

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE  
NITRITOS EN AGUA NATURAL Y POTABLE, POR ESPECTROFOTOMETRÍA  
VISIBLE EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL  
DEL CENTRO DE COMERCIO, INDUSTRIA Y TURISMO DEL SENA, REGIONAL  
CÓRDOBA.**

**JOSE SEBASTIAN SOCARRAS GALINDO**

**FRANCISCO MANUEL PRETELT VEGA**

**Director**

**CARLOS BURGOS GALEANO, M.Sc.**

**Codirector**

**BASILIO DÍAZ PONGUTÁ, M.Sc**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS**

**PROGRAMA DE QUÍMICA**

**MONTERÍA – CÓRDOBA**

**2020**

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE  
NITRITOS EN AGUA NATURAL Y POTABLE, POR ESPECTROFOTOMETRÍA  
VISIBLE EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL  
DEL CENTRO DE COMERCIO, INDUSTRIA Y TURISMO DEL SENA, REGIONAL  
CÓRDOBA.**



**JOSE SEBASTIAN SOCARRAS GALINDO**

**FRANCISCO MANUEL PRETELT VEGA**

Informe final de trabajo de grado como requisito para obtener el título de Químico

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**PROGRAMA DE QUÍMICA**  
**MONTERÍA – CÓRDOBA**

**2020**

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo investigativo lo dedicamos principalmente a Dios, por ser el inspirador y darnos fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A nuestros padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos.

Es un orgullo y un privilegio ser sus hijos, son los mejores padres

A nuestros hermanos y amigos por estar siempre presentes, acompañándonos y por el apoyo moral, que nos brindaron a lo largo de esta etapa de nuestras vidas.

A la Universidad de Córdoba, por habernos brindado tantas oportunidades y enriquecernos en conocimiento.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a Dios por ser nuestro guía y acompañante en el transcurso de mi vida, brindándonos paciencia y sabiduría para culminar con éxito nuestras metas propuestas.

A nuestros padres por ser el pilar fundamental y habernos apoyado incondicionalmente, pese a las adversidades e inconvenientes que se presentaron.

Agradecemos a nuestro director de tesis M.Sc. Basilio Díaz Pongutá quien con su experiencia, conocimiento y motivación nos orientó en la investigación y agradecemos a los todos docentes que, con su sabiduría, conocimiento y apoyo, nos motivaron a alcanzar nuestra meta como persona y profesional en la Universidad de Córdoba.

A nuestros amigos más cercanos por su amistad y compartir grandes y bellos momentos a nuestro lado, por su apoyo incondicional a cada uno de ellos en los momentos más difíciles.

## NOTA DE ACEPTACION

El trabajo de grado titulado **‘VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS EN AGUA NATURAL Y POTABLE, POR ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y CALIDAD AMBIENTAL DEL CENTRO DE COMERCIO, INDUSTRIA Y TURISMO DEL SENA, REGIONAL CÓRDOBA’** realizado por los estudiantes FRANCISCO MANUEL PRETELT VEGA Y JOSE SEBASTIAN SOCARRAS GALINDO, cumple con los requisitos exigidos por la facultad de Ciencias Básicas para optar por el título de Químico ha sido aprobada.

---

Carlos Burgos Galeano, M.Sc.  
Director

---

Amira Cecilia Padilla Jimenez Ph.D.  
Jurado

---

Iván D. Urango Cárdenas M.Sc.  
Jurado

**ABREVIATURAS Y ACRONIMOS**

<b>ABS</b>	Absorbancia
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>AOAC</b>	Asociación Oficial de Química Analítica
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>IDEAM</b>	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales
<b>ISO</b>	Organización internacional para la estandarización
<b>L</b>	Litro
<b>LC</b>	Límite de cuantificación
<b>LCM</b>	Límite de cuantificación del método
<b>LDM</b>	Límite de detección del método
<b>LDI</b>	Límite de detección instrumental
<b>mg</b>	miligramo
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Ion nitrito
<b>r</b>	Coefficiente de correlación
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>S</b>	Desviación Estándar
<b>SA</b>	Sulfanilamida
<b>%E</b>	Porcentaje de error
<b>%R</b>	Porcentaje de recuperación
<b>VIS</b>	Visible
<b>nm</b>	nanómetro
<b>λ</b>	Longitud de onda

**TABLA DE CONTENIDO**

1. PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	12
1.1 HIPOTESIS.....	12
2. OBJETIVOS .....	13
2.1 Objetivo general.....	13
2.2 Objetivo específicos.....	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	14
3.1 Antecedentes .....	14
4. JUSTIFICACIÓN .....	15
5. MARCO TERICO .....	17
5.1 Contaminación del agua.....	17
5.2 Ciclo del nitrógeno.....	17
5.2.1 Nitritos .....	18
5.3 Técnicas para la determinación de nitritos.....	20
5.4 Espectrofotometría de UV-VIS.....	21
5.4.1 Ley de Lambert-Beer .....	22
5.5 Normatividad .....	22
5.6 Principio del método .....	23
5.6.1 Principio del método para la determinación de nitritos: .....	23
5.7 Validación de un método analítico .....	23
5.8 Parámetros de validación .....	24
5.8.1 Intervalo de trabajo y linealidad .....	24
5.8.2 Linealidad .....	25
5.8.3 Límite de detección (LD).....	25

5.8.4 Exactitud .....	26
5.8.5 Precisión.....	27
5.9 Incertidumbre.....	28
6. Metodología .....	29
6.1 Materiales.....	29
6.2 Equipos .....	30
6.3 Reactivos.....	30
6.4 Estandarización del método .....	30
6.5 Preparación de reactivos .....	30
6.6 Determinación del nitrito .....	31
6.8 PARAMETROS DE DESEMPEÑO .....	31
6.8.1 Intervalo de trabajo y linealidad .....	31
6.8.2 Intervalo lineal .....	32
6.8.3 Límite de detección.....	32
6.8.4 Límite de cuantificación .....	33
6.8.5 Exactitud .....	33
6.8.6 Porcentaje de recuperación .....	33
6.8.7 Precisión.....	33
6.8.8 Incertidumbre.....	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
7.1 Rechazo de datos anómalos .....	36
7.2 Validación de nitritos .....	37
7.2.1 Linealidad e intervalo lineal.....	37
7.2.2 LIMITE DE CUANTIFICACION DEL METODO (LCM) .....	40
7.2.3 Limite detección del método (LDM) .....	41

7.2.4 Limite detección instrumental (LDI) .....	42
7.2.5 Precisión.....	43
8. Conclusiones .....	47
9. Recomendaciones .....	48
10. Bibliografía .....	49
11. Anexo.....	52
11.1 Anexo A. intervalo lineal, $\text{NO}_2^-$ .....	52
11.2 Anexo B. Limite cuantificación de $\text{NO}_2^-$ .....	53
11.3 Anexo C. Precisión $\text{NO}_2^-$ .....	53
11.4 Anexo D. Exactitud.....	55

## TABLAS

Tabla 1. Longitudes de onda región visible .....	21
Tabla 2. Valores permisibles de nitratos y nitritos .....	23
Tabla 3. Recorridos de luz para concentraciones de $\text{NO}_2^-$ .....	31
Tabla 4. Tabla de rechazó de datos para la validación de $\text{NO}_2^-$ .....	36
Tabla 5. Concentración vs absorbancia para $\text{NO}_2^-$ .....	37
Tabla 6. Análisis de varianza y t student, para curva de calibrado de $\text{NO}_2^-$ .....	40
Tabla 7. Límite de cuantificación para el $\text{NO}_2^-$ .....	40
Tabla 8. Límite de cuantificación $\text{NO}_2^-$ .....	41
Tabla 9. Límite de detección del método .....	41
Tabla 10. Límite de detección instrumental .....	42
Tabla 11. Reproducibilidad para los estándares $\text{NO}_2^-$ .....	43
Tabla 12. Repetibilidad para los estándares $\text{NO}_2^-$ .....	43
Tabla 13. Porcentaje de error $\text{NO}_2^-$ .....	45
Tabla 14. Test de Cochran para % error de $\text{NO}_2$ .....	45
Tabla 15. Porcentaje de recuperación de $\text{NO}_2^-$ , muestra de agua potable .....	45
Tabla 16. Porcentaje de recuperación de $\text{NO}_2^-$ , muestra de agua natural .....	46
Tabla 17. Test de Cochran para % de recuperación de $\text{NO}_2$ agua potable .....	46
Tabla 18. Test de Cochran para % de recuperación de $\text{NO}_2$ agua natural .....	46

**FIGURAS**

Figura 1. Mecanismo de reacción de nitrito empleado en el método colorimétrico.....	14
Figura 2. Ciclo del nitrógeno. ....	18
Figura 3. Procedimientos de análisis de Nitritos .....	31
Figura 4. Fuentes de incertidumbre involucradas en el método de medición nitritos. ....	35
Figura 5. Grafica de concentración de $\text{NO}_2^-$ Vs absorbancia. $\lambda=543$ nm .....	38
Figura 6. Curva de calibrado para $\text{NO}_2^-$ $\lambda=543$ nm. ....	38
Figura 7. Gráfico de residuos Vs absorbancia. ....	39

## RESUMEN

En el siguiente trabajo se tuvo como objetivo principal la validación de una metodología analítica para la determinación de nitrito en muestras de agua potable y natural, mediante espectrometría visibles en el Laboratorio de Investigación y Calidad Ambiental – LICAM del Centro de Comercio, Industria y Turismo del SENA Regional Córdoba.

Fue necesario realizar la validación de este procedimiento analítico para demostrar que es apto para su propósito; y así el Laboratorio de Investigación y Calidad Ambiental – LICAM del Centro de Comercio, Industria y Turismo del SENA Regional Córdoba pueda acreditar esta metodología, para que en futuros trabajos estos tengan validez al momento de ser publicados y así generarle al laboratorio reconocimiento a nivel científico, y ser un prestador de servicio a nivel departamental con un alto nivel de credibilidad.

Para la determinación de dichos analitos, fueron evaluados los parámetros de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, precisión e incertidumbre. El intervalo lineal obtenido para la determinación de nitrito fue de 0.027-2 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L, el límite de cuantificación del método fue de 0.027 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L, los resultados obtenidos mostraron que la exactitud de la metodología evaluada es satisfactoria, teniendo en cuenta que los porcentajes de error para ambos métodos no superaron el 10 %; asimismo, se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 104 y 111% para las muestras de agua potable y natural respectivamente en la determinación de nitritos resultados que se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la AOAC, para el nivel de concentración estudiado. La precisión, evaluada como repetibilidad y precisión intermedia, fue buena, los porcentajes de coeficiente de variación calculados fueron inferiores al 5 % para ambas metodologías. Los valores determinados para los parámetros de desempeño exactitud y precisión se encuentran dentro de los rangos establecidos en el Procedimiento de Control de Calidad Analítica LICAM-PTA-001 del laboratorio.

**Palabras claves:** nitrito, parámetros, coeficiente, validación, porcentajes, precisión.

## **1. PREGUNTA DE INVESTIGACION**

¿Las condiciones existentes en el laboratorio de calidad ambiental del Sena regional Córdoba, son las apropiadas para la validación e implementación de un método analítico, para determinar nitrito a través de una técnica de espectrofotometría visible, con el propósito de la acreditación este parámetro?

### **1.1 HIPOTESIS**

Ha: Existen las condiciones necesarias en el laboratorio de investigación de calidad ambiental del Sena regional Córdoba, para montar validar e implementar los métodos que brinden resultados confiables para la determinación de nitratos y nitritos en las muestras de agua residual, potable y natural.

