medida de la capacidad de un método analítico para permanecer inalterado por pequeños cambios que se realicen en el método y proporciona un índice de confiabilidad durante su uso (Ruiz, *et al* 2010).

1.6.10. INCERTIDUMBRE

Según Cárdenas 2011, la incertidumbre que se da en una medición son los límites en los cuales se espera que deba encontrarse el valor real de lo que se está midiendo,

aplica en toda clase de medición y es fundamental para la metrología, la incertidumbre que se obtiene en la validación de un método se debe a varios factores, entre ellos:

- Influencia de las condiciones ambientales.
- Resolución de los dispositivos de medición.
- Exactitud de los patrones de referencia utilizados en la calibración.
- Series de medición.
- Incertidumbres de calibración de los materiales utilizados.

La incertidumbre de medición es la duda que existe sobre el resultado obtenido de la medición, a pesar de que se tome el mayor de los cuidados. Por ello es necesario conocer que tan grande es el margen de medida y la duda que se produce. De esta manera para expresar la incertidumbre se necesita del margen y del intervalo de confianza la cual se obtuvo dicho margen (Restrepo, 2007).

Por ejemplo para un balón aforado de 50 ml más o menos 1 ml con un intervalo de confianza del 95% se puede expresar de la siguiente forma:

50 ml \pm 1ml, con un nivel de confianza del 95%.

Incertidumbre estándar

Corresponde a la incertidumbre expresada a través de la desviación estándar.

Incertidumbre estándar combinada

Se denomina a la incertidumbre obtenida por valores de otras magnitudes, es igual a la raíz cuadrada de todas las incertidumbres externas que afectan en la medición.

$$\mu_{c\ intermedia} = C_{intermedia} \sqrt{\left(\frac{\mu_{CPatron}}{C_{Patron}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{VAlicuota P}}{V_{Alicuota P}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{VAforo I}}{V_{Aforo I}}\right)^2}$$

Ec. 19

$$\mu_{C Est X} = C_{C Est X} \sqrt{\left(\frac{\mu_{Cintermedia}}{C_{intermedia}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{V Alicuota I}}{V_{Alicuota I}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{V Aforo Est X}}{V_{Aforo Est X}}\right)^2}$$

Ec. 20**Incertidumbre expandida**

La incertidumbre expandida tiene un rango de medición que se calcula mediante la multiplicación de la incertidumbre estándar por el factor k que es dado bajo un nivel de confianza, por ejemplo para un nivel de confianza del 95%, k es dos (Ruiz, *et al* 2010).

Incertidumbre tipo A

En la evaluación de la incertidumbre tipo A se analiza estadísticamente la magnitud que varía, en este caso la concentración, mediante el cálculo de la desviación experimental de la media de las n observaciones que se realizaron, sin influenciar ambientes externos (Cárdenas, 2011).

Incertidumbre tipo B

A diferencia de la incertidumbre tipo A la evaluación tipo B toma en cuenta todos los factores externos que afectan en las lecturas, como son las pipetas, los balones aforados, la solución patrón, el material de referencia, etc. Cada factor tiene una incertidumbre que es dada por el fabricante o en casos en donde se envía a calibrar un material la empresa calibradora envía un certificado con la incertidumbre del material y la fecha de la próxima calibración (Ruiz, *et al* 2010).

En los materiales de referencias certificados la incertidumbre dada por el fabricante es la expandida, que se da por el producto de la incertidumbre estándar y un factor k que corresponde a un nivel de confianza específico.

1.7. Hipótesis

Los parámetros de validación permiten implementar el método de determinación de nitritos por espectrofotometría de luz visible en el Laboratorio Central de Control de la Calidad del agua de la Empresa Pública Metropolitana De Agua Potable y Saneamiento (EPMAPS).

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización del ensayo

El proyecto se realizará en el Laboratorio de control de calidad del agua de la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento (EPMAPS), ubicada en el interior del parque metropolitano conocido como Guangüiltagua ubicado en el sector norte de Quito, provincia de Pichincha, $0^{\circ}10'49.6''S$ $78^{\circ}27'46.5''O$.

2.1.1 Obtención de las muestras de agua tratada y superficial.

Las muestras de agua tratada y superficial que van a ser utilizados en esta investigación serán proporcionadas por dos plantas de tratamiento:

- 1) Planta de tratamiento de agua potable de Bellavista de la Empresa Pública Metropolitana De Agua Potable y Saneamiento (EPMAPS) ubicada en el interior del parque metropolitano conocido como Guangüiltagua ubicado en el sector norte de Quito, provincia de Pichincha, $0^{\circ}10'49.6''S$ $78^{\circ}27'46.5''O$.
- 2) Planta de tratamiento de Puengasí, localizada al sur oriente de la ciudad de Quito sector Loma de Puengasí camino antiguo a Conocoto sector Obrero independiente, coordenadas O $78^{\circ}29'35.83''$ S $00^{\circ}14'15.54''$.

2.2. Fase inicial de Laboratorio

El método utilizado para la determinación de nitritos escogido fue el colorimétrico con la ayuda de un espectrofotómetro de marca Agilent.

Los materiales a utilizar para determinar la concentración de nitritos e implementar el método son:

- **Reactivo de color.**- Se prepara al añadir 100 ml ácido ortofosfórico al 85% y 10 g de sulfanilamida en 750ml de agua libre nitritos, después de

disolverse completamente se agrega 1g de N- (1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato y al convertirse en una solución homogénea se la afora a 1L con agua libre de nitritos.

- **Papel filtro con un poro de 0.45µm.-** De ser necesario se filtra la muestra antes de agregar el reactivo de color el mismo día que se va proceder a realizar la lectura.
- Balón aforado de 500 ml.
- Balón aforado de 50 ml.
- Micropipeta de 5 ml o pipeta de 5ml.
- Espectrofotómetro de luz visible Agilent 8453.
- Papel toalla
- Celda de cuarzo de 1 ml de longitud.
- Patrón primario de 1000mg/L de NO_2^{-1} certificado y vigente.
- Agua de grado HPLC.
- Material de referencia certificado y vigente de 3mg/L de N-NO_2^{-1} .

El método consiste en tomar 50 ml de una muestra de agua en un balón aforado de 50 ml calibrado de clase A, y agregarle 2ml del reactivo de color y el N- (1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato reaccionara con los Nitritos presentes en la muestra dando un color rojizo, la reacción se completa en unos diez minutos y permanece estable hasta una hora después, tiempo en el cual se puede realizar la lectura en el espectrofotómetro utilizando la celdas de cuarzo.

2.2.1 Puesta en marcha del Espectrofotómetro Agilent 8453

En este estudio se utilizó el espectrofotómetro Agilent 8453 y como primer paso se determinó los picos máximos de absorbancia para lo cual se procedió a encender el computador y el espectro, una vez que la luz del indicador del espectro este en verde se coloca la celda, se abre el programa y se coloca en modo “standar” en la barra de herramientas como se observa en la figura 14.



Figura 14 Barra de herramientas del software.

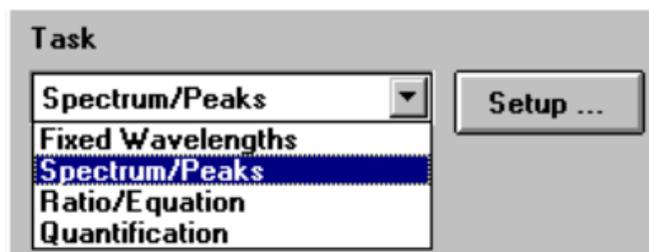


Figura 15 Cuadro de tareas del software.

Dentro de Spectrum/peaks se utiliza el botón Setup para abrir el cuadro de diálogo de la configuración, en donde se elegirá el rango de onda en el cual se analizara el espectro, en este caso se determinó de 440nm a 600nm.

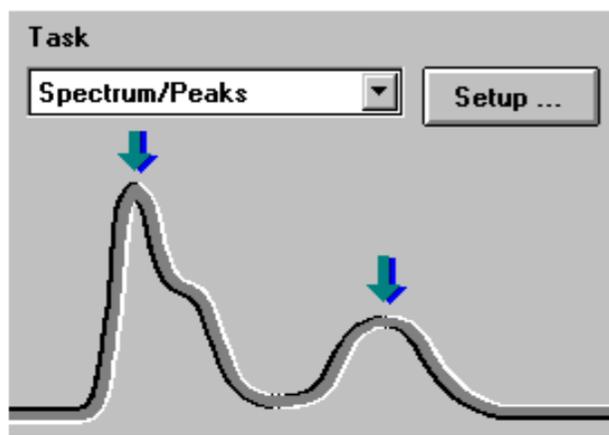


Figura 16 Cuadro de tareas spectrum/peaks del software.

Una vez definido el rango se coloca el blanco, el cual corresponde a agua de grado HPLC, en la celda de cuarzo de 1 cm de longitud se oprime el botón BLANK y después se coloca la muestra de nitritos de una concentración conocida, al cual se le coloco el reactivo de color, una vez colocado la muestra se oprime el botón SAMPLE.

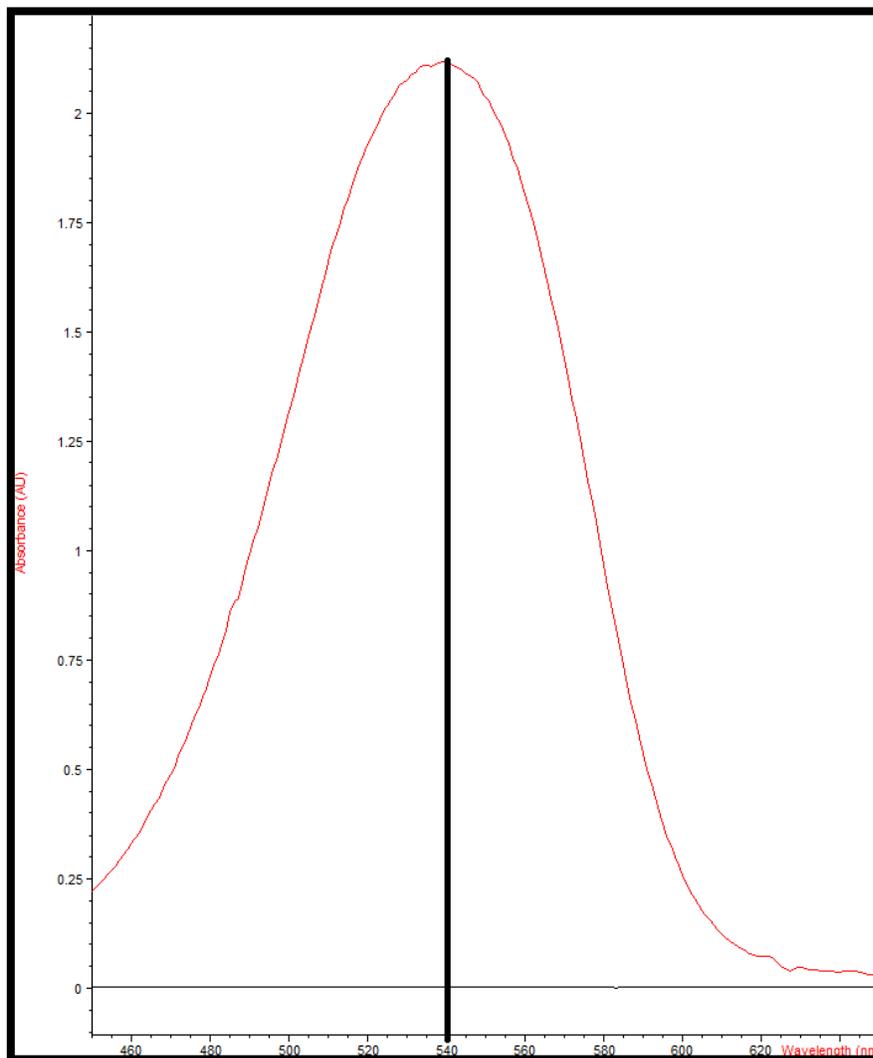


Figura 17 Espectro de nitrito.

En la figura 17 se determinó la longitud de onda en donde existió la mayor absorbancia y corresponde a 540nm, con la ayuda de este dato se procede a realizar el método.

Definido la longitud de onda a la cual se va a trabajar se procede con la curva de calibración para lo cual se configura el programa para comenzar con las lecturas que corresponderán a la curva de calibración.

En el cuadro de tareas “Task” se escoge la opción “Quantification”, y dentro de este se escoge el botón setup para determinar la longitud de onda nm a la cual se devolverá un valor de absorbancia y el equipo correlacionara con una concentración a la cual debemos elegir las unidades, en este caso mg/L. Una vez configurado el equipo se procede a preparar las soluciones.

2.2.2 Elaboración de la curva de calibración

Una vez obtenido la longitud de onda a la cual se procederá a realizar el ensayo se planteó la curva de calibración teniendo en cuenta los requisitos de nitritos para agua potable siendo el máximo permisible 3mg/L de NO_2^{-1} , por lo que este punto ira dentro de la curva.

Las concentraciones de los requisitos de agua potable y superficial deben ir dentro de la curva por lo que se planteó que la curva debe tener los siguientes puntos:

- 0.5 mg/L de NO_2^{-1} .
- 1 mg/L de NO_2^{-1} .
- 2 mg/L de NO_2^{-1} .
- 3 mg/L de NO_2^{-1} .
- 4 mg/L de NO_2^{-1} .

Las soluciones se realizarán a partir de una solución madre de 10 mg/L de NO_2^{-1} , proveniente de un patrón primario de 1000 mg/L de NO_2^{-1} utilizando agua de grado HPLC libre de nitritos realizando la solución tomando 5ml de la solución patrón en un balón de 500 mL aforando con agua HPLC. Obteniendo varias curvas de calibración representando absorbancias versus concentraciones.

Al realizar la puesta a punto del método se determinó los puntos en los cuales se puede trabajar ajustando los valores seleccionados anteriormente y continuar con la curva de calibración que servirá para determinar la concentración de nitritos.

Los puntos definitivos que se utilizara para trabajar son:

- 0.5 mg/L de NO_2^{-1} .
- 1 mg/L de NO_2^{-1} .
- 2 mg/L de NO_2^{-1} .
- 3 mg/L de NO_2^{-1} .
- 3.5 mg/L de NO_2^{-1} .

Para realizar las diferentes soluciones para la curva de calibración se tomó un diferente volumen de la solución madre de 10 mg/L de NO_2^{-1} , utilizando la siguiente ecuación.

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Siendo:

$$C_1 = 10 \text{ mg/L de } \text{NO}_2^{-1}.$$

C_2 = Las concentraciones a preparar.

V_2 = 50 mL (La cantidad de solución que se va a preparar).

V_1 = La cantidad de mL que se va a tomar de la solución madre.

Despejando la ecuación en función de V_1 se obtiene:

$$V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1}$$

Obteniéndose los siguientes resultados que son mostrados en la tabla 5.

Tabla 5**Preparación de estándares de nitrito.**

C_2 (mg/L) Concentración	V_1 (mL) Solución madre	V_2 (mL) Aforo
0.5	2.5	50
1	5.0	50
2	10.0	50
3	15.0	50
3.5	17.5	50

Se realizó tres repeticiones durante cuatro días como se muestra en la tabla.

Tabla 6**Repeticiones de lecturas durante un día.**

Tiempo	Día 1				
Analito	Nitrito				
Concentración	0.5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	3 mg/L	3.5 mg/L
Nº de lecturas	Repeticiones				
1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1
TOTAL	3	3	3	3	3

Se obtuvo tres lecturas por cada concentración teniendo en total 18 lecturas. Con los datos obtenidos se analizó la media, desviación estándar y varianza, para cada día siendo en total 4 días obteniéndose en total 72 datos como se muestra en la tabla.

Tabla 7

Diseño experimental.

Analito		Nitrito			
Concentración	0.5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	3 mg/L	3.5 mg/L
Día	Repeticiones				
1	3	3	3	3	3
2	3	3	3	3	3
3	3	3	3	3	3
4	3	3	3	3	3
TOTAL	12	12	12	12	12

De los datos obtenidos en el diseño experimental se procederá a calcular la linealidad mediante los coeficientes de determinación y correlación, las desviaciones estándares, análisis de la varianza ANOVA.

Se realizó curvas de calibración individuales para cada día y una curva de calibración global para analizar los coeficientes de linealidad, la función respuesta que servirá para el cálculo de la incertidumbre del método.

2.3. Fase de Campo

Se tomará muestras de las dos plantas de tratamiento, mencionadas anteriormente, tanto de agua tratada como de cruda para enriquecer con nitritos las diversas muestras y analizar el efecto matriz del método, además de analizar la reproducibilidad.

Se tomará mínimo 100ml de muestra y el análisis se realizará dentro de las primeras 48 horas como nos lo menciona el standar methods, cuando el ensayo no se realizó inmediatamente se guardó a la muestra en el refrigerador a 4°C.

El cloro que se utiliza al final del tratamiento del agua potable es una interferencia para la medición de nitritos con el método colorimétrico por lo que se procedió a utilizar tiosulfato de sodio al 3% para que reaccione con el cloro y evitar interferencias en el enriquecimiento del método que se veía reflejado en la lectura final.

Se coloca tres gotas del tiosulfato de sodio al 3% por un frasco que contenga 250 ml de agua.

2.4. Segunda fase de laboratorio

2.4.1. Análisis del efecto matriz

Al finalizar la realización de las curvas de calibración se escogió la curva más óptima que corresponde al método que se va a utilizar en definitiva para todas las lecturas a futuro de muestras que lleguen al laboratorio, por lo que en esta curva se analizó el efecto matriz y la exactitud.