Ho: No existen las condiciones necesarias en el laboratorio de investigación de calidad ambiental del Sena regional Córdoba, para montar validar e implementar los métodos que brinden resultados confiables para la determinación de nitratos y nitritos en las muestras de agua residual, potable y natural.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

- Validar e implementar una metodología para la determinación de nitritos, en muestras de agua natural y potable mediante espectrometría VIS en el Laboratorio de Investigación y Calidad Ambiental centro de Comercio, Industria y turismo Sena Regional- Córdoba, con el propósito de acreditar este parámetro.

### 2.2 Objetivo específicos

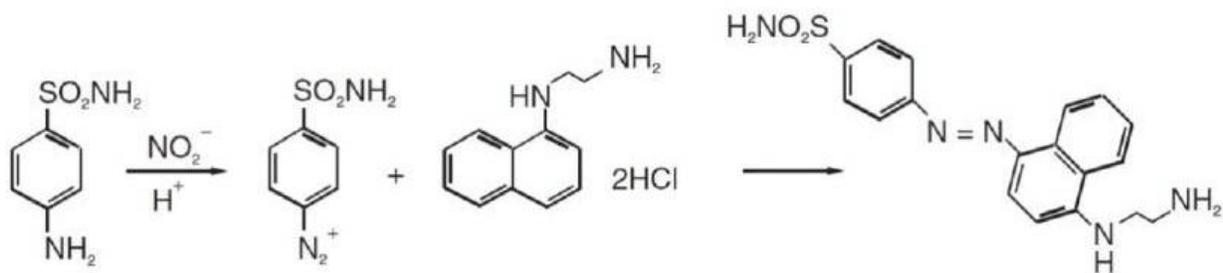
- Presentar un plan de validación, adaptado a los parámetros del laboratorio de investigación y calidad ambiental del SENA regional Córdoba, bajo la norma NTC:ISO/IEC 17025:2017.
- Determinar los atributos de calidad: linealidad e intervalo de trabajo, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud, e incertidumbre; Para los métodos del Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 2017.; 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> B NITROGENO (NITRITO)
- Implementar la aplicación de las metodologías validadas en el análisis de muestras de agua potable y natural.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el laboratorio de investigación y calidad ambiental del centro de Comercio, Industria y Turismo Sena regional Córdoba, se llevará a cabo la validación de nitratos y nitritos mediante espectrofotometría UV-VIS en diferentes matrices de agua, potable y natural. Basándonos en una técnica normalizada, de esta manera contribuir con el sistema de gestión de la calidad del laboratorio y estar bajo los lineamientos de la norma NTC-ISO/IEC 17025 y validar la metodología, con el objetivo de que se acredite esta metodología y así aumentar la oferta de servicios en parámetros de una matriz ambiental, y confirmar que el procedimiento analítico para esta prueba es adecuado para otros usos en dicho laboratorio, de esta manera contribuir con el desarrollo de investigación del laboratorio, y su posterior contribución con la gestión de la calidad.

#### 3.1 Antecedentes

Griess desarrollo un método que permitió la determinación de nitritos en diferentes matrices, esta reacción involucra la formación de un cromóforo mediante la diazoación de la sulfanilamida con ácido nitroso, seguido de una copulación con una amina bicíclica, en la cual el nitrito reacciona con la sulfanilamida en medio ácido. El diazo compuesto formado reacciona con el clorhidrato de N-naftiletilendiamina (NED), generando un compuesto de coloración roja intensa. Una de las desventajas que presenta la reacción de Griess es que se lleva a cabo la formación de colorantes de tipo azoico, los cuales tienen un alto grado de toxicidad. (Araceli Castañeda Ovando, 2008)



Fuente: (Tenorio L., del Valle M, & Pastelín H., 2005)

**Figura 1.** Mecanismo de reacción de nitrito empleado en el método colorimétrico.

En 2014 el departamento de estudios de pregrado del programa de Química de la Universidad de Córdoba desarrolló un método de validación para la determinación de nitritos en agua potable mediante la técnica espectrofotométrica utilizando el método colorimétrico. Dicho procedimiento

se obtuvo un rango de linealidad 0.01-0.3 mg/L, en cuanto al límite de cuantificación y detección del método los resultados mostraron mínimas concentraciones detectables de 0.007 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L y cuantificables a partir de 0.01 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L [Sibaja, 2014]

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Validar un método analítico se hace con el fin de demostrar que la aplicación método nos genera datos veraces y confiable, esto con el fin de brindar confianza al entregar resultados, para esto las validaciones de métodos debe cumplir con parámetros como son la incertidumbre, precisión, exactitud, sensibilidad, robustez y selectividad [Eurachem, 2016].

El tener un método validado para un laboratorio demuestra la capacidad con la que cuenta dicho laboratorio para la prestación de servicios, al igual para cumplir con estándares de calidad y cumplir con la ISO/IEC 17025, norma encargada de la acreditación de los laboratorios, buscando calidad en los análisis a realizar en la investigación. La validación se convierte, en un componente esencial de las medidas que un laboratorio debe implementar para producir datos analíticos confiables.

En el ambiente los nitritos se transforman generalmente en nitratos, lo que lleva a que en aguas subterráneas no se encuentre presencia de estos. Estos iones hacen parte del ambiente formando parte del ciclo del nitrógeno. El nitrato es la forma estable de las estructuras oxidadas del nitrógeno, y a pesar de su baja reactividad química puede ser reducido por acción microbológica. El nitrito, es oxidado con facilidad por procesos químicos o biológicos a nitrato, o bien reducido originando diversos compuestos.

Los compuestos nitrogenados presentes en las aguas naturales están íntimamente relacionados con el ciclo del nitrógeno. La mayor parte del nitrógeno aparece en forma gaseosa en la atmósfera (78 % en volumen), en forma oxidada constituye una relativamente importante fracción en los suelos y sustancias orgánicas (tejidos de animales o vegetales que lo extraen de la atmósfera para su metabolismo). En las rocas, sin embargo, solo se presenta como elemento minoritario. El nitrógeno puede aparecer en forma de NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> y por oxidación, estas formas reducidas pueden transformarse en NO<sub>2</sub> y finalmente en NO<sub>3</sub> que es la forma más usual y estable [Miguel-Fernández y Vazquez-Taset 2006].

Debido a su solubilidad los nitratos y nitritos pueden llegar muy fácil a las fuentes de agua (ríos, represas, entre otros), el tener un aumento de concentración de estos compuestos, trae consigo contaminación y esta puede ser provocada por dos tipos de fuentes, puntual y difusas. Las fuentes puntuales son residuos y vertimiento de uso agrícola, vertimientos industriales, vertimiento de aguas residuales urbanas. Mientras que la otra fuente, la dispersa s puede dar por procesos de escorrentía e infiltración en campos de cultivo, en praderas y bosques quemados y emisiones a la atmosfera provenientes del uso de combustibles fósiles y fertilizantes, y su posterior deposición atmosférica sobre aguas superficiales [Camargo y Alonso, 2006].

Las principales rutas de ingreso de nitrógeno a las masas de agua son a través de aguas residuales industriales o municipales, por tanques sépticos o descargas de corrales ganaderos, residuos animales (incluyendo aves y peces) y también por las descargas de la emisión de gases de vehículos [R. Calderón, 2004].

La contaminación y el aumento de la concentración por estos compuestos puede traer complicaciones para la salud, el consumo de alimentos, o agua con una alta concentración de nitratos y nitritos puede llevar al padecimiento de la enfermedad llamada metahemoglobinemia. En la metahemoglobinemia, la presencia de metahemoglobina en sangre está aumentada. La metahemoglobina es una forma de hemoglobina que contiene hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), cuya capacidad de transportar oxígeno es menor que la de la hemoglobina ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), lo que se traduce en una menor llegada de oxígeno a los tejidos. Cuando la concentración de metahemoglobina en sangre alcanza cifras cercanas a un 3%, se produce una cianosis, que es la principal característica de este desorden [Basulto, J., Manera, M., & Baladia, E. 2014].

Este trabajo se realizara con el fin de validar una metodología para la determinación de nitritos, donde se presentara un plan de validación para que sea acreditado en el laboratorio de investigación y calidad ambiental del centro de Comercio, Industria y Turismo Sena regional Córdoba el cual cumplirá con todos los parámetros establecidos en el proceso de validación bajo la norma NTC:ISO/IEC 17025:2017, y esta metodología será aplicada para muestras de agua natural y potable.

## 5. MARCO TERICO

### 5.1 Contaminación del agua

El agua es un recurso natural escaso, el cual es indispensable para el desarrollo de la vida en el planeta, El 97.2% del agua en el planeta Tierra es salina y solo el 2.5% corresponde a agua fresca; de ese 2.5%, 30% es subterránea, 68% está en los glaciares y otras capas de nieve y solo el 1.2% es superficial y se encuentra en ríos, lagos y otras formas de agua de superficie. Por consecuencia del desarrollo humano, económico e industrial ha traído consigo un uso inadecuado, el cual ha traído un deterioro durante décadas [Gómez-Duarte. 2018]

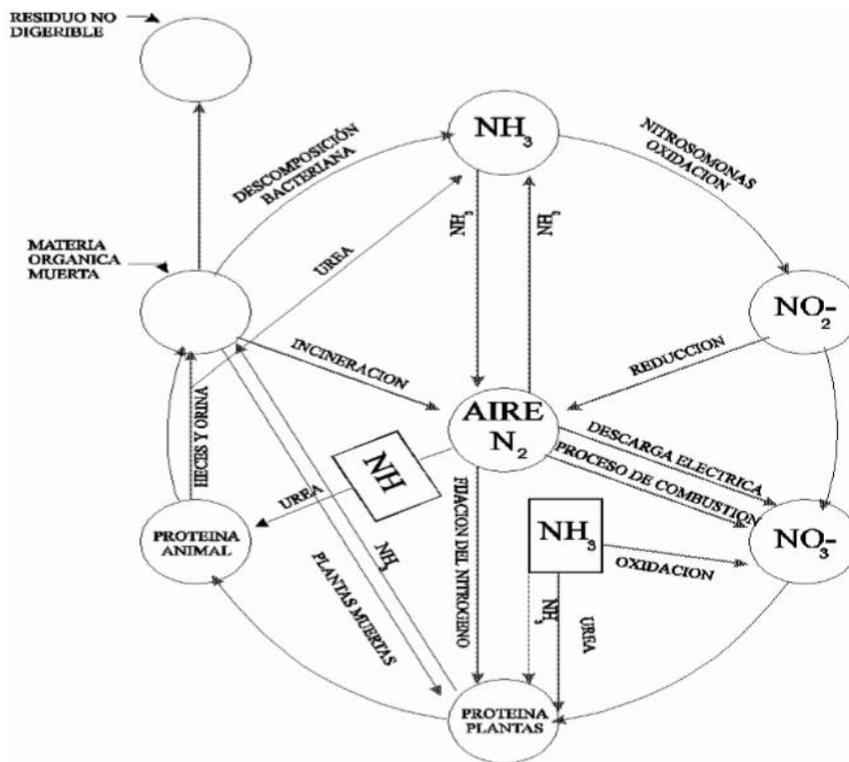
Los contaminantes de agua fresca incluyen, por un lado, microorganismos bacterianos, virales, fúngicos y parasitarios y, por el otro, sustancias químicas simples o complejas. Dentro de las sustancias químicas que más riesgo pueden causar a la salud de la población están los metales pesados, las sustancias radiactivas, los insecticidas, los fertilizantes, los derivados del petróleo, los residuos tóxicos industriales, los jabones, las drogas lícitas e ilícitas, entre otras. Los agentes contaminantes de ríos, lagos y otros recursos naturales tienen su origen principal en las actividades antropogénicas y la vulnerabilidad del suelo para pequeñas y grandes áreas urbanas [Gómez-Duarte. 2018]

### 5.2 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno es un componente esencial de la vida, es componente de las proteínas, material genético, clorofila entre otras moléculas orgánicas. Todos los organismos necesitan del nitrógeno para vivir. Es el cuarto elemento más abundante de los tejidos vivos.

El 78% de la atmosfera terrestre está constituido por nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ), de esta manera una parte de animales y plantas no lo pueden aprovechar, por lo que la mayoría de los animales y microorganismos esperan a que sean fijados por plantas fijadoras de nitrógeno las cuales lo llevan a una forma de nitrógeno inorgánico utilizable ya sea en forma de amoníaco ( $NH_3$ ) nitrato ( $NO_3^-$ ).

En el ciclo del nitrógeno se dan reacciones de descomposición de materia orgánica, de nitrificación, y desnitrificación realizadas por bacterias, y la mayoría de las reacciones son oxido reducción. (Julia Pacheco Avila, 2002)



Fuente: Sawyer y McCarty, 1978.

Fuente: Sawyer y McCarty, 1978.

**Figura 2.** Ciclo del nitrógeno.

### 5.2.1 Nitritos

Este compuesto soluble, formado químicamente por átomos de nitrógeno y oxígeno, el nitrito es un anión que tiene un peso molecular de 47,007 g/mol, mientras que el nitrato tiene un peso molecular de 62,007 g/mol. Están presentes en el ciclo del nitrógeno, los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) son menos estables que los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) es la forma termodinámica más estable en los sistemas acuosos, estos compuestos tienen baja reactividad química. En el ambiente los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) generalmente se transforman rápidamente en nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), por eso la poca presencia de nitritos en agua subterráneas, además por su buena solubilidad en el agua y las actividades humanas hacen que los nitratos y nitritos puedan alcanzar concentraciones importantes en ríos y lechos marinos [Bolaños-Alfaro et al., 2017]

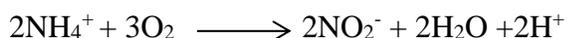
Los nitritos son compuestos contaminantes del agua, el cual tienen presencia en el ciclo del nitrógeno, su presencia está dada por el proceso de nitrificación o desnitrificación, la cual es realizada por bacterias, estas bacterias pertenecientes a la familia *Nitrobacteriaceae*.

Las fuentes ambientales más importantes son el uso de fertilizantes nitrogenados, la disposición de desechos municipales e industriales. Aunque el nitrito es el compuesto tóxico debido a que se forma a partir de los nitratos, un factor dominante en la incidencia de la toxicidad es la concentración de nitratos y nitritos en el agua, su primera acción es la oxidación de ion ferroso a ion férrico, lo que puede causar la enfermedad de metahemoglobinemia.

### 5.2.1.1 Nitrificación

En este proceso de transformación de amoníaco, nitrito y posteriormente a nitrato es realizado en el ciclo del nitrógeno. El proceso de nitrificación biológica ocurre en dos etapas: en una primera etapa el amonio es oxidado a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) por las bacterias del género *Nitrosomonas* y *Nitrosococcus*; en una segunda etapa, el nitrito es convertido a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) por las bacterias oxidantes del nitrito, del género *Nitrobacter* y *Nitrospira* [Olga de J Omelas et al 2012].

En el proceso de nitrificación se llevan a cabo dos reacciones, la primera por la bacteria del género *nitrosomonas* y la segunda por bacterias del género *Nitrobacter*.



El amonio es obtenido del N orgánico que es proporcionado por la materia orgánica del suelo (M.O). Este proceso se logra a pH altos ya que pueda contrarrestar la baja en el pH provocado por la formación de nitritos y nitratos.

### 5.2.1.2 Desnitrificación

La desnitrificación, es el proceso contrario a la nitrificación porque en este se da uso a los nitratos y nitritos como sustratos para que se dé la producción de  $\text{N}_2$



La desnitrificación es una forma alternativa de respiración en condiciones limitantes de oxígeno por la que los microorganismos reducen de forma secuencial el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y/o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) a  $\text{N}_2$ . [David Correa, 2016].

### 5.3 Técnicas para la determinación de nitritos

Para la determinación de nitratos y nitritos existen muchos métodos para su cuantificación, pueden ser métodos de espectrometría ultravioleta-visible (UV/VIS), electroquímicos, cromatográficos y enzimáticos entre otros.

La determinación del nitrato ( $\text{NO}_2^-$ ) es compleja, debido a:

- La alta probabilidad de que se hallen sustancias interferentes.
- Los rangos limitados de concentración de las diferentes técnicas.
- Los procedimientos relativamente complejos que se precisan.

Existen básicamente 3 métodos para analizar nitritos:

#### 1. Método espectrofotométrico ultravioleta selectivo

Esta técnica solamente se utiliza para seleccionar muestras con bajo contenido en materia orgánica (aguas naturales incontaminadas y suministros de agua potable).

Las medidas de absorbancia UV a 220 nm permiten la determinación de nitratos que son absorbentes a esta longitud de onda. Debido a que las materias orgánicas también pueden absorber a esta longitud de onda debemos hacer una segunda lectura a 275 nm para obtener la medida relativa sólo a nitratos.

#### 2. Método del electrodo de nitrato

El electrodo del ion  $\text{NO}_3^-$  es un sensor selectivo que desarrolla un potencial a través de una membrana delgada, porosa e inerte que se mantiene en posición en un intercambiador iónico en un líquido inmiscible con agua.

El electrodo responde a la actividad del ion nitrato entre aproximadamente  $10^{-5}$  y  $10^{-1}$  M. El límite inferior de detección está determinado por la solubilidad escasa pero finita del cambiador iónico líquido.

Los iones cloruro y carbonato interfieren cuando su proporción en peso frente a  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  es  $> a 10$  o  $> a 5$  respectivamente. Los iones potencialmente interferentes, pero que no se encuentran en

niveles significativos en las aguas potables son: el  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{S}_2^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{ClO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ . Aunque los electrodos funcionan satisfactoriamente con tampones pH3. Se han observado respuestas erráticas cuando el pH no se mantiene constante. Ese problema se reduce al mínimo utilizando una solución tampón que contenga sulfato de plata para eliminar cloruros, bromuros, yoduros, sulfuros y cianuros, ácido sulfámico para eliminar nitritos, un tampón a pH3 para eliminar  $\text{HCO}_3^-$  y manténganse el pH y la fuerza iónica constante y  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  para acomplejar ácidos orgánicos.

#### 5.4 Espectrofotometría de UV-VIS

La región UV se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm. Es una región de energía muy alta. Provoca daño al ojo humano así como quemadura común. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores como pH, concentración de sal y el disolvente- que alteran la carga de las moléculas, provocan desplazamientos de los espectros UV. La fuente de radiación ultravioleta es una lámpara de deuterio.

En la región visible apreciamos el color visible de una solución y que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite. Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada. La fuente de radiación visible suele ser una lámpara de tungsteno y no proporciona suficiente energía por debajo de 320 nm [Abril Diaz, et al, 2014].

**Tabla 1.** Longitudes de onda región visible

Longitud de onda aproximada (nm)	Color de luz que se absorbe	Color de luz que se ve reflejada o se ve
390 – 435 (nm)	Violeta	Amarillo verdoso
435 - 490 (nm)	Azul	Amarillo
490 – 580 (nm)	Verde	Rojo
580 – 595 (nm)	Amarillo	Azul
595 – 650 (nm)	Naranja	Azul verdoso
650 -780 (nm)	Rojo	Verde azulado

Fuente: [Magnaplus, s.f.]

### 5.4.1 Ley de Lambert-Beer

La base de la espectrometría de UV-Vis y su uso en el análisis cuantitativo están dados por la relación conocida como ley de Lambert Beer, que establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de analito en esa solución. Por lo tanto, puede emplearse para determinar la concentración de un compuesto en una solución. La longitud de onda  $\lambda$  de absorción de la luz es específica de cada cromóforo.

Cuando una luz de radiación UV-Vis atraviesa una solución que contiene un analito absorbente, la intensidad (I), que atraviesa la muestra es menor que la del haz incidente ( $I_0$ ). La fracción de radiación que ha traspasado la muestra se denomina transmitancia ( $T = I/I_0$ ). La transmitancia T está relacionada con la absorbancia (A) de acuerdo a la siguiente expresión:

$$A = -\log T = -\log(I/I_0)$$

Por aspectos prácticos, para las mediciones se usa la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia (T), debido a que, de acuerdo a la ley de Lambert –Beer, A está linealmente relacionada con la concentración del analito absorbente a una determinada longitud de onda:

$$A = -\log_{10} (I/I_0) = \epsilon cl$$

Donde:

A: absorbancia medida.

I: intensidad de la luz transmitida.

$I_0$ : intensidad de la luz incidente.

$\epsilon$ : coeficiente de absorción molar, característico de cada sustancia absorbente a cada longitud de onda.

l: longitud del camino óptico (distancia que atraviesa la luz dentro de la muestra).

C: concentración de la sustancia absorbente (mol/L).

### 5.5 Normatividad

En Colombia la normatividad estipulada para regular la calidad del agua está regida por la resolución 2115 del 2007 en la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias

del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano.[Ministerio de Vivienda Ciudad y Desarrollo Territorial, 2007]

Artículo 6º.- Características químicas de sustancias que tienen implicaciones sobre la salud humana. Las características químicas del agua para consumo humano en relación con los elementos, compuestos químicos y mezclas de compuestos químicos que tienen implicaciones sobre la salud humana se señalan en el siguiente cuadro:

**Tabla 2.** Valores permisibles de nitratos y nitritos

Elementos y compuestos químicos que tienen implicaciones de tipo económico	Expresada como	Valor máximo aceptable (mg/L)
Nitratos	$\text{NO}_3^-$	10
Nitritos	$\text{NO}_2^-$	0.1

Fuente: .[Ministerio de Vivienda Ciudad y Desarrollo Territorial, 2007]

## 5.6 Principio del método

**5.6.1 Principio del método para la determinación de nitritos:** el nitrito ( $\text{NO}_2$ ) se determina por la formación de un colorante purpura rojizo, producido a pH 2.0 a 2.5 por acoplamiento de sulfanilamida diazotizada con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (diclorhidrato de NED). El rango de aplicación del método para medidas espectrofotométricas es de 10 a 1000  $\mu\text{g}$  de  $\text{NO}_2$  –N/1, y se puede aplicar al de 5 a 50  $\mu\text{g}$  de N/1 si se usan un recorrido de luz de 5 cm y filtro de color verde. El sistema de calor obedece a la ley de Beer hasta 180  $\mu\text{g}$  N/1 con 1 cm de recorrido de luz a 543 nm. Diluyendo las muestras se pueden determinar concentraciones más altas de  $\text{NO}_2$ .

## 5.7 Validación de un método analítico

La validación de un método es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista, conduciendo con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad establecidos. Por lo que cualquier método analítico antes de ser implementado debe ser validado haciendo uso de herramientas como la estadística [Eurachem 1998].

Obtención de pruebas con arreglo a las normas de correcta fabricación, de que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema produce en realidad el resultado previsto [Aguirre, Leticia, et al 2001].

Según la norma NTC; ISO/IEC 17025: 2017, los laboratorios deben validar todos los métodos que se utilicen, tanto los desarrollados por ellos mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas o desarrollados por otros laboratorios.