Se enriquecerán las muestras recogidas de las plantas de tratamiento con nitrito y se empleara el método de determinación de nitritos durante tres días con tres repeticiones. Se utilizará un punto para el cálculo del efecto matriz con una concentración de 3.25 mg/L en dos matrices agua superficial y agua potable, para asegurar la veracidad en el punto más importante de la curva que representa el máximo permisible de nitrito para agua potable.

Tabla 8**Diseño del análisis del efecto matriz en agua superficial**

Analito	NITRITO	
Planta de tratamiento	Planta de tratamiento Bellavista	Planta de tratamiento Puengasi
Matriz	Agua Superficial	Agua Superficial
Concentración	3.25mg/L	3.25mg/L
Día	Repeticiones	
1	3	3
2	3	3
3	3	3
TOTAL	9	9

Tabla 9**Diseño del análisis del efecto matriz en agua potable**

Analito	NITRITO	
Planta de tratamiento	Planta de tratamiento	Planta de tratamiento
	Bellavista	Puengasi
Matriz	Agua Potable	Agua Potable
Concentración	3.25mg/L	3.25mg/L
Día	Repeticiones	
1	3	3
2	3	3
3	3	3
TOTAL	9	9

Con los datos obtenidos en las tablas 5 y 6, tanto para agua superficial como potable se determinara la media de cada día y se analizara el porcentaje de recuperación, para establecer el efecto matriz del método a través de la recuperación obtenida.

2.4.2. Análisis de la exactitud del método

Para el análisis de la exactitud se utilizará un material de referencia certificado con una concentración de nitritos determinado. El material de referencia conseguido por el laboratorio corresponde a una concentración de 3mg/L de N - NO₂⁻¹, en vista que el método se lo realizo con concentraciones expresadas en mg/L de NO₂⁻¹ se procedió a transformar la concentración del material de referencia.

$$\frac{3mg\ N}{L} * \frac{1g}{1000mg} * \frac{46 \frac{g}{mol} NO_2^{-1}}{14 \frac{g}{mol} N} = 0.009857 \frac{g}{L} NO_2^{-1}$$

$$0.009857 \frac{g}{L} NO_2^{-1} * \frac{1000mg}{g} = 9.857 \frac{mg}{L} NO_2^{-1}$$

La concentración del material de referencia expresada como nitritos es de 9.857 mg/L de NO₂⁻¹, y debido a que el punto máximo de la curva preparada es de 3.5 mg/L de NO₂⁻¹ se procedió a diluir en un factor de 1:4, obteniéndose así el valor correspondiente dentro de la curva.

$$\frac{9.857 \frac{mg}{L} NO_2^{-1}}{4} = 2.4643 \frac{mg}{L} NO_2^{-1}$$

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Siendo:

$$C_1 = 9.8571\ mg/L\ de\ NO_2^{-1}.$$

$$C_2 = 2.4643\ mg/L\ de\ NO_2^{-1}.$$

$$V_2 = 50\ mL\ (La\ cantidad\ de\ solución\ que\ se\ va\ a\ preparar).$$

V_1 = La cantidad de mL que se va a tomar de la solución madre del material de referencia.

Despejando la ecuación en función de V_1 se obtiene:

$$V_1 = \frac{2.4643 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{ de NO}_2^{-1} * 50\text{ml}}{9.8571 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{ de NO}_2^{-1}} = 12.5 \text{ mL.}$$

Una vez realizado los cálculos se preparó el material de referencia y se leyó con ayuda del espectro durante tres días realizando tres repeticiones.

Tabla 10

Análisis para el cálculo de la exactitud

Analito	Nitrito
Concentración	2.4643 mg/L de NO ₂ ⁻¹
Día	Repeticiones
1	3
2	3
3	3

Al finalizar las lecturas se obtuvieron la media de cada día y se transformó nuevamente a Nitrógeno de nitritos para poder comparar y se calculó el porcentaje de recuperación.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

El primer proceso realizado fue la elección de la longitud de onda, que por bibliografía se acercaba a los 543 nm, sin embargo la longitud varía según el equipo que se utilice por lo que se determinó mediante el espectro obtenido durante los primeros ensayos y se determinó una longitud de 540 nm como se observa en la figura 17.

3.1 Datos obtenidos para la curva de calibración.

Se realizó tres curvas de calibración por cada día durante cuatro días cada 15 días, obteniéndose los siguientes resultados para cada punto de la curva:

Tabla 11

Absorbancias obtenidas experimentalmente para el blanco.

<i>Repeticiones</i>	<i>Blanco</i>			
	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 3</i>	<i>Día 4</i>
	<i>ABSORBANCIA</i>			
1	1,26E-03	9,11E-05	0,0005	0,0001
2	5,04E-04	5,98E-03	0,0009	0,0002
3	8,99E-04	1,73E-04	0,0009	0,0011
Media	0,0009	0,0021	0,0008	0,0004

Tabla 12

Absorbancias obtenidas experimentalmente de Nitrito.

<i>Repeticiones</i>	<i>0,500 mg/L de NO₂⁻¹</i>			
	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 3</i>	<i>Día 4</i>
	<i>ABSORBANCIA</i>			
1	0,46688	0,42334	0,48589	0,4328
2	0,4824	0,39264	0,4252	0,4476
3	0,39946	0,4416	0,41774	0,4138
Media	0,4496	0,4192	0,4429	0,4314

Tabla 13

Absorbancias obtenidas experimentalmente de Nitrito.

<i>Repeticiones</i>	<i>1 mg/ L de NO₂⁻¹</i>			
	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 3</i>	<i>Día 4</i>
	<i>ABSORBANCIA</i>			
1	0,92373	0,8935	0,9237	0,8856
2	0,92212	0,8319	0,8657	0,8628
3	0,80594	0,8777	0,8914	0,8708
Media	0,8839	0,8677	0,8936	0,8730

Tabla 14

Absorbancias obtenidas experimentalmente de Nitrito.

<i>Repeticiones</i>	<i>2 mg/ L de NO₂⁻¹</i>			
	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 3</i>	<i>Día 4</i>
	<i>ABSORBANCIA</i>			
1	1,7373	1,6842	1,7380	1,7192
2	1,7180	1,6538	1,7172	1,7589
3	1,6330	1,6845	1,7161	1,7020
Media	1,6961	1,6742	1,7238	1,7267

Tabla 15

Absorbancias obtenidas experimentalmente de Nitrito.

<i>Repeticiones</i>	<i>3 mg/ L de NO₂⁻¹</i>			
	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 3</i>	<i>Día 4</i>
	<i>ABSORBANCIA</i>			
1	2,4931	2,4173	2,4935	2,4819
2	2,4666	2,4153	2,4733	2,5172
3	2,3740	2,4432	2,4546	2,4667
Media	2,4446	2,4253	2,4738	2,4886

Tabla 16**Absorbancias obtenidas experimentalmente de Nitrito.**

<i>Repeticiones</i>	<i>3,5 mg/ L de NO₂⁻¹</i>			
	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 3</i>	<i>Día 4</i>
	<i>ABSORBANCIA</i>			
1	2,7586	2,7351	2,8030	2,7787
2	2,8302	2,7134	2,7177	2,7995
3	2,6697	2,7310	2,7589	2,7736
Media	2,7528	2,7265	2,7599	2,7839

Para recopilar los resultados se determinó la media de cada punto para cada día, valores con los cuales se realizara las curvas de calibración.

Tabla 17**Promedio de absorbancias obtenidas experimentalmente de Nitrito.**

<i>Concentración</i> <i>(mg/ L de NO₂⁻¹)</i>	<i>Absorbancia</i>			
	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 3</i>	<i>Día 4</i>
0,000	0,0009	0,0021	0,0008	0,0004
0,500	0,4496	0,4192	0,4429	0,4314
1,000	0,8839	0,8677	0,8936	0,8730
2,000	1,6961	1,6742	1,7238	1,7267
3,000	2,4446	2,4253	2,4738	2,4886
3,500	2,7528	2,7265	2,7599	2,7839

3.2 Curvas de calibración individual

Con los datos obtenidos en la tabla 17 se realizó la gráfica de la curva de calibración para cada día, además del cálculo del coeficiente de correlación, ecuación de la recta, desviación estándar de la pendiente, el error tipo en la estimación de x y de y, como se muestra en las tablas a continuación.

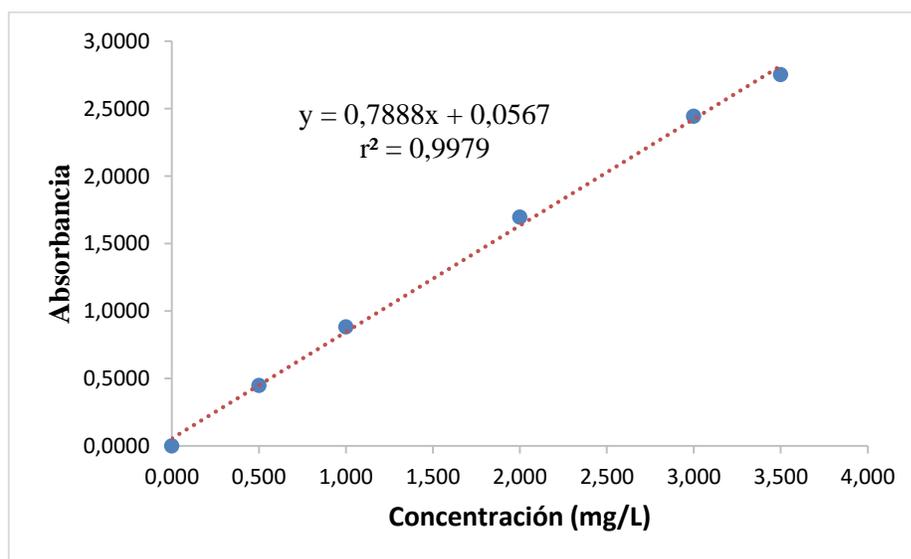


Figura 18 Curva de calibración de nitrito día 1.

Tabla 18

Análisis de la curva de calibración día 1.

m (L/mg)	0,7888	Lo	0,0567
S m (L/mg)	0,0163	S Lo	0,0342
r²	0,9979	S y/x	0,0511
g.L.	5	Sx/y (mg/L)	0,0648

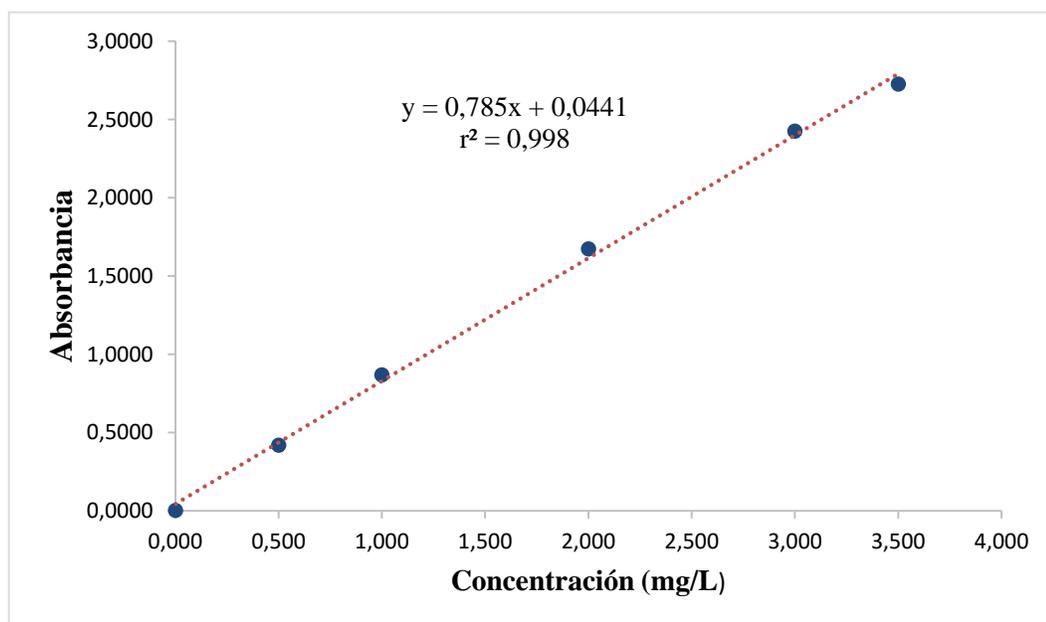


Figura 19 Curva de calibración de nitrito día 2

Tabla 19

Análisis de la curva de calibración día 2.

m (L/mg)	0,7850	Lo	0,0441
S m (L/mg)	0,0157	S Lo	0,0330
r²	0,9980	S y/x	0,0492
g.L.	5	Sx/y (mg/L)	0,0626

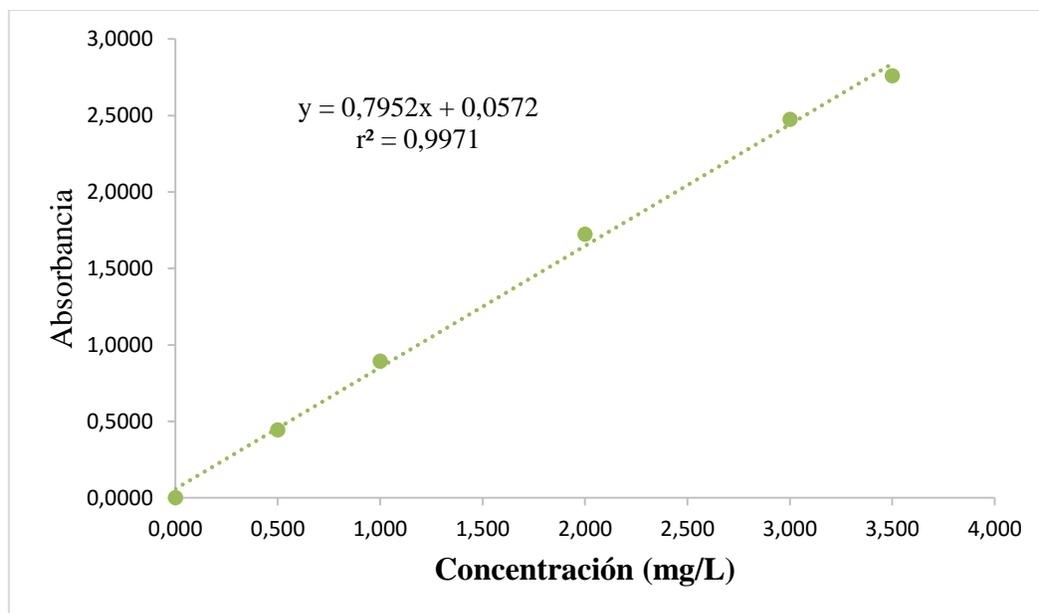


Figura 20 Curva de calibración de nitrito día 3

Tabla 20

Análisis de la curva de calibración día 3.

m (L/mg)	0,7952	Lo	0,0572
S m (L/mg)	0,0193	S Lo	0,0405
r²	0,9971	S y/x	0,0605
g.L.	5	Sx/y (mg/L)	0,0760

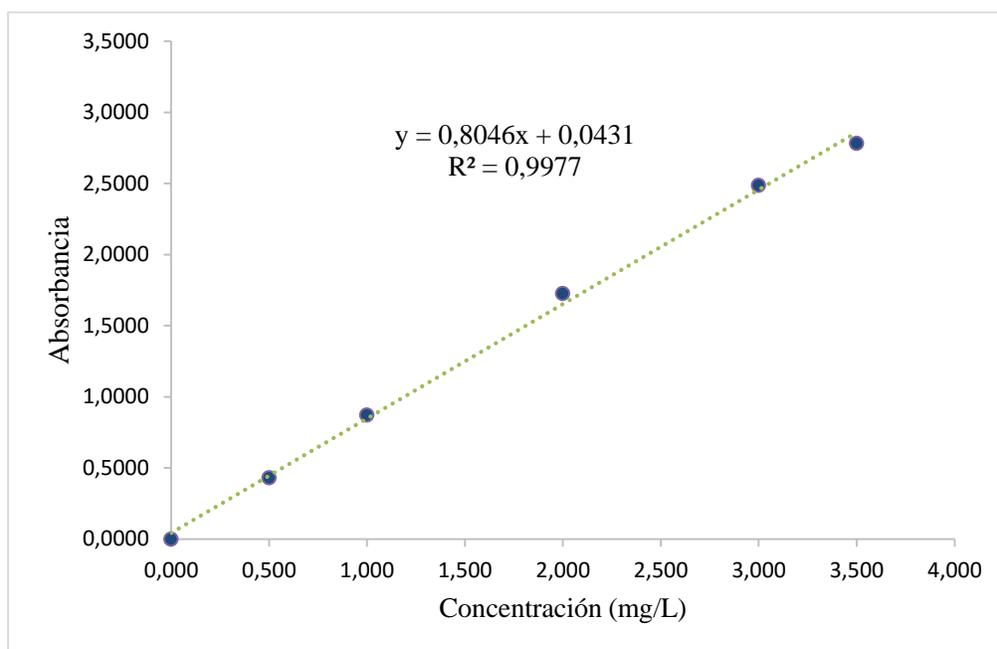


Figura 21 Curva de calibración de nitrito día 4.