La validación de un método analítico, es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método, son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos [J. N. Miller and J. C. Miller., 2002]. En este sentido es importante que para el proceso de validación se asigne a un responsable de realizar dicha tarea. De manera que, la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable. Es importante que el laboratorio tenga claridad antes de iniciar la validación de cuáles son los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación.

## **5.8 Parámetros de validación**

### **5.8.1 Intervalo de trabajo y linealidad**

Es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación. El extremo superior del intervalo de trabajo está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica.

La evaluación del intervalo de trabajo se hace entre el límite de cuantificación y el extremo superior del intervalo de trabajo del instrumento, la respuesta de este sigue una relación conocida, por ejemplo, lineal, curvilínea. Durante la validación, es necesario:

- Confirmar esta relación
- Demostrar que el intervalo de trabajo del instrumento es compatible con el rango indicado en el alcance del método,
- Verificar que el procedimiento de calibración instrumental propuesto

- Para evaluar el intervalo de trabajo del instrumento y confirmar su aptitud para el uso, se deberían estudiar patrones de calibración con un alcance de concentración que sobrepase el rango de concentración esperado en  $\pm 10\%$  o incluso  $\pm 20\%$  y graficar las señales [Eurachem/CITAC., 2016].

### **5.8.2 Linealidad**

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra.

Con el fin de determinar el rango lineal se puede realizar mediante un gráfico de concentración versus respuesta, que se conoce como función respuesta. Esta se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de trabajos limpios de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo. En este sentido se recomienda abarcar valores desde cercano al cero y valores superiores al LMP o al valor de interés. El número de puntos a analizar deberá ser establecido por el analista.

Luego de realizar el grafico se puede observar el comportamiento de la curva y establecer cualitativamente el rango lineal. Después de establecer el comportamiento lineal del método se deberá realizar la Curva de trabajo o curva de calibración. Se grafican los datos de concentración de los estándares de calibración estimados (X) v/s la lectura observada (Y) [ . Boris, D, et al 2010].

### **5.8.3 Límite de detección (LD)**

Se considera como límite de detección a la concentración más baja del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones establecidas en la prueba. Los valores por encima del LD pueden ser atribuidos a la presencia del analito y los valores por debajo del LD son indicativos de la ausencia de analito en cantidades detectables.

#### **5.8.3.1 Límite de detección instrumental (LDI)**

Corresponde a la concentración mínima de un compuesto analizado que, sin la presencia de la matriz, un instrumento puede detectar con una fiabilidad definida y que es estadísticamente diferente de la respuesta correspondiente al ruido de fondo obtenido por el instrumento. El límite de detección se ha establecido como 1,645 veces el valor  $S_o$  es la desviación estándar de los análisis del blanco, estos son de la misma matriz de estudio, sin presencia del analito de interés, la cual se

someterá al mismo tratamiento de la muestra (mismas condiciones y adición de reactivo), reactivo este se expresa en mg/L.

### 5.8.3.2 Límite de detección del método (LDM)

Es la menor cantidad que puede ser determinada cuantitativamente con una incertidumbre asociada, para un dado nivel de confianza. Para el análisis cuantitativo debe quedar absolutamente claro que sólo se emplean valores atribuibles al analito. Para su determinación se utiliza la desviación estándar ( $S_o$ ) de los blancos. El cuál es la matriz de estudio, que tendría presente todos los reactivos a utilizar menos el analito de interés.

El límite de cuantificación es entre 3 y 10 veces el límite de detección según cada caso este viene descrito en la siguiente expresión:

$$\text{LDM} = S_o * 3.14 \quad (1)$$

Donde:

$S_o$ : Desviación estándar en el análisis de las réplicas (Richter, P. 2017)

### 5.8.4 Exactitud

La Exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor de referencia y el valor experimental encontrado de la definición de exactitud surge el principal problema ¿cuál es el verdadero valor del analito en la muestra? No obstante, cuando se dispone patrones de referencia el valor de dicho patrón es el que se acepta como verdadero y la exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón o bien analizando muestras problemas a la que se le ha adicionado una cantidad conocida de patrón. También se acepta la comparación de los resultados con un método de referencia validado del que ya se ha demostrado su exactitud, entonces el valor verdadero es el que se obtiene con dicho método de referencia y se compara con el valor hallado con el nuevo método que se quiere validar.

Los resultados se expresan en forma de porcentaje de recuperación y porcentaje de error.

Porcentaje de error:

$$\%error = \frac{(\text{valor teórico} - \text{valor experimental})}{\text{valor teórico}} * 100 \quad (2)$$

Porcentaje de recuperación

$$\%Recuperación = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{\text{adición}}} * 100 \quad (3)$$

Dónde:

$\bar{x}'$ : Valor medio de adiciones

$\bar{x}$ : Valor medio sin adición

$x_{\text{adición}}$ : Concentración añadida

### 5.8.5 Precisión

Las dos medidas más usadas en la precisión, que generalmente se define en términos de la desviación estándar o coeficiente de variación, son la repetibilidad y la reproducibilidad. La repetibilidad es la precisión más pequeña esperada, da una noción de la variabilidad que se espera cuando un método es aplicado por un solo analista en un equipo en un intervalo de tiempo corto. La reproducibilidad representa la variabilidad que se obtiene cuando una muestra es analizada por varios laboratorios, esta tiene un valor más amplio. La precisión intermedia es más útil en casos específicos se obtiene cuando se evalúa la reproducibilidad entre analistas en un mismo laboratorio.

La repetibilidad y la reproducibilidad generalmente dependen de la concentración del analito y por lo tanto se deben determinar para diferentes concentraciones estableciendo, cuando sea relevante, la relación entre la concentración y el coeficiente de variación.

A partir de las desviaciones estándar de repetibilidad ( $S_r$ ) y reproducibilidad ( $S_R$ ) se pueden calcular los límites de repetibilidad,  $r$ , y de reproducibilidad,  $R$ , que permiten al analista saber si la diferencia entre análisis duplicados es significativa, en las respectivas condiciones.

### 5.8.5.1 Precisión intermedia

Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. La precisión de un método analítico se expresa generalmente como porcentaje de coeficiente de variación (%CV) de una serie de medidas y se calcula de la siguiente manera:

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \quad (4)$$

Dónde:

% CV: porcentaje de coeficiente de variación

S= desviación estándar

$\bar{X}$ =media aritmética de los resultados (L. Aguirre Ortega, et al, 2010).

### 5.8.5.2 Repetibilidad

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra bajo ciertas condiciones como son, por un mismo analista, con los mismos equipos y reactivos [L. Aguirre Ortega, et al, 2010].

## 5.9 Incertidumbre.

La incertidumbre de la medición según establece el vocabulario internacional de metrología, es un parámetro no negativo que caracteriza a la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza. En esta definición queda implícito, que la incertidumbre es un valor que se determina en métodos cuantitativos, como una medida de dispersión que generalmente corresponde a la desviación típica o la raíz cuadrada de la varianza del mensurando como la magnitud que se intenta medir. Por otra parte, se asume que la información de la medición solo permite la asignación de valores razonables al mensurando, basado en el supuesto que no se ha cometido errores al realizar la medición. De esta forma el valor obtenido de una magnitud y su incertidumbre presentan el resultado como un intervalo de valores probables, que permite tomar decisiones más precisas sobre una base estadística disponible [Betancourt, 2013].

En química analítica, se define generalmente como la incertidumbre asociada con el proceso de laboratorio, pero puede incluir también un componente de incertidumbre asociado con el muestreo. Por tanto, la “estimación” de la incertidumbre describe el espectro en torno a un resultado

comunicado o experimental dentro del cual puede esperarse que se encuentre el valor real dentro de un nivel definido de probabilidad. Se trata de un concepto diferente a la medición del error, que puede definirse como la diferencia entre un resultado individual y el valor verdadero. Comunicando la incertidumbre se pretende proporcionar un mayor nivel de confianza en la validez del resultado comunicado [Codex Committee on Pesticide Residues, 2011].

Cuando la contribución de los efectos individuales es importante, por ejemplo, en los laboratorios de calibración, será necesario tener en cuenta las contribuciones individuales de todos los efectos individuales por separado la desviación estándar de reproducibilidad configura una estimación de trabajo de la incertidumbre típica combinada siempre que el sesgo del laboratorio, medido en los materiales aplicables, es pequeño con respecto a la desviación estándar de la reproducibilidad, la repetibilidad interna es comparable con la repetibilidad del método estándar, y la precisión intermedia del laboratorio no es mayor que la desviación estándar de la reproducibilidad publicada [Barwick, V., et al. 2016].

## 6. Metodología

### 6.1 Materiales

Para realizar la validación se necesitaron los siguientes materiales:

- Balones aforados de 100, LMS, Ex 20 °C +/- 0.004mL, Balones aforados de 25 mL LMS, Ex 20 °C +/- 0.01mL, con los cuales se prepararon las soluciones estándares, la solución madre y los blancos, en material de vidrio, clase A.
- Beakers de 50 mL, 500 mL, 1000 mL, SCHOTT Duran; Se utilizaron para agregar reactivos los cuales se iban a utilizar más adelante al momento de realizar las soluciones, estos son de material de vidrio, clase A.
- Transferpette, Brand, (100-1000)uL, (500-5000)uL, (1000-10000)uL, Se utilizaron para medir cantidades pequeñas de estándar, ya que las concentraciones que se necesitaban eran muy bajas las cuales están entre 0.027 – 2.000 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L, material de plástico.
- Probetas de 250 mL, Brand, In 20 °C +/- 1 mL, se utilizaron para medir volúmenes al momento de realizar el reactivo color.
- Frasco lavador.

- Lavar material volumétrico, con extrán neutro, enjuagar con abundante agua libre de nitritos, luego con solución de ácido sulfúrico al 5%, y enjuagar con abundante agua destilada.

## 6.2 Equipos

- Balanza analítica OHAUS Pioneer  
Para verificar la balanza se usaron pesas de 1g y 100g, las cuales se calcula su medida y se debe tener un reporte de al iniciar el trabajo.
- Espectrofotómetro visible Thermo Scientific™ GENESYS™ 30
- pH-metro METROHM 691  
se verifica con las soluciones patrón de KCl a los distintos pH, se midieron antes de cada uso del pH-metro.