Tabla 21

Análisis de la curva de calibración día 4

m (L/mg)	0,8046	Lo	0,0431
S m (L/mg)	0,0179	S Lo	0,0376
r 2	0,9977	S y/x	0,0561
g.L.	5	Sx/y (mg/L)	0,0698

3.3 Curva de calibración global

Obtenido los datos de cada curva individual se realizó el análisis de la curva global para lo cual se utilizó todas las absorbancias obtenidas durante los cuatro días.

En donde se obtuvo los siguientes resultados correspondientes a la curva global.

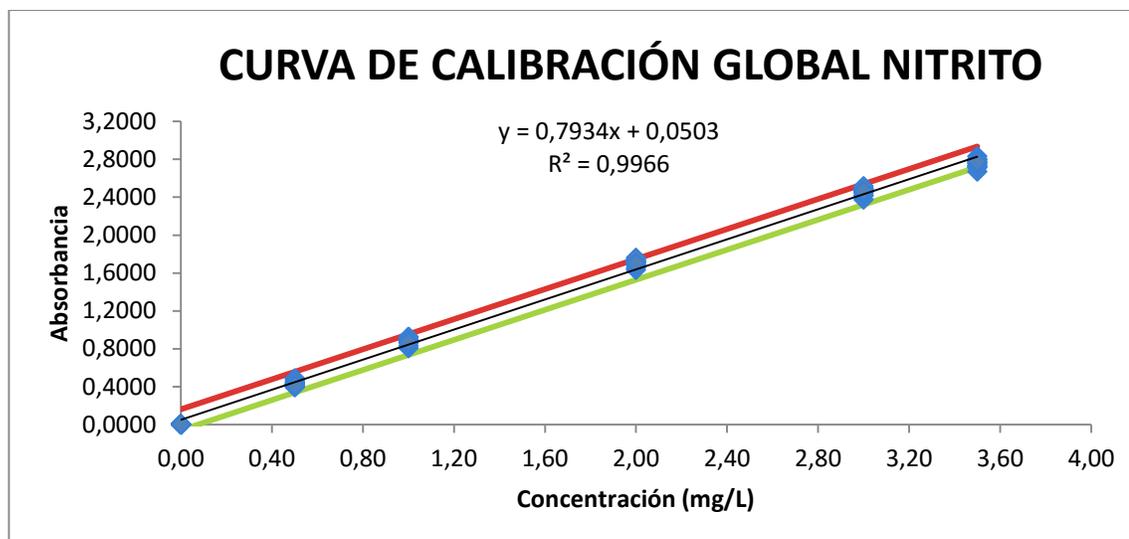


Figura 22 Curva de calibración global

En la figura 22 se muestra la absorbancia vs concentración de la curva global junto con los límites de confianza para cada punto de la curva, los valores de los límites se muestran en la tabla 22, se determinó los límites con la utilización de la ecuación 17 y 18 con un nivel de confianza del 95%..

Tabla 22

Intervalos de confianza de la calibración.

INTERVALO O REGION DE CONFIANZA DE LA CALIBRACION		
<i>C</i> (mg/L)	<i>L sup</i> (Absorbancia)	<i>L inf</i> (Absorbancia)
0,000	0,1606	-0,0600
0,500	0,5573	0,3367
1,000	0,9539	0,7334
2,000	1,7473	1,5267
3,000	2,5407	2,3201
3,500	2,9374	2,7168

El análisis de la curva de calibración global se muestra en la tabla 23, estos datos servirán para calcular la incertidumbre del método para cada punto de la curva.

Tabla 23

Análisis de la curva de calibración global.

<i>m (L/mg)</i>	0,7934	<i>Lo</i>	0,0503
<i>S m (L/mg)</i>	0,0051	<i>S Lo</i>	0,0099
<i>r 2</i>	0,9966	<i>S y/x</i>	0,0553
<i>g. L.</i>	70	<i>S B</i>	0,0016
<i>t</i>	1,9944	<i>L.D.</i>	0,0551
<i>Lo sup</i>	0,1606	<i>L.D. (mg/L)</i>	0,0061
<i>Lo inf</i>	-0,0600	<i>L.C.</i>	0,0664
<i>Resolución (mg/L)</i>	0,0001	<i>L.C. (mg/L)</i>	0,0203
<i>μ resolución (mg/L)</i>	3,38E-05	<i>S x/y (mg/L)</i>	0,0697

3.4 Resultados del Análisis de la varianza (ANOVA)

Con los datos obtenidos de la absorbancias de cada día en las tres repeticiones se realizó el cálculo de la varianza (ANOVA) para cada concentración, obteniéndose los resultados siguientes:

Tabla 24

Determinación de la varianza del blanco.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Día 1	3	0,0026636	0,000887877	1,42902E-07
Día 2	3	0,0062466	0,002082189	1,14104E-05
Día 3	3	0,0022645	0,000754833	6,40855E-08
Día 4	3	0,0013242	0,000441392	3,1294E-07

Tabla 25
Análisis de la varianza del blanco.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	4,646E-06	3	1,54E-06	<u>0,519</u>	0,6808	4,0661805
Dentro de los grupos	2,386E-05	8	2,98E-06			
Total	2,850E-05	11				
Sr =0,001727017		(SL)²=-4,77882E-07		SR =0,001582626		

Tabla 26
Determinación de la varianza del estándar 1 (0.5 mg/L).

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Día 1	3	1,34874	0,449580	0,001944
Día 2	3	1,25758	0,419193	0,000612
Día 3	3	1,32881	0,442937	0,001398
Día 4	3	1,29414	0,431380	0,000287

Tabla 27**Análisis de la varianza del estándar 1 (0.5 mg/L).**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,001608	3	0,000536	<u>0,5062</u>	0,6891246	4,06618
Dentro de los grupos	0,008482	8	0,001060			
Total	0,010090	11				
Sr = 0,032562185		(SL)² = -0,00017472		SR = 0,029758623		

Tabla 28**Determinación de la varianza del estándar 2 (1 mg/L).**

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Día 1	3	2,65179	0,88393	0,00456
Día 2	3	2,60312	0,86771	0,00102
Día 3	3	2,68082	0,89361	0,00084
Día 4	3	2,61909	0,87303	0,00013

Tabla 29
Análisis de la varianza del estándar 2 (1 mg/L).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,0011986	3	0,000399	<u>0,2434</u>	0,863728	4,06618
Dentro de los grupos	0,0131298	8	0,001641			
Total	0,0143284	11				
Sr = 0,0405121		(SL)² = -0,00041384		SR = 0,035033357		

Tabla 30
Determinación de la varianza del estándar 3 (2 mg/L).

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Día 1	3	5,0883	1,696100	0,003079
Día 2	3	5,0225	1,674167	0,000311
Día 3	3	5,1713	1,723767	0,000152
Día 4	3	5,1801	1,726700	0,000852

Tabla 31
Análisis de la varianza del estándar 3 (2 mg/L).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,0055585	3	0,0018528	<u>1,686</u>	0,246335868	4,06618
Dentro de los grupos	0,0087885	8	0,0010985			
Total	0,0143471	11				
Sr = 0,033144708		(SL)² = 0,000251425		SR = 0,036742306		

Tabla 32
Determinación de la varianza del estándar 4 (3 mg/L).

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Día 1	3	7,3337	2,444567	0,003910
Día 2	3	7,2758	2,425267	0,000242
Día 3	3	7,4214	2,473800	0,000378
Día 4	3	7,4658	2,488600	0,000671

Tabla 33
Análisis de la varianza del estándar 4 (3 mg/L).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,00731373	3	0,00243791	<u>1,874</u>	0,21225963	4,0661
Dentro de los grupos	0,01040445	8	0,00130055			
Total	0,01771818	11				
Sr = 0,036063232		(SL)² = 0,000379118		SR = 0,040983839		

Tabla 34
Determinación de la varianza del estándar 5 (3.5 mg/L).

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Día 1	3	8,2585	2,752833	0,006465
Día 2	3	8,1795	2,726500	0,000133
Día 3	3	8,2796	2,759867	0,001820
Día 4	3	8,3518	2,783933	0,000188

Tabla 35
Análisis de la varianza del estándar 5 (3.5 mg/L).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,00502593	3	0,00167531	0,7786	0,53814313	4,0662
Dentro de los grupos	0,01721176	8	0,00215147			
Total	0,02223769	11				
Sr = 0,046383941		(SL)² = -0,000158719		SR = 0,044640237		

3.5 Reproducibilidad y repetibilidad

Al tener los datos del análisis de la varianza también se pudo calcular la repetibilidad (Sr) con la ecuación 10 y la reproducibilidad (SR) con la ecuación 12, estos resultados se muestran en las tablas 25, 27, 29, 31, 33 y 35; para el blanco, los estándares de 0.5, 1, 2, 3, 3.5 mg/L de NO₂⁻¹ respectivamente.