## 6.3 Reactivos

- Agua libre de nitrito
- Ácido fosfórico,  $H_3PO_4$ , 85 %, MERCK
- Sulfanilamida MERCK
- Diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina MERCK
- Solución madre de nitrito comercial, 99%, MERCK
- Ácido clorhídrico, HCl, 1N MERCK

## 6.4 Estandarización del método

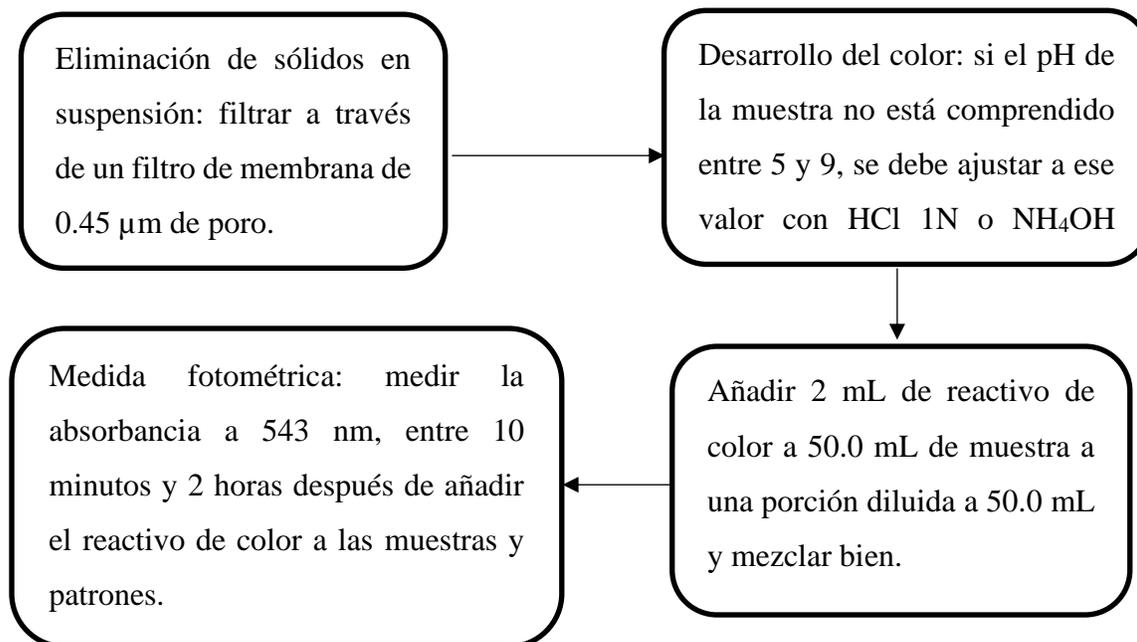
Para la determinación de nitrógeno se seguirá los procedimientos establecidos en el Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 2017.; 4500- $NO_2^-$  B NITROGENO (NITRITO).

## 6.5 Preparación de reactivos

Se prepararán a partir de la solución estándar por dilución en serie. Los patrones de calibración que se prepararan en un rango de concentraciones de 0.00 mg  $NO_2^-$ /L hasta 5,00 mg  $NO_2^-$ /L

Se realizará la curva de calibración con más de 8 patrones de calibración previamente preparados y un blanco, cada análisis se hará por triplicado. Se graficará la concentración vs absorbancia de cada patrón para definir visualmente el intervalo lineal.

## 6.6 Determinación del nitrito



**Figura 3.** Procedimientos de análisis de Nitritos

Utilizar, como guía, los siguientes recorridos de luz para las concentraciones de  $\text{NO}_2^-$

**Tabla 3.** Recorridos de luz para concentraciones de  $\text{NO}_2^-$

Recorrido de luz (Cm)	$\text{NO}_2\text{N}$ ( $\mu\text{g/L}$ )
1	2-25
5	2-6
10	<2

## 6.8 PARAMETROS DE DESEMPEÑO

### 6.8.1 Intervalo de trabajo y linealidad

Para evaluar la linealidad se prepararon 10 patrones previamente preparados ((0.0005-2 mg/L) y un blanco, a partir de una solución estándar de nitrito para la determinación del nitrito y 10 patrones previamente preparados (0.0-7.0 mg/l) y un blanco, a partir de una solución estándar de nitrato para la determinación del nitrato, cada análisis se hará por triplicado. Seguidamente se construirá una curva de para la determinación del intervalo lineal para cada analito.

### 6.8.2 Intervalo lineal

Se estableció a partir de la curva de calibración, donde se observe una mayor linealidad. Teniendo en cuenta el intervalo establecido se preparará 6 niveles de concentración a partir de la solución patrón de 1000 mg /L de nitrito y nitrato, y un blanco, se analizará por triplicado para evaluar estadísticamente la regresión lineal. Con los resultados que se obtengan se graficarán 3 curvas de calibración (Absorbancia vs concentración).

Una vez establecido el rango lineal, se calculará el coeficiente de determinación, coeficiente de correlación, el intercepto y la pendiente con su desviación estándar, y los residuales.

### 6.8.3 Límite de detección

#### 6.8.3.1 Límite de detección del Instrumento.

Se prepararon 10 blancos y se harán las respectivas lecturas en el equipo, los blancos son de la misma matriz de estudio, sin presencia del analito de interés, la cual se someterá al mismo tratamiento de la muestra (mismas condiciones y adición de reactivo). A partir de los datos se hallará la desviación estándar y se calculará el límite de detección del instrumento (LDI)

Mediante la siguiente ecuación:

$$\text{LDI} = 1.645 * S_0 \quad (1)$$

Dónde:

$S_0$ : desviación estándar de la lectura obtenidas.

#### 6.8.3.2 Límite de detección del método (LDM)

En la evaluación de este parámetro se analizaron 10 blancos medidos. A partir de los datos obtenidos se calculará el promedio, la desviación estándar y se calculará el límite de detección del método por la siguiente ecuación:

$$\text{LDM} = 3,14 * S_0 \quad (2)$$

Dónde:

$S_0$ : desviación estándar de la lectura obtenidas.

#### 6.8.4 Límite de cuantificación

Se determinó el límite de cuantificación utilizando la desviación estándar de los blancos utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{LCM: } 10 * S_0 \quad (3)$$

Y el cual será el primer punto de la curva.

#### 6.8.5 Exactitud

Se preparó y se analizaron por triplicado estándares a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) que cubran el intervalo lineal, a estos se les calculara el porcentaje de error durante 3 días continuos.

Porcentaje de error:

$$\% \text{error} = \frac{(\text{valor teórico} - \text{valor experimental})}{\text{valor teórico}} * 100 \quad (4)$$

#### 6.8.6 Porcentaje de recuperación

Se doparon muestras de agua potable y natural de concentración desconocidas con cantidades conocidas de patrón de nitratos y nitritos, este procedimiento se realizará por septuplicado y a tres niveles de concentración. Posteriormente se calculará el porcentaje de recuperación de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{Recuperación} = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{\text{adición}}} * 100 \quad (5)$$

Dónde:

$\bar{x}'$ : Valor medio de adiciones

$\bar{x}$ : Valor medio sin adiciones.

$x_{\text{adición}}$ : Concentración añadida

#### 6.8.7 Precisión

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y precisión intermedia. Estos se evaluarán en tres niveles de concentración que cubrieron el intervalo lineal.

### 6.8.7.1 Repetibilidad

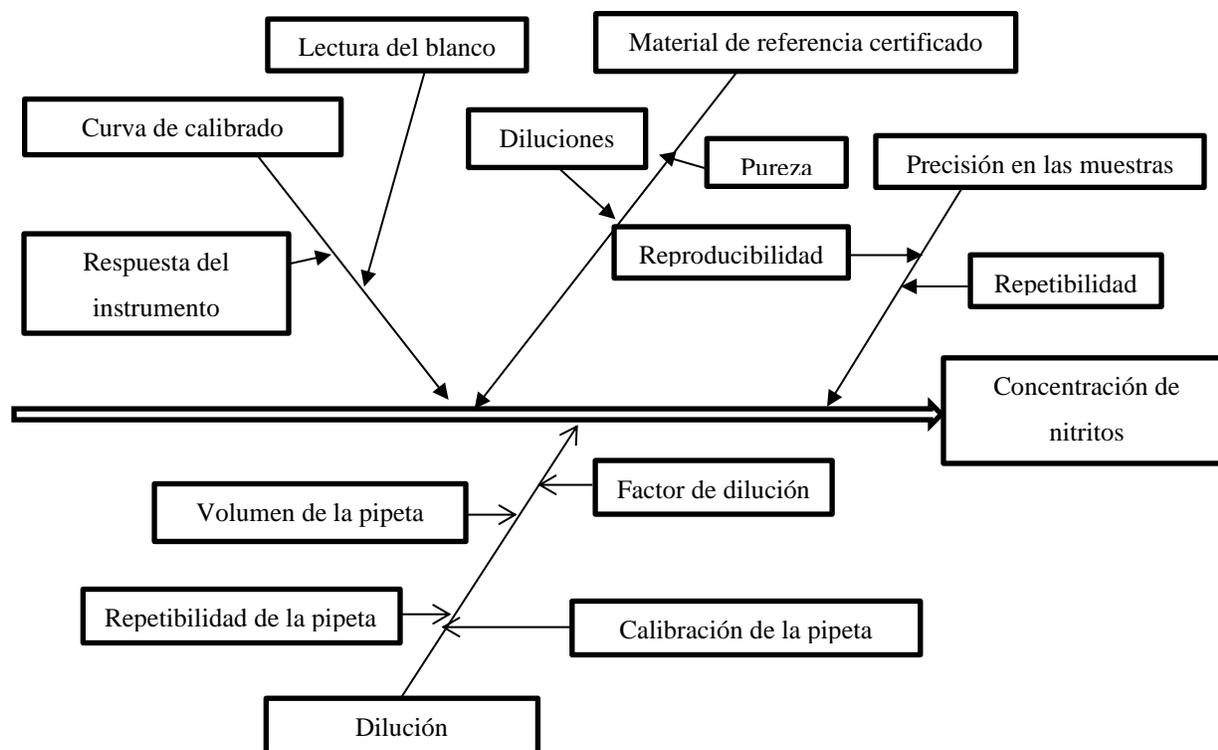
Se analizaron 7 réplicas de estándares (baja, media y alta concentración) respecto al rango lineal que se obtendrá a partir de la curva obtenida, el procedimiento analítico se aplicará bajo las mismas condiciones de operación (mismo día, analista, equipo y reactivos). Se determinará el coeficiente de variación y los intervalos de confianza a cada nivel de concentración estudiado. Para establecer si la concentración no afecta la variabilidad de los resultados se aplicó un test de Cochran.

### 6.8.7.2 Precisión intermedia

Se analizaron 7 réplicas de estándares (baja, media y alta concentración) respecto al rango lineal que se obtengan a partir de la linealidad, el procedimiento analítico se aplicara bajo diferentes condiciones de operación (diferente analista, diferente día, mismo equipo y mismos reactivos). Se determinará la reproducibilidad como el coeficiente de variación.

### 6.8.8 Incertidumbre

Se establecieron casi todas las fuentes de incertidumbre usadas en todo el proceso, de acuerdo a al diagrama de causa – efecto.



**Figura 4.** Fuentes de incertidumbre involucradas en el método de medición nitritos.

#### **6.8.8.1 Cuantificación de las fuentes de incertidumbre.**

Las fuentes que hacen parte de la incertidumbre del método son:

- Incertidumbre de la curva de calibración.
- Incertidumbre del material de referencia.
- Incertidumbre de lecturas de blancos.
- Incertidumbre por diluciones de estándares.

No todos los componentes de incertidumbre contribuyen significativamente a la incertidumbre combinada, por lo tanto, el primer paso que se debe hacer es estimar la contribución de cada componente de la incertidumbre combinada, eliminar aquellas que no son significativas y agrupar las fuentes individuales de incertidumbre cuyos valores se puedan combinar dentro de una fuente característica más global que contribuya parcialmente a la incertidumbre total del resultado. Existen cuatro procedimientos mediante los cuales pueden estimarse las componentes individuales:

- Mediante trabajo experimental por el laboratorio que realiza los análisis.
- Uso de mediciones en materiales de referencia.
- Por utilización de los datos y resultados de trabajos previos realizados en el laboratorio.
- usando el juicio del analista basado en la experiencia

Para el análisis de los datos proporcionados, se utilizaron programas de análisis estadísticos, estos son Microsoft Excel, y Statgraphics Centurion 18.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Rechazo de datos anómalos

Se aplicó un test de Grubbs para descartar datos atípicos en el proceso de validación del método para la determinación de nitritos.