Al transformar los resultados de repetibilidad y reproducibilidad en mg/L se obtiene los siguientes resultados:

Tabla 36**Reproducibilidad expresada en mg/L de NO₂⁻¹.**

C (mg/L)	SR/m (mg/L)
0,000	0,001994792
0,500	0,037508717
1,000	0,044157159
2,000	0,046311173
3,000	0,051657337
3,500	0,056265976

Tabla 37**Reproducibilidad expresada como porcentaje de recuperación.**

C (mg/L)	SR %Recuperación
0,000	-
0,500	7,501743351
1,000	4,415715933
2,000	2,315558627
3,000	1,721911219
3,500	1,607599322

Tabla 38**Repetibilidad expresada en mg/L de NO₂⁻¹.**

C (mg/L)	Sr/m (mg/L)
0,000	0,0021768
0,500	0,0410424
1,000	0,0510627
2,000	0,0417766
3,000	0,0454552
3,500	0,0584638

Tabla 39

Repetibilidad expresada en porcentaje de recuperación.

C (mg/L)	Sr %Recuperacion
0,000	-
0,500	8,208483118
1,000	5,106274112
2,000	2,088832281
3,000	1,515174855
3,500	1,670394196

3.6 Efecto Matriz

Una vez finalizada la primera parte de laboratorio se procedió a recoger muestras de agua cruda y tratada de dos diferentes plantas en días diferentes, para realizar lecturas de las muestras y enriquecerlas determinando el efecto matriz, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 40

Lectura de nitritos en agua cruda de bellavista.

	Día 1				
	R1	R2	R3	Promedio	%R
Blanco	2,08E-03	3,82E-03	4,39E-03		
AGUA CRUDA BELLAVISTA	-0,041	-0,009	-0,012	-0,021	
ST 3,25 mg/L de NO₂⁻¹	3,212	3,239	3,123	3,191	99

Tabla 41

Lectura de nitritos en agua cruda de bellavista.

Día 2					
	R1	R2	R3	Promedio	%R
Blanco	4,51E-04	0,000	1,61E-03	0,001	
AGUA CRUDA BELLAVISTA	-0,020	4,14E-03	0,012	-0,001	
ST 3,25 mg/L de NO₂⁻¹	3,191	3,194	3,176	3,187	98

Tabla 42

Lectura de nitritos en agua cruda de bellavista.

Día 3					
	R1	R2	R3	Promedio	%R
Blanco	-2,24E-05	4,09E-03	4,40E-03		
AGUA CRUDA BELLAVISTA	0,026	0,028	0,000	-0,021	
ST 3,25 mg/L de NO₂⁻¹	3,166	3,206	3,082	3,151	96

Debido a que en la potabilización del agua se coloca cloro que al finalizar queda libre como cloro residual y este oxida a los nitritos, debido a esto se trató la muestra previamente colocando tres gotas de tiosulfato de sodio para eliminar la interferencia que este producía, obteniendo los resultados mostrados en las tablas 40,41 y 42.

Tabla 43

Lectura de nitritos en agua potable de bellavista.

Día 1					
	R1	R2	R3	Promedio	%R
Blanco	2,08E-03	3,82E-03	4,39E-03		
AGUA TRATADA BELLAVISTA	-0,015	0,024	-0,019	-0,003	
ST 3,25 mg/L de NO₂⁻¹	3,110	2,907	2,917	2,978	92

Tabla 44

Lectura de nitritos en agua potable de bellavista.

Día 2					
	R1	R2	R3	Promedio	%R
Blanco	2,08E-03	3,82E-03	4,39E-03		
AGUA TRATADA BELLAVISTA	-0,002	0,004	0,010	0,004	
ST 3,25 mg/L de NO₂⁻¹	2,940	3,056	3,160	3,052	94

Tabla 45
Lectura de nitritos en agua potable de bellavista.

Día 3					
	R4	R5	R6	Promedio	% R
Blanco	2,08E-03	3,82E-03	4,39E-03		
AGUA TRATADA BELLAVISTA					
ST 3,25 mg/L de NO₂⁻¹	0,003	0,003	-0,023	-0,006	
	3,164	3,140	3,027	3,110	96

Tabla 46
Lectura de nitritos en agua cruda de Puengasí.

Día 1					
	R1	R2	R3	Promedio	%R
Blanco	2,44E-03	-1,57E-03	-7,69E-03		
AGUA CRUDA PUENGASI					
ST 3,25 mg/L de NO₂⁻¹	-0,022	-0,023	0,012	-0,011	
	3,304	3,209	3,082	3,198	99

Tabla 47
Lectura de nitritos en agua cruda de Puengasí.

Día 2					
	R1	R2	R3	Promedio	%R
Blanco	6,28E-03	0,001	3,74E-05	0,003	
AGUA CRUDA PUENGASI	0,002	4,29E-02	0,018	0,021	
ST 3,25 mg/L de NO₂⁻¹	3,276	3,315	3,263	3,285	100

Tabla 48
Lectura de nitritos en agua cruda de Puengasí.

Día 3					
	R1	R2	R3	Promedio	%R
Blanco	1,01E-03	9,27E-03	5,15E-03		
AGUA CRUDA PUENGASI	0,035	-0,009	0,000	0,009	
ST 3,25 mg/L de NO₂⁻¹	3,246	3,227	3,191	3,221	99

Tabla 49

Lectura de nitritos en agua potable de Puengasí.

Día 1					
	R1	R2	R3	Promedio	%R
Blanco	2,44E-03	-1,57E-03	4,39E-03		
AGUA					
TRATADA	-0,005	-0,005	-0,034	-0,015	
PUENGASI					
ST 3,25 mg/L de NO₂⁻¹	3,054	3,053	3,058	3,055	94

Tabla 50

Lectura de nitritos en agua potable de Puengasí.

Día 2					
	R1	R2	R3	Promedio	%R
Blanco	9,43E-03	2,44E-03	6,28E-03		
AGUA					
TRATADA	-0,053	-0,001	-0,008	-0,021	
PUENGASI					
ST 3,25 mg/L de NO₂⁻¹	3,013	2,927	3,247	3,062	95

Tabla 51
Lectura de nitritos en agua potable de Puengasí.

Día 3					
	R1	R2	R3	Promedio	%R
Blanco	5,24E-03	1,01E-03	9,27E-03		
AGUA					
TRATADA	0,026	0,012	0,005	0,014	
PUENGASI					
ST 3,25 mg/L de NO₂⁻¹	3,059	2,925	2,936	2,973	91

Tabla 52
Porcentaje máximo y mínimo de recuperación

% Recuperación Máxima	100,4
% Recuperación Mínimo	91,0

En la tabla 52 se representa el porcentaje de recuperación máximo y mínimo para todas las muestras enriquecidas provenientes de dos plantas de tratamiento diferentes que tienen fuentes de agua superficial diferente.

3.7 Exactitud

Después de determinar el efecto matriz se procedió a analizar la exactitud del método con la ayuda de un material de referencia certificado y vigente.

Tabla 53**Datos obtenidos en la lectura de las muestras con dilución $\frac{1}{4}$.**

Repeticiones	Nitrito (NO_2^{-1}) mg/L		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	2,6301	2,4883	2,6429
2	2,6001	2,5874	2,5621
3	2,5894	2,5854	2,5543

Tabla 54**Datos obtenidos en las lecturas de las muestras sin dilución.**

Repeticiones	Nitrito (NO_2^{-1}) mg/L		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	10,52040	9,95320	10,57160
2	10,40040	10,34960	10,24840
3	10,35760	10,34160	10,21720

Tabla 55**Datos transformados de NO_2^{-1} a N-NO_2^{-1} .**

Repeticiones	N como Nitrito (N-NO_2^{-1}) mg/L.		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	3,2018609	3,0292348	3,2174435
2	3,1653391	3,1498783	3,1190783
3	3,152313	3,1474435	3,1095826
PROMEDIO	3,173171	3,1088522	3,1487014

Tabla 56**Análisis de exactitud del material de referencia**

DIA 1	DIA 2	DIA 3	MEDIA (mg/L NO₂⁻¹)	% R
3,173171	3,108852	3,148701	3,1436	103,7483

En la tabla 56 se determinó el porcentaje de recuperación de los tres días y tres repeticiones en las que se realizó la lectura.

3.8 Incertidumbre

Una vez obtenido todos los resultados se determinó la incertidumbre del método.

Tabla 57**Materiales utilizados durante el desarrollo de la curva de calibración**

Instrumento	Capacidad (mL)	Ucal (mL)
Balón aforado B500-1FQ	500	0,13
Balones aforados B50-12-AA : B50-18-AA	50	0,011
Micropipeta MPG 6	5	0,0015
	2,5	0,46
Micropipeta MPE 6	1	1,2
Patrón Primario 1000 mg/L de NO ₂ ⁻¹	100	1.4142

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Como lo menciona Harris 2001, la implementación de un método analítico debe ser validado para demostrar que el desempeño es el adecuado para el uso previsto en el laboratorio, en este caso al tratarse de un método normalizado con modificaciones es necesario verificar que las características sean las adecuadas para poder ser validado, implementado y por consiguiente apto para ser usado en el laboratorio. A continuación se analizan las características de la validación para posteriormente determinar si el método puede ser implementado o no.