En la validación de nitritos no se obtuvieron datos atípicos en la determinación de intervalo lineal, límite de cuantificación, límite de detección, exactitud con las muestras, como porcentaje de recuperación, y precisión con la muestra, debido que  $T_{exp} < T_{tablas}$ .

**Tabla 4.** Tabla de rechazó de datos para la validación de  $\text{NO}_2^-$

Parámetro	Rango	Día	T(valor máximo)	T(valor mínimo)	T rechazo	
Linealidad			1.35	1.26	1.82	
límite de cuantificación			0.94	2.04	2.18	
límite de detección			0.94	2.04	2.18	
exactitud con muestras	Sin adición.		1.62	1.39	1.94	
	Bajo		1.38	1.43	1.94	
	medio		1.22	1.68	1.94	
	Alto		1.25	1.80	1.94	
precisión con muestras		1	1.15	1.70	1.94	
		2	1.29	1.63	1.94	
		3	1.41	1.59	1.94	
exactitud y precisión con estándares	Bajo	1	1.93	1.03	1.94	
		2	1.90	1.18	1.94	
		3	1.10	1.29	1.94	
			analista 2	0.93	1.42	1.94
	medio	1	1.54	1.46	1.94	
		2	1.10	1.89	1.94	
		3	1.80	1.34	1.94	
			analista 2	1.66	1.06	1.94
	Alto	1	1.22	1.31	1.94	
		2	1.40	1.60	1.94	
		3	1.68	1.12	1.94	
			analista 2	1.26	1.67	1.94

## 7.2 Validación de nitritos

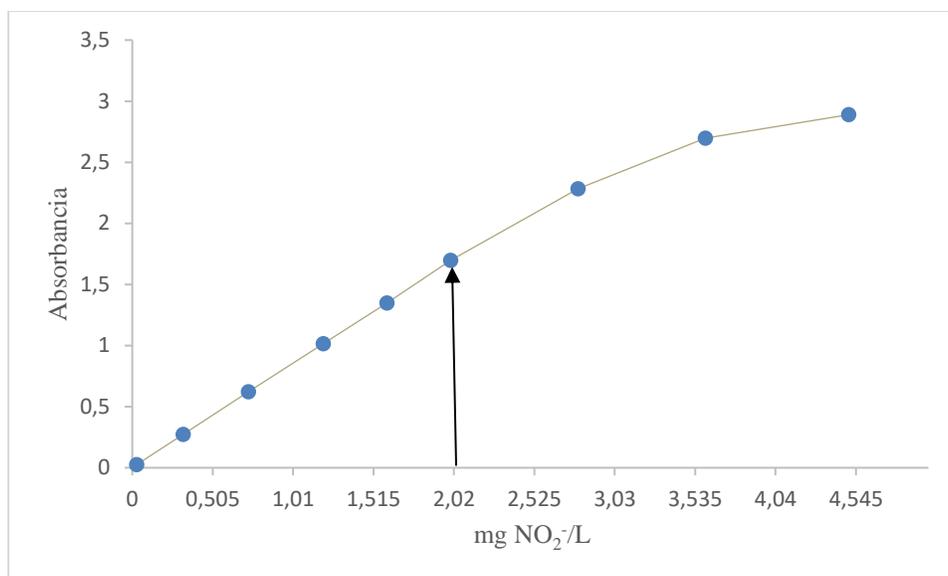
Con el fin de cumplir con el objetivo de la validación del método analítico para la determinación de nitritos se calcularon los atributos de calidad: linealidad e intervalo de trabajo, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud, los resultados de cada uno de ellos serán presentados a continuación.

### 7.2.1 Linealidad e intervalo lineal

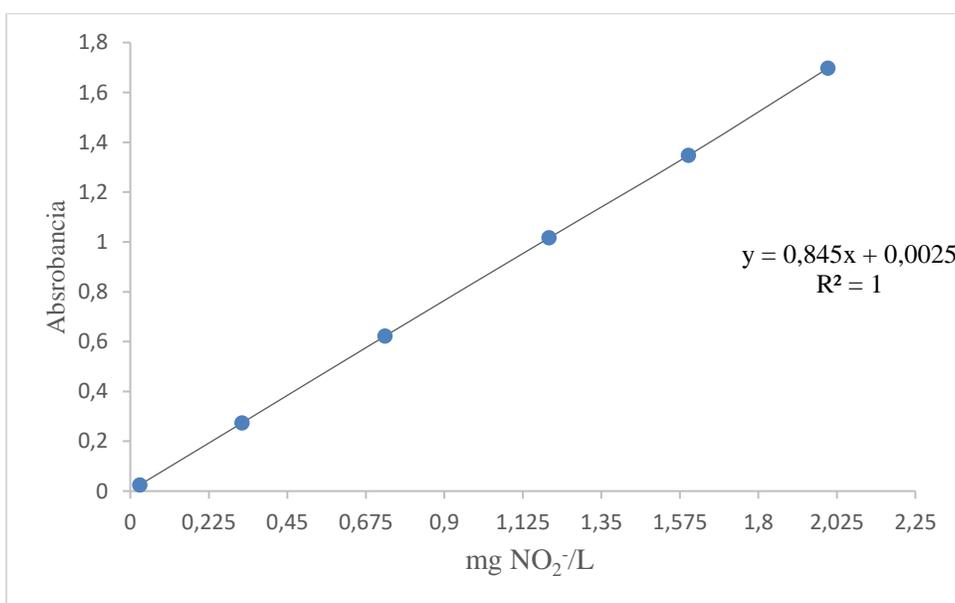
En la tabla se registran los valores promedios de las absorbancias en cada nivel de concentración analizado. Para determinar este atributo de calidad (linealidad) se graficaron los valores de las concentraciones en el eje de las abscisas (eje x) y las absorbancias en el eje de las ordenadas (eje y), mediante observación de la gráfica obtenida se puede determinar que la tendencia lineal de esta, está comprendida en el intervalo de concentración entre 0.027 – 2.000 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L.

**Tabla 5.** Concentración vs absorbancia para NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L	absorbancia promedio
0.027	0.0250
0.320	0.2733
0.730	0.6220
1.200	1.016
1.600	1.3473
2.00	1.6976
2.80	2.2843
3.60	2.6976
4.50	2.8896



**Figura 5.** Grafica de concentración de  $\text{NO}_2^-$  Vs absorbancia.  $\lambda=543$  nm



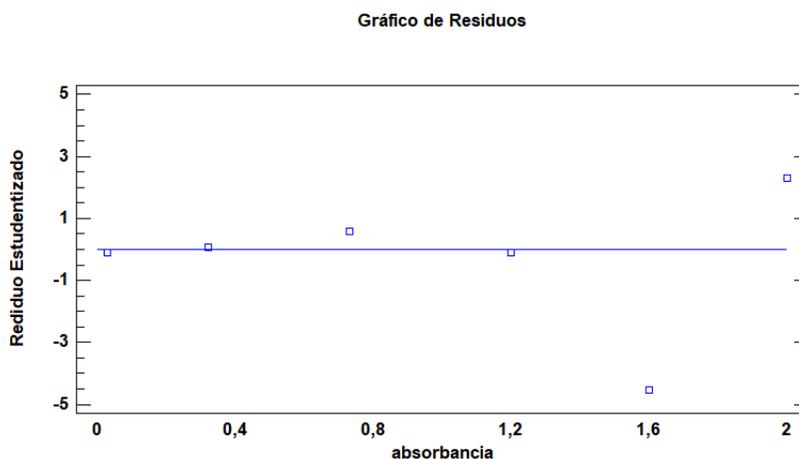
**Figura 6.** Curva de calibrado para  $\text{NO}_2^-$   $\lambda=543$  nm.

Aplicando un análisis de regresión lineal, y aplicando el modelo de ajuste de mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación lineal:

$$y = 0.84500061x + 0.0025219$$

Donde la pendiente tiene un valor de 0.84500061, y el valor del intercepto tiene un valor de 0.0025219. Los coeficientes de correlación  $r$ , y determinación  $r^2$  calculados arrojaron valores de 0,99997924 y 0,99995848 respectivamente, lo cual indica que hay una fuerte relación estadística entre la concentración de nitritos y la absorbancia.

Se obtuvo una gráfica de la varianza residual constante, que son los residuos frente a los valores predichos de la absorbancia, observándose una distribución aleatoria de los puntos y no refleja ninguna tendencia.



**Figura 7.** Gráfico de residuos Vs absorbancia.

El coeficiente de variación de los factores de respuesta fue de 3.323%, el cual es un resultado aceptable pues es inferior al 5% lo que es un indicativo de linealidad. (Véase tabla de anexo)

Aplicando el t-student, el  $t_{exp}$  calculado fue de 310.364 y el  $t_{tablas}$  es de 2.1199, se tiene que

$t_{exp} > t_{tablas}$  esto se puede confirmar que la pendiente es significativamente distinta de cero para un  $\alpha$  igual a 0.05 con n-2 grados de libertad. (Ver tabla 6)

Por otra parte, a la curva se le aplico un análisis de varianza. (Ver tabla 6). Dado que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que el  $\alpha$  igual a 0.05, demuestra que existe una relación estadísticamente significativa entre la absorbancia y la concentración de  $\text{NO}_2^-$ . Con un nivel de confianza del 95%

**Tabla 6.** Análisis de varianza y t student, para curva de calibrado de  $\text{NO}_2^-$

Fuente	GL	Suma de cuadrado	cuadrado medio	F	Valor-P	t-student
Regresión	1	2.879387931	2.879387931	96325.8353	0.00000	310,364
Residuos	4	0.000119569	0.0000298			
Total	5	2.8795075				

Además se aplicó el test de Durbin-Watson y se encontró que el valor-P = 0.511, este valor al ser mayor que  $\alpha$  igual a 0.05, nos demuestra que no hay auto correlación de los residuos de los datos utilizados con un nivel de confianza del 95.0%.

### 7.2.2 LIMITE DE CUANTIFICACION DEL METODO (LCM)

**Tabla 7.** Límite de cuantificación para el  $\text{NO}_2^-$

Blancos	Absorbancias Promedios
1	0
2	-0.001
3	0.002
4	-0.005
5	-0.004
6	-0.004
7	-0.003
8	-0.004
9	-0.004
10	-0.005
Promedio	-0.0028
Desviación estándar	0.0023
LCM	0.023

Para establecer el LCM se realizó la lectura de los diez blancos reactivos, donde cada uno fue analizado, se obtuvieron los siguientes datos los cuales se encuentran expresados en la tabla 9, con los datos que se obtuvieron se calculó la desviación estándar de las absorbancias y las concentraciones que arrojó el equipo de cada blanco. El límite de cuantificación se obtuvo con la ecuación (2). (Véase anexo C)

A partir de estos resultados, determinamos que se debía trabajar con el LCM 0.023 dado por las concentración promedio, ya que, el que arrojaba el promedio de las absorbancias daba un margen de error grande, para corroborar que el dato que utilizamos fue el correcto, se preparó un estándar a una concentración de 0.027 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L donde este estándar se analizó por triplicado y del cual se prepararon siete muestras se le determino su concentración real y se calculó su porcentaje de error, los datos se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 8.** Límite de cuantificación NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

<b>STD-0.023</b>				
<b>mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L</b>	<b>Absorbancia Promedio</b>	<b>Concentración real del estándar</b>	<b>%Error</b>	
0.023	0.023	0.024	10.24	
	0.023	0.024	10.24	
	0.024	0.025	5.86	
	0.024	0.025	5.86	
	0.025	0.027	1.48	
	0.027	0.029	7.29	
	0.022	0.023	14.63	

A partir de estos resultados se puede observar que el estándar preparado a una concentración de 0.027 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L presenta un porcentaje de error bajo inferior al 5% por tal razón se decidió tomar esta concentración como el límite de cuantificación para este método.