4.1. Análisis de la curva individual

Como se observa en las tablas 11 a la 16, se realizó la curva de calibración durante cuatro días realizando tres repeticiones en cada día con un patrón primario de 1000 mg/L de NO_2^{-1} con certificado vigente como se muestra en el Anexo A. Los días en los que se realizó las curvas de calibración fueron cada 15 días, para abarcar la mayor cantidad de cambios que se dan por el ambiente, asegurando que el método puede ser utilizado en cualquier momento sin alterar los resultados.

En la figura 18 se muestra la curva de calibración correspondiente al primer día en el cual se considera las lecturas realizadas en ese día mediante el promedio de los datos obtenidos para cada punto, se observa que se obtuvo un coeficiente de correlación lineal de 0.9979. De igual manera se realizó las gráficas de cada día obteniéndose coeficientes de correlación lineal de 0.9980, 0.9971, 0.9977 para los días dos, tres y cuatro respectivamente, el servicio de acreditación ecuatoriana (SAE) ha designado que para implementar un método el coeficiente de correlación lineal debe ser mayor a 0.99 en las curvas individuales y en la global, y como se mencionó anteriormente estos valores si cumplen.

Además se determinó el error tipo en la estimación de x para cada día de calibración obteniéndose 0.0648 mg/L, 0.0626 mg/L, 0.0760 mg/L y 0.0698 mg/L de NO_2^{-1} que representa la desviación en el resultado para cada curva, siendo el mayor el error del tercer día por lo que se toma este valor como la incertidumbre del factor de resolución, que servirá para calcular la incertidumbre del método posteriormente como lo menciona Harris, 2001.

4.2. Análisis de la curva global

Una vez obtenido los análisis de las curvas individuales se procedió a realizar la curva de calibración global utilizando todos los datos obtenidos durante los cuatro días de calibración obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 23 en donde se muestra un coeficiente de correlación lineal global de 0.9966, que es mayor a 0.99 por lo que el método cumple con una de las condiciones necesarias para ser validado e implementado. El error típico en la estimación de x fue de 0.0697 mg/L de NO_2^{-1} menor al error del tercer día, una desviación estándar de la pendiente baja de 0.0051 L/mg, una resolución de 0.0001 mg/L junto con la incertidumbre de resolución de $3.38\text{e-}5$ mg/L, y el límite de detección calculado con la ecuación 13 fue de 0.0061 mg/L que corresponde a la concentración más baja que el equipo puede detectar pero no asegurar que sea el correcto, a lo contrario del límite de cuantificación que sí es seguro afirmar y es de 0.5 mg/L de NO_2^{-1} que corresponde al valor del punto más bajo de la curva de calibración, es decir, el rango que existe entre el límite de detección y el de cuantificación corresponde a trazas que pudiera existir de nitritos pero que no es posible cuantificar.

La gráfica de la curva global se observa en la figura 22 en donde se muestra la línea de tendencia del límite inferior y límite superior para cada punto y los valores de los límites se muestran en la tabla 22, los valores tienen una baja desviación como se observa en la ilustración de la figura 22.

4.3. Análisis de la varianza ANOVA

Se determinó el valor F de Fisher para cada punto de la curva de calibración con la utilización de las ecuaciones 10, 11 y 12, además de las ecuaciones de la tabla 4, y al compararlo con el valor crítico para F que se muestra en las tablas 25, 27, 29, 31, 33 y 35; que corresponden al blanco, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L y 3.5 mg/L de NO_2^{-1} respectivamente se observa que el valor F es menor al valor crítico de F que es 4.07, según la tabla que se encuentra en el anexo B para tres grados de libertad en el numerador y ocho en el denominador, en todos los casos lo que nos demuestra que es posible guardar una curva de calibración en el software para utilizarlo en próximas lecturas, teniendo en cuenta esta posibilidad se procedió a elegir la mejor curva de calibración obtenida durante los cuatro días de calibración, siendo esta la tercera curva de calibración del cuarto día debido a que esta tiene un coeficiente de correlación lineal de 0,99915, además esta curva se utilizara para determinar la exactitud del método y el efecto matriz.

4.4 Análisis de la Reproducibilidad y la repetibilidad

El servicio de acreditación ecuatoriana, según la norma ISO 17025 menciona que uno de los parámetros que no deben faltar para la validación de un método es la reproducibilidad y repetibilidad que en términos de porcentaje debe ser menor al 10%, en la tabla 37 se muestra el porcentaje de reproducibilidad para cada estándar utilizado en la curva de calibración, siendo el porcentaje más alto de 7.50% correspondiente a la concentración de 0.5 mg/L de NO_2^{-1} , del mismo modo en la tabla 39 se encuentra el porcentaje de repetibilidad, siendo el más alto el porcentaje de 8.25% correspondiente a la concentración de 0.5mg/L de NO_2^{-1} , es decir, que tanto la reproducibilidad y la repetibilidad cumplen con estos parámetros para la validación.

4.5 Análisis del efecto matriz

Según Clavijo 2002, el efecto matriz de un método se determina a través del enriquecimiento de las muestras en la matriz que va a ser utilizada, en este caso sería el

agua tratada y el agua cruda, al ser 3 mg/L de NO_2^{-1} el límite máximo permisible para agua potable y la curva se pretendió realizarla hasta 4 mg/L de NO_2^{-1} pero debido a la pérdida de linealidad del método se realizó hasta 3.5 mg/L de NO_2^{-1} punto en el cual se observa que empieza a dispersarse un poco de la curva, por lo que se eligió al punto 3.25 mg/L de NO_2^{-1} para enriquecer las muestras de ambas matrices, obteniéndose los resultados que se muestran en las tablas 40 a la 51, en donde se observa que no existió presencia de nitritos y además con el enriquecimiento de las muestras el porcentaje de recuperación fue de 91% a 100.4% para agua cruda y tratada, indicando que no existen interferencias para la lectura de nitritos en agua cruda.

Sin embargo en agua tratada existe la interferencia del cloro libre residual que se coloca en la potabilización del agua que provoca la oxidación de nitritos a nitratos, para ello se colocó Tio Sulfato de Sodio al 3% como lo menciona Clesceri, et al 2005, en el standard methods, para contrarrestar la acción del cloro y detectar la cantidad de nitritos que se están produciendo en el agua potable de ser el caso, como se observa en las tablas 43, 44, 45, 49, 50 y 51 el porcentaje de recuperación varía entre el 91 % a 96 % para agua potable en muestras de la planta de tratamiento de Puengasí y Bellavista respectivamente, el agua de estas plantas provienen de dos fuentes de agua superficial diferente y al tener la recuperación dentro del rango permitido que es de 90% a 110% como lo menciona el Servicio de Acreditación Ecuatoriana basándose en la norma INEN 17025, por lo que se deduce que no existe interferencia en la lectura de los nitritos en agua superficial y potable.

4.6 Análisis de la exactitud

La exactitud del método se determinó con el material de referencia certificado que se muestra en el anexo C, que tiene una concentración de 3mg/L de N-NO_2^{-1} y como se observa en la tabla 56 el porcentaje de referencia obtenido de 103,7483 % que representa 3,1436 mg/L N-NO_2^{-1} y según el proveedor del material de referencia la lectura puede tener de 2.45 a 3.46 mg/L de N-NO_2^{-1} el cual se encuentra vigente, por lo

que la lectura obtenida durante los tres días es correcta y el método cumple con el requisito de exactitud.

4.7 Análisis de la incertidumbre

Para la incertidumbre del método se tomó en cuenta todas las incertidumbres que intervienen en la medición, tales como la incertidumbre de los balones utilizados, las micropipetas, el patrón primario, como se muestra en la tabla 57.

Además la incertidumbre por la preparación de la solución madre que se muestra en la tabla 58 y las incertidumbres obtenidas al final en la preparación de cada estándar que se observa en la tabla 59, en la tabla 60 se muestra el resultado de la incertidumbre para cada estándar donde se observa que el valor más alto de incertidumbre es para el estándar uno de 0.5 mg/L de NO_2^{-1} que tiene 16.96 % con un valor de k igual a dos que corresponde a un nivel de significancia del 95%, el SAE basado en la norma INEN 17025 menciona que para poder validar un método la incertidumbre tiene que ser menor al 30%, por lo que el método está cumpliendo con este requisito.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Se obtuvo un coeficiente de correlación lineal de 0.9966 mayor a 0.99 por lo que cumple con este requisito para ser validado.

El intervalo de trabajo del método es de 0.5 a 3.5 mg/L de NO_2^{-1} con la utilización de cinco puntos en la curva de calibración y el límite máximo permisible para nitrito es de 3 mg/L de NO_2^{-1} , es decir que el método es útil para determinar la concentración de nitritos dentro del rango adecuado.

La incertidumbre obtenida es menor al 30% para todos los estándares utilizados siendo el mayor de 16.96% para la concentración de 0.5 mg/L de NO_2^{-1} , estableciendo el cumplimiento de una requisito indispensable de validación.

La exactitud del método determinada es de 90 a 110 %.

La repetibilidad y reproducibilidad fue menor al 10% en todos los puntos de la curva.

Se pudo contrarrestar la influencia del cloro en la medición de nitritos logrando obtener porcentajes de recuperación dentro de lo aceptable, por lo que se confirma que no existen interferencias en la medición de nitritos en agua potable y superficial.

El límite de cuantificación del método es de 0.5 mg/L de NO_2^{-1} que representa al punto más bajo en la curva.

Se cumplió con todos los parámetros de validación establecidos por el servicio de acreditación ecuatoriana bajo la norma ISO 17025.

Se logró implementar el método de determinación de nitritos por espectrofotometría de luz visible para agua superficial y potable, debido a que se pudo validar con los datos obtenidos durante el desarrollo de la validación en el L3C.

La determinación de nitritos es indispensable para el L3C ya que una concentración alta del mismo es perjudicial para la salud especialmente para los niños menores de seis meses de edad, por lo que este analito se encuentra en la NTE-INEN 1108 y en la OMS.

CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES

Cuando se utilice el método se deberá realizar una lectura de un estándar de 1.5 mg/L de NO_2^{-1} , para asegurar la veracidad de los resultados.

En lecturas que sobrepasen las 30 muestras se deberá leer el estándar antes y después de leer las muestras.

El reactivo de color que se utiliza se debe almacenar en frasco ambar y en refrigeración y tendrá una duración de seis meses, tiempo en el cual se deberá preparar un nuevo reactivo y se necesitara la lectura de un material de referencia para asegurar que no existen cambios en las lecturas por el reactivo.

Colocar tres gotas de tiosulfato de sodio al 3% en el frasco que se recogerá la muestra para nitritos para corregir la interferencia provocada por el cloro.

Devolver el reactivo de color al refrigerador rápidamente después de agregarlo a la muestra para evitar el daño del mismo.

Filtrar las muestras que lo necesiten, de ser el caso, especialmente en aguas superficiales con un filtro de $0.45\mu\text{m}$.

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

Badiadka, Narayana. Kenchaiah, Sunil. (2009). *A Spectrophotometric Method for the Determination of Nitrite and Nitrate*. Department of P.G. Studies and Research in Chemistry. India: Editorial Mangalore University.

Barbara, R. Kozub, Neil. Rees, Richard. (2010). *Compton Electrochemical determination of nitrite at a bare glassy carbon electrode; why chemically modify electrodes?*. Recuperado el 10 de abril de 2017 de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400509007680>.

Cabrerizo, Dulce María. Antón, Juan Luis. Pérez, Javier, (2008). *Física y Química 4 ESO*. España: Editorial EDITEX.

Caparrós, Francisco. (2014). *TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS IN-SITU*. España: Editorial Innovación y Cualificación S.L.

Cardenas, Ruben. (2011). *Metrología e Instrumentación*. España: Editorial GRIN Verlag.

Carmelo, Marcén.Gil, Daniel. Monguilot, Isabel. Viera, Ana. Pedrinaci Emilio. Rodríguez, Amparo. Vilches, Pedro. Conde, Olga. Campos, María. González, Meyauí. Fernández, Mateu. Pérez, Gago. Mariné, Conill. Grau, Cotilla. Gavidia, Catalán. (2012). *AGUA Y SOSTENIBILIDAD: RECURSOS, RIESGOS Y REMEDIOS*, España: Ministerio de Educación.

Chaperón, Claudio. (2014). *Agua potable en Capital y Gran Buenos Aires*. Argentina: Editorial dunken.

Claramunt, Rosa. Cornago, Pilar. Farrán, Angeles. Pérez, Marta. Sanz Del Castillo, Dionisia. (2013). *PRINCIPALES COMPUESTOS QUÍMICOS*. España: Editorial UNED.

Clavijo, Alfonso. (2002). *Fundamentos de Química Analítica: equilibrio iónico y Análisis Químico*. Colombia: Editorial Universidad Nacional de Colombia.

Clesceri, Lenore. Greenberg, Arnold. Eaton, Andrew. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington D.C. – Estados Unidos: American Public Health Association.

Contreras, Alfonso. Molero, Meneses. (2012). *CIENCIA Y TECNOLOGÍA DEL MEDIOAMBIENTE*. España: Editorial UNED.

Darner, Alvarado. (2009). *Agua*, Costa Rica: Editorial EUNED.

Escolástico, León. Soledad, Esteban. Lopez, Garcia. Dionisia, Sanz. (2013). *Bases químicas del medio ambiente*. Madrid España: Editorial UNED.

Fárez, Manuel. (2014). *Determinación de los nitritos y nitratos en las aguas del Río Jubones, Sector El Donque de la ciudad de Pasaje*. Recuperado el 10 de abril de 2017 de: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/943>.

Gallego, Alejandrina. Garcinuño, Rosa. Morcillo, José. (2013). *EXPERIMENTACIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA*. España: Editorial UNED.

Grande, José Antonio. (2017). *Contaminación De Aguas Subterráneas En El Sector Costero Occidental De Huelva*. España: Universidad de Huelva.

Harris, Daniel. (2001). *Análisis Químico Cuantitativo*. Barcelona – España: editorial REVERTE.

He L. Zhang K. Wang C. Luo X. Zhang S. (2011). *Effective indirect enrichment and determination of nitrite ion in water and biological samples using ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography*. Recuperado el 26 de abril de 2017 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21530978>.

Ioannis. Tsoufanidis, George. Tsogas, Dimosthenis. Giokas, Athanasios. Vlessidis. (2008). *Design of a field flow system for the on-line spectrophotometric determination of phosphate, nitrite and nitrate in natural water and wastewater*. Recuperado el 22 de marzo de 2017 de <http://link.springer.com/article/10.1007/s00604-007-0789-9>.

Morcillo, Gloria. Estrella, Rubio. García, Jose. (2013). *BIOTECNOLOGÍA Y ALIMENTACIÓN*. España: Editorial UNED.

Muñoz, Camacho. Grau, Ríos. (2013). *INGENIERÍA QUÍMICA*. Madrid España: Editorial UNED.

Nahid, Pourreza. Mohammad, Reza. Ali, Hatami. (2012). *Indirect cloud point extraction and spectrophotometric determination of nitrite in water and meat products*. Recuperado el 15 de abril de 2017 de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X12000859>.

Palraj, Kalimuthu. Abraham, John. (2009). *Highly sensitive and selective amperometric determination of nitrite using electropolymerized film of functionalized thiadiazole modified glassy carbon electrode* Recuperado el 10 de mayo de 2017 de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248109001313>.

Restrepo, Jaime. (2007). *Aseguramiento Metrológico Tomo I*. Colombia: Editorial ITM.

Román, Samaniego. (2016). *Determinación de la presencia de nitratos/nitritos y manganeso en el agua proveniente del pozo parador turístico que alimenta la zona baja del cantón Huaquillas y su efecto a la salud pública*. Guayaquil-Ecuador: Editorial Escuela Politécnica del Litoral.

Ruiz, Antonio. García, José Luis. Mesa, José Luis. (2010). *Error, Incertidumbre, Precisión Y Exactitud, Términos Asociados A La Calidad Espacial Del Dato Geográfico*. Recuperado el 05 de marzo de 2017 de:

http://coello.ujaen.es/congresos/cicum/ponencias/Cicum2010.2.02_Ruiz_y_otros_Error_incertidumbre_precision.pdf

Samir, Moussa Moustafa.(2004). *Nitrification in Saline Industrial Wastewater*. Alemania: Editorial Taylor y Francis Group.

Sarriá, Antonio. Villar, Fernando. (2014). *PROMOCIÓN DE LA SALUD EN LA COMUNIDAD*. España: Editorial UNED.

Sastry KV1. Moudgal, Mohan. Tyagi, Rao. (2017). Spectrophotometric Determination of Serum Nitrite and Nitrate by Copper–Cadmium Alloy. Recuperado el 12 de abril de 2017 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069417>

Servicio de acreditación ecuatoriana. (2015). *Acreditación De Laboratorios De Ensayo Y Calibración Según NTE INEN-ISO/IEC 17025:2006*. recuperado el 02 de abril de 2017 de: <http://www.acreditacion.gob.ec/wp-content/uploads/2017/04/14.-CR-GA01-R01-Criterios-Generales-Acreditacion.pdf>

Taveira, Torres. González Luis. (2012). *Tributos, aguas e infraestructuras*. España: Editorial Atelier.

Teijón, José María. (2006). *Fundamentos de Bioquímica Estructural*. España: Editorial Tebar.