### 7.2.3 Limite detección del método (LDM)

Para calcularlo se prepararon diez blancos, luego se calcularon las concentraciones asociadas a estas señales, se le calculo desviación estándar y el promedio de las lecturas una vez obtenidos estos datos se calculó el LDM mediante la ecuación (1) y se obtuvo un valor de 0.007 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L

**Tabla 9.** Límite de detección del método

<b>Blancos</b>	<b>Absorbancias promedias</b>
----------------	-------------------------------

1	0
2	-0.001
3	0.002
4	-0.005
5	-0.004
6	-0.004
7	-0.003
8	-0.004
9	-0.004
10	-0.005
Promedio	-0.0028
Desviación estándar	0.0023
LDM	0.007

#### 7.2.4 Limite detección instrumental (LDI)

Para la determinación del LDI se analizaron diez blancos reactivos diferentes medidos una vez cada uno y se calculó la desviación estándar de los resultados como absorbancia y se utilizó la ecuación, obteniéndose así un valor de 0.0045 mg/L.

**Tabla 10.** Límite de detección instrumental

Blancos	Absorbancia promedio
1	0
2	-0.001
3	0.002
4	-0.005
5	-0.004
6	-0.004
7	-0.003
8	-0.004
9	-0.004
10	-0.005
Promedio	-0.0028
Desviación estándar	0.0023
LDI	0.0045

### 7.2.5 Precisión

Los resultados obtenidos para la precisión como repetibilidad y reproducibilidad se muestran a continuación:

#### 7.2.5.1 Reproducibilidad

Este parámetro se evaluó a tres niveles de concentración diferentes dentro de un intervalo de trabajo (bajo, medio y alto) midiéndose en el equipo el mismo día por el mismo analista. La precisión se expresa como coeficiente de variación (%CV) de una serie de medidas, los resultados obtenidos para cada estándar se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 11.** Reproducibilidad para los estándares  $\text{NO}_2^-$

Concentración mg/L	Estándar bajo 0.528 mg/L	Estándar medio 1.028 mg/L	Estándar alto 1.528 mg/L
	0.5378	1.064	1.552
	0.5236	1.056	1.481
	0.5343	1.060	1.500
	0.5355	1.075	1.540
	0.5390	1.054	1.521
	0.5236	1.056	1.533
	0.5367	1.069	1.524
S	0.0065	0.008	0.024
Promedio	0.533	1.062	1.522
%CV	1.22	0.73	1.59

#### 7.2.5.2 Repetibilidad

Esta se determinó analizando estándares a diferentes niveles de concentraciones (bajo, medio y alto) en tres días, realizándolo por triplicado por un mismo analista; los resultados se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 12.** Repetibilidad para los estándares  $\text{NO}_2^-$

Concentración mg/L	Estándar bajo 0.528 mg/L	Estándar medio 1.028 mg/L	Estándar alto 1.528 mg/L
	0.569	1.078	1.608
Día 1- Analista 1	0.572	1.077	1.590
	0.569	1.071	1.598
Promedio Día 1	0.570	1.075	1.598
S	0.0017	0.0037	0.0090
	0.556	1.076	1.570
Día 2- Analista 1	0.552	1.068	1.550
	0.552	1.074	1.531
Promedio Día 2	0.553	1.072	1.550
S	0.0023	0.0041	0.0195
	0.548	1.063	1.574
DIA 3 – ANALISTA 1	0.548	1.052	1.545
	0.541	1.049	1.557
Promedio Día 3	0.546	1.055	1.558
S	0,0040	0.0073	0.0145
Promedio Todos Los Días			
	0.556	1.067	1.569
S	0,0026	0.0051	0.0143
%CV	0.47	0.47	0.91

Los valores obtenidos del coeficiente de variación tanto como para repetibilidad como para reproducibilidad del sistema, se encuentran por debajo de los límites establecidos por la AOAC en función de la concentración del analito son menor al 10%; por lo tanto, se puede decir que nuestro método presenta una buena precisión. También aplicamos a los datos obtenidos contraste de Grubbs; no se descartó ningún dato tanto para los estándares.

#### 7.2.5.2 Exactitud

Se evaluó como porcentaje de error y como porcentaje de recuperación

La exactitud para las soluciones patrones preparadas a tres niveles de concentración (0.528, 1.028 y 1.528) mg/L durante tres días para estándares bajo, medio y alto se expresó como porcentaje de error, donde se obtuvieron porcentajes de error 5.492 %, 3.728 % Y 2.443 % respectivamente, obteniéndose la siguiente tabla:

**Tabla 13.** Porcentaje de error  $\text{NO}_2^-$

Día	Estándar bajo 0.528 mg/L		Estándar medio 1.028 mg/L		Estándar alto 1.528 mg/L	
	mg/L	%Error	mg/L	%Error	mg/L	%Error
1	0.570	7.954	1.073	4.377	1.564	2.356
2	0.555	5.113	1.074	4.474	1.587	3.861
3	0.546	3.409	1.052	2.334	1.545	1.112

Los porcentajes de error hallados para cada estándar están por debajo del 10 % aceptado por el IDEAM. A estos valores se le aplicó un test de *Cochran* con el cual se encontró que el  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$ . Lo que demuestra es que la concentración no afecta en la variabilidad de los resultados.

**Tabla 14.** Test de Cochran para % error de  $\text{NO}_2^-$

	$G_{\text{exp}}$	$G_{\text{tab}}$
test de cochran	0,721	0,820

La exactitud representada como porcentaje de recuperación, en la muestra de agua potable arroja valores que se pueden apreciar en la tabla 15 y 16.

**Tabla 15.** Porcentaje de recuperación de  $\text{NO}_2^-$ , muestra de agua potable

Muestra de agua potable	
Nivel de concentración.	Porcentaje de recuperación
Bajo	105,894
Medio	104,350

Alto	109,611
------	---------

**Tabla 16.** Porcentaje de recuperación de  $\text{NO}_2^-$ , muestra de agua natural

Muestra de agua natural	
Nivel de concentración.	Porcentaje de recuperación
Bajo	103,572
Medio	101,656
Alto	105,347

Los resultados en las tablas anteriores corroboran que la exactitud de la metodología para la determinación de nitritos es satisfactoria, estos porcentajes se encuentran por debajo del límite permitido por la AOAC.

A los valores de % de recuperación se le aplicó un test de *Cochran* con el cual se encontró que el  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$ . Lo que demuestra es que la concentración no afecta en la variabilidad de los resultados

**Tabla 17.** Test de Cochran para % de recuperación de  $\text{NO}_2$  agua potable

	$G_{\text{exp}}$	$G_{\text{tab}}$
test de cochran	0,348	0,820

**Tabla 18.** Test de Cochran para % de recuperación de  $\text{NO}_2$  agua natural

	$G_{\text{exp}}$	$G_{\text{tab}}$
test de cochran	0,339	0,820

Con estos valores se comprobó que la concentración no afecta la variabilidad de los resultados, al notar que en ambos casos el  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$ .

## 8. Conclusiones.

- Se validó la metodología analítica para la determinación de nitritos en agua potable y natural, mediante la técnica de espectrofotometría VIS, en el laboratorio de investigación y calidad ambiental del Sena regional Montería, se evidencio en la metodología un alto grado de relación entre los atributos de validación; ya que se presentó un nivel de correlación mayor a 0.995, en el intervalo de concentración analizado (0.027 – 2)  $\text{NO}_2^-$  mg/L el cual manifestó ser lineal.
- Los atributos de calidad calculados nos demuestran que las condiciones que existen en el laboratorio son apropiadas y favorables para la determinación de nitritos, y su implementación en agua natural y potable. Lo cual permite que este parámetro cumpla con los requisitos analíticos para ser acreditado
- A todos los atributos de calidad se le aplicaron programas y test estadísticos para comprobar su factibilidad, y con lo cual se demostró resultados dentro de los rangos permitidos, bajo la norma NTC:ISO/IEC 17025:2017 para ser desarrollado en el laboratorio de investigación y calidad ambiental del SENA regional Montería, los atributos determinados cumplen con los índices de calidad, demostrándose así veracidad del método, ya que, resulto ser lineal, precisa y exacta, para el intervalo de concentración estudiado.
- Para el Limite de detección del método y límite de cuantificación, se observó que el equipo detecta concentraciones de 0.0087 mg  $\text{NO}_2^-$ /L y cuantifica a partir de 0.027 mg  $\text{NO}_2^-$ /L, lo cual demuestra veracidad del método para la determinación de  $\text{NO}_2^-$  .
- La precisión del método se determinó y se expresó mediante coeficiente de variación y proporciono valores dentro de los parámetros de aceptabilidad tanto como para la repetibilidad y la reproducibilidad, obteniéndose valores de 1.22, 0.73 y 1.59 para reproducibilidad y para repetibilidad valores de 0.47, 0.47 y 0.91, los cuales fueron menores al establecido por la AOAC, por lo tanto, nuestro método da un nivel de precisión confiable.
- La exactitud, la cual se expresó como porcentaje de error en cada rango bajo 5.492%, medio 3.728% y alto 2.443%, los cuales están permitidos dentro de lo establecido por el IDEAM, es decir, por debajo del 10%.

## 9. Recomendaciones

Para la correcta determinación de nitritos se debe tener en cuenta las siguientes recomendaciones.

- Calcular las fuentes de incertidumbre no calculadas que son incertidumbre asociada a la preparación de estándares (bajo, medio y alto), incertidumbre asociada al volumen de muestra y la incertidumbre del patrón concentrado. La incertidumbre del material volumétrico: matraces que se usaron en la preparación curva de calibrado, y estándares rango alto, medio y bajo. Reporte de transfer pipeta. Esto es debido a que la situación que vivimos en estos últimos días con la pandemia provocada por Covid-19, impide la continuidad de la validación y por ende no se pudo calcular la totalidad de la incertidumbre. (Revisar anexos E, que corresponde a incertidumbre asociada a repetibilidad, reproducibilidad y curva de calibrado).
- Validar el método en aguas residuales, la cual no se pudo terminar por la situación sanitaria que enfrentamos.
- Tomar muestra de agua potable con poca cantidad de cloro, debido que este oxida el nitrito, y genera interferencia al hacer los adicionados.

## 10. Bibliografía

- Abril Diaz, N., Barcena Ruiz , A. J., Fernandez Reyes , E., Galvan Cejudo, A., & otros. (2014). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas . Obtenido de Espectrofotometria: Espectros de absorcion y cuantificacion colorimetrica de biomoléculas (2007). *Anexo I: ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE* .
- Aguirre, Leticia, GARCIA, F. Javier, GARCIA, Teresa., 2001. Validación De Métodos Analíticos. España, A.E.F.I. asociación española de farmacéuticos de la industria,.19, 46, 56, 68, 76 y 86p.
- Barwick, V., Morillas Bravo, P., Ellison, S., Engman, J., Gjengedal, E., & Lund, U. et al. (2016). La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. Eurachem.org. Retrieved
- Basulto, J., Manera, M., & Baladia, E.. (2014). Ingesta dietética de nitratos en bebés y niños españoles y riesgo de metahemoglobinemia. *Pediatría Atención Primaria*, 16(61), 65-69.
- Betancourt, A. (2013). La incertidumbre asociada al resultado analítico en los laboratorios de ensayo de la rama agropecuaria. *Revista de Salud Animal*, 35(2), 73–78.
- Bolaños-Alfaro, J. D., Cordero-Castro, G., & Segura-Araya, G. (2017). Determinación de nitritos, nitratos, sulfatos y fosfatos en agua potable como indicadores de contaminación ocasionada por el hombre, en dos cantones de Alajuela (Costa Rica). *Revista Tecnología en Marcha*, 30(4), 15. <https://doi.org/10.18845/tm.v30i4.3408>
- Boris, D.; Rojas, F.; Guerrero, L.; Roa, L.; Rodriguez, L.; Soto, M.; Aguilera, M.; Sandoval, S. Validación de Métodos y Determinación de la Incertidumbre de la Medición: “Aspectos Generales sobre validación”. Santiago, Chile; Diciembre, 2010; p50.
- Camargo, J.A. y Alonso, A. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International* 32: 831-849.
- Codex Committee on Pesticide Residues. (2011). *Directrices Sobre La Estimación De La Incertidumbre De Los Resultados*. 1–17.

[www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../cxg\\_059s.pdf](http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../cxg_059s.pdf)  
cach?%5CnSimilares%5Cn

- David Correa. (2016). Biodiversidad y ecología funcional bacterias desnitrificantes (tesis doctoral). Universidad de Granada.
- Eurachem 1998. A laboratory guide to method validation and related topics; The Fitness for Purpose of Analytical Method. Eurachem Guide.
- Eurachem/CITAC., (2016). Cuantificación de la incertidumbre en medidas analíticas. Eurolab, España.
- Gómez-Duarte, Oscar G.. (2018). Contaminación del agua en países de bajos y medianos recursos, un problema de salud pública. *Revista de la Facultad de Medicina*, 66(1), 7-8
- J. N. Miller and J. C. Miller., 2002. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Madrid, Pearson Educación S.A.
- L. Aguirre Ortega, F, J García, T, García, M. Ilera, M, Juncadella, M, Lizondo, A, Lluch. 2010. *Validacion de Métodos Analíticos*. Madrid.
- Miguel-Fernández, C., & Vázquez-Taset, Y. (2006). Origen de los nitratos (NO<sub>3</sub>) y nitritos (NO<sub>2</sub>) y su influencia en la potabilidad de las aguas subterráneas. *Minería y Geología*, 22(3), 9.
- Ministerio de Vivienda Ciudad y Desarrollo Territorial. (2007). Resolución Número 2115 de 2007. *Social, Ministerio de la Protección Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial*, 23.  
[http://www.minambiente.gov.co/images/GestionIntegraldelRecursoHidrico/pdf/normativa/Res\\_2115\\_de\\_2007.pdf](http://www.minambiente.gov.co/images/GestionIntegraldelRecursoHidrico/pdf/normativa/Res_2115_de_2007.pdf)
- Olga de J Omelas, Yassellis J Ruiz, Luis F Medina (2012). Bacterias Nitrificantes y su Utilidad Para el Tratamiento de Aguas Residuales: Desarrollo de un Enriquecimiento del Inóculo 141-145
- R. Calderón. “Evaluación de la comunidad de macro invertebrados bentónicos y la calidad fisicoquímica del agua en la parte alta de la quebrada El Carracá, del municipio de Los Santos”, tesis de licenciatura, Universidad Industrial de Santander, Colombia, 2004.

Richter, P. (2017). VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. Presentación, Santiago de Chile.

Sosa Arenas, I., & Lopez Sanchez, J. (Junio de 2004). *Espectrofotometria de absorcion* . Obtenido de Instituto de biotecnologia, Universidad nacional autonoma de Mexico.

Tenorio L., F. A., del Valle M, L., & Pastelín H., G. (01 de Enero de 2005). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Obtenido de Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57936106.pdf>

## 11. Anexo

### 11.1 Anexo A. intervalo lineal, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

Tabla A-1 Contraste de Grubbs para rango lineal de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

1	0,025
2	0,273
3	0,622
4	1,016
5	1,347
6	1,698
Promedio	0,83
S	0,641
% CV	77,2
T para Rechazo	1,82
Valor mínimo	0,025
Valor máximo	1,698
T bajo	1,26
T alto	1,35

Tabla A-2. Coeficiente de variación de los factores de respuesta para rango lineal, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

concentración	absorbancia	f(y/x)	f promedio	desviación estándar de f	%CV
0,027	0,024	0,88888889			
0,027	0,025	0,92592593			
0,027	0,025	0,92592593			
0,32	0,271	0,846875			
0,32	0,274	0,85625			
0,32	0,275	0,859375			
0,73	0,617	0,84520548			
0,73	0,624	0,85479452			
0,73	0,625	0,85616438			
1,2	1,009	0,84083333	0,857675285	0,0285005	3,32
1,2	1,019	0,84916667			
1,2	1,02	0,85			
1,6	1,332	0,8325			
1,6	1,354	0,84625			
1,6	1,356	0,8475			
2	1,631	0,8155			
2	1,696	0,848			
2	1,698	0,849			

### 11.2 Anexo B. Limite cuantificación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

Tabla B-1. Absorbancia de blancos reactivos NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

BLANCO	CONCENTRACION
1	0.000
2	-0.001
3	-0.004
4	-0.003
5	-0.004
6	0.002
7	-0.005
8	-0.004
9	-0.004
10	-0.005

### 11.3 Anexo C. Precisión NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

Tabla C-1. Estándar bajo NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

ESTANDAR BAJO DE 0,528 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L				
RÉPLICAS	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	ANALISTA 2
1	0.569	0.556	0.548	0.538
2	0.565	0.555	0.550	0.524
3	0.573	0.555	0.541	0.534
4	0.572	0.552	0.548	0.535
5	0.571	0.554	0.542	0.539
6	0.573	0.560	0.548	0.524
7	0.569	0.552	0.542	0.537
promedio	0.570	0.555	0.546	0.532

Valor Mínimo	0.565	0.552	0.541	0.524
Valor Máximo	0.573	0.560	0.550	0.539
t bajo	1.93	1.18	1.29	1.26
t alto	1.03	1.90	1.10	1.02
t para Rechazo	1.94	1.94	1.94	1.94
Nro total de datos	7	7	7	7
Nro datos OK	7	7	7	7

Tabla C-2. Estándar medio NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

<b>ESTANDAR MEDIO DE 1,028 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L</b>				
<b>RÉPLICAS</b>	<b>DÍA 1</b>	<b>DÍA 2</b>	<b>DÍA 3</b>	<b>ANALISTA</b>
				<b>2</b>
1	1.078	1.076	1.063	1.064
2	1.060	1.075	1.052	1.056
3	1.086	1.078	1.044	1.060
4	1.077	1.068	1.052	1.075
5	1.066	1.072	1.055	1.054
6	1.071	1.076	1.048	1.056
7	1.071	1.074	1.049	1.069
Promedio	1.073	1.074	1.052	1.062
Valor Mínimo	1.060	1.068	1.044	1.054
Valor Máximo	1.086	1.078	1.063	1.075
t bajo	1.46	1.89	1.34	1.06
t alto	1.54	1.10	1.80	1.66
t para Rechazo	1.94	1.94	1.94	1.94
Nro total de datos	7	7	7	7
Nro datos OK	7	7	7	7

Tabla C-3. Estándar alto NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

<b>ESTANDAR ALTO DE 1,528 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L</b>				
<b>RÉPLICAS</b>	<b>DÍA 1</b>	<b>DÍA 2</b>	<b>DÍA 3</b>	<b>ANALISTA</b>
				<b>2</b>
1	1.574	1.608	1.571	1.552
2	1.579	1.573	1.556	1.481
3	1.583	1.563	1.535	1.500
4	1.545	1.590	1.551	1.540
5	1.565	1.590	1.543	1.521

6	1.548	1.586	1.528	1.533
7	1.557	1.598	1.531	1.524
Promedio	1.564	1.587	1.545	1.522
Valor Mínimo	1.545	1.563	1.528	1.481
Valor Máximo	1.583	1.608	1.571	1.552
t bajo	1.31	1.60	1.12	1.67
t alto	1.22	1.40	1.68	1.26
t para Rechazo	1.94	1.94	1.94	1.94
Nro total de datos	7	7	7	7
Nro datos OK	7	7	7	7

#### 11.4 Anexo D. Exactitud

Tabla D-1. Porcentaje de error

<b>PORCENTAJE DE ERROR</b>				
<b>mg/L</b>	<b>Adicionado rango bajo</b>	<b>Adicionado rango medio</b>	<b>Adicionado rango alto.</b>	
1	0.570	1.073	1.564	
2	0.555	1.074	1.587	
3	0.546	1.052	1.545	
Promedio	0.557	1.066	1.565	
Valor Mínimo	0.546	1.052	1.545	
Valor Máximo	0.570	1.074	1.587	
t bajo	0.91	1.15	0.97	
t alto	1.07	0.62	1.03	
t para Rechazo	1.15	1.15	1.15	
Nro total de datos	3	3	3	
Nro datos OK	3	3	3	
%Error	5.492	3.728	2.443	
DESVIACION ESTANDAR	0.012124356	0.012423097	0.021031722	
%CV	2.17	1.16	1.34	

#### 11. Anexo E incertidumbre

Tabla E-1 incertidumbre repetibilidad

Dia 1	Rango Bajo	Rango Medio	Rango Alto
	0,5378	1,064	1,552
	0,5236	1,056	1,481
	0,5343	1,060	1,5000

	0,5355	1,075	1,540
	0,5390	1,054	1,521
	0,5236	1,056	1,533
	0,5367	1,069	1,524
X	0,533	1,062	1,522
S	0,00653316	0,007849994	0,024231112
Ucomb-bajo	0,002469302	0,002967019	0,009158499
cuadrado	6,09745E-06	8,8032E-06	8,38781E-05
Raíz	0,002469302	0,002967019	0,009158499
Incer. Relativa	0,004633353	0,002793531	0,006018942

Tabla E-2 incertidumbre reproducibilidad

Analito	Dia	0,2 mg/L	1,2 mg/L	2,5 mg/L
Nitrito	1	0,57	1,08	1,57
		0,56	1,06	1,58
		0,57	1,09	1,58
		0,57	1,08	1,54
		0,57	1,07	1,57
		0,57	1,07	1,55
		0,57	1,07	1,56
	2	0,56	1,08	1,61
		0,55	1,07	1,57
		0,56	1,08	1,56
		0,55	1,07	1,59
		0,55	1,07	1,59
		0,56	1,08	1,59
		0,55	1,07	1,60
	3	0,55	1,06	1,57
		0,55	1,05	1,56
		0,54	1,04	1,53
		0,55	1,05	1,55
		0,54	1,06	1,54
		0,55	1,05	1,53
		0,54	1,05	1,53
X	0,56	1,07	1,57	
S	0,011	0,012	0,023	
Ucomb-bajo	0,020	0,011	0,015	
cuadrado	0,000	0,000	0,000	
Raíz	0,020	0,011	0,015	
Incert. Relativa	0,03516	0,01058	0,00928	

Tabla E-3 incertidumbre asociada a curva de calibrado

Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto	
Sxx	8,639	Sxx	8,639	Sxx	8,639
B1	0,84500061	B1	0,84500061	B1	0,84500061
S	0,001	S	0,001	S	0,001
p	3	p	3	p	3
n	18	n	18	n	18
Co	0,2	Co	1,2	Co	2,5
c promedio	0,98	c promedio	0,98	c promedio	0,98
Incer estándar	0,001	Incer estándar	0,001	Incer estándar	0,001
incer combinada	0,004	incer combinada	0,001	incer combinada	0,0004