VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS EN AGUA POTABLE, NATURAL Y RESIDUAL POR ESPECTROMETRÍA UV-VIS

Trabajo de grado como requisito para obtener el título de Químico

RICARDO JOSE HOYOS TIRADO

Director

Edineldo Lans Ceballos

M.Sc Ciencias Químicas

Universidad de Córdoba

Facultad de Ciencias Básicas

Programa de Química

Montería – Colombia

2020

NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de grado titulado ‘’ Validación de un método analítico para la determinación de Nitritos y Nitratos en agua potable, natural y residual por “espectrofotometría de UV-Vis’’ realizado por el estudiante**: RICARDO JOSÉ HOYOS TIRADO**, cumple con los requisitos exigidos por la facultad de Ciencias Básicas para optar por el título de **QUÍMICO** ha sido aprobada.

_____

EDINELDO LANS CEBALLOS. M. Sc

Director

_____

ROBERTH PATERNINA URIBE. M. Sc

Jurado

_____

BASILIO DÍAZ PONGUTA. M. Sc

Jurado

DEDICATORIA

A mis padres, Bilma Tirado y Cesar Hoyos, a mis hermanos Cesar Hoyos y Diana Hoyos, a mi abuela Dorifa Torrez, por el apoyo incondicional, amor y confianza que me brindaron en toda la carrera.

Ricardo Hoyos

AGRADECIMIENTOS

Primeramente toda la gloria y gracia es para DIOS, quien me guio y me permitió seguir adelante en cada camino que necesité para lograr esta meta.

A mi madre BILMA TIRADO, quien me apoyó y acompañó en este largo camino, depositando toda su confianza para la culminación de este logro.

A mis hermanos DIANA HOYOS y CESAR HOYOS, quienes en algunos momentos me brindaron su apoyo para seguir en el proceso.

A todos mis familiares quienes siempre estuvieron apoyándome a cada momento y quienes me tendieron la mano cuando la necesitaba.

Al profesor EDINELDO LANS CEBALLOS quien me guío y me dio la oportunidad de realizar este trabajo en el laboratorio de aguas.

A los profesores BASILIO DÍAZ y ROBERTH PATERNINA por sus observaciones y sugerencias que me permitieron finalizar un trabajo exitoso.

A mis compañero de laboratorio, ARNALDO TRUJILLO, quien estuvo siempre pendiente brindándome su apoyo, sugerencias y correcciones que fueron de mucha utilidad en el proceso.

A mis amigos DANIEL GÓMEZ, MELISSA GANEM, EIMER MESTRA, JUAN PABLO MADERA, quienes me brindaron su apoyo y gran amistad en todo este camino.

A la UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA y su cuerpo de docentes por permitirme educar en esta prestigiosa alma mater.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN 1
1. INTRODUCCIÓN 3
2. OBJETIVOS 5
2.1 Objetivo general 5
2.2 Objetivos específicos 5
3. MARCO TEÓRICO 6
3.1 antecedentes 6
3.2 Contaminación del agua 6
3.3 nitritos y nitratos 7
3.3.1 Nitrificación 8
3.3.2 Desnitrificación 9
3.4 Técnicas de análisis para la determinación de nitritos y nitratos 10
3.4.1 método colorimétrico 10
3.4.2 método espectrométrico ultravioleta selectivo 10
3.4.3 Interferencias 11
3.5 PARAMETROS DE VALIDACION 12
3.5.1 Intervalo de trabajo y linealidad 12
3.5.2 Linealidad 13
3.5.2.1 Evaluación Estadística de la Linealidad. 14
3.5.2.2 Ecuación de la Recta 14
3.5.2.2.1 Pendiente y ordenada en el origen. 14
3.5.2.2.2 Coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r^2) 15
3.5.2.2.3 Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente 15
3.5.2.3 Test de determinación de correlación lineal 16
3.5.3 Límite de detección 17
3.5.3.1 Límite de detección instrumental (LDI) 17
3.5.3.2 Límite de detección del método (LDM) 17
3.5.4 Exactitud 18
3.5.5 Precisión 20
3.5.5.1 Reproducibilidad 20
3.5.5.2 Repetibilidad 21
3.5.5.3 Análisis de varianza (ANOVA) 21

3.5.5.4 Coeficiente de Variación (CV) 22
3.5.6 Incertidumbre 23
3.5.6.1 Tipos de incertidumbre 24
3.5.6.1.1 Incertidumbre combinada (A, B) 25
3.5.6.1.2. Incertidumbre Expandida (U) 25
3.5.6.2 Identificación de las fuentes de incertidumbre 26
5. Espectrofotometría de UV-Vis 29
5.1 Generalidades 29
5.2 Ley de Lambert – Beer 31
C: concentración de la sustancia absorbente (mol/L). 32
5.3 Instrumentación 32
5.3.1 Partes Básicas del espectrofotómetro. 32
6. NORMATIVIDAD 33
7. METODOLOGÍA 33
7.1 Materiales 33
7.2 Equipos 34
7.3 Reactivos 34
7.4 Estandarización del método 35
7.4.1 Preparación de reactivos 35
7.5 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN 37
7.5.2 Límites de Detección 38
7.5.2.1 Límite de detección instrumental 38
7.5.2.2 Límite de detección del método 38
7.5.2.3 Límite de cuantificación 39
7.5.4 Precisión 39
7.5.5 Exactitud 41
7.5.7 Cuantificación de las fuentes de incertidumbre 42
8. RESULTADOS Y DISCUSION 43
8.1 NITRITOS 43
8.1.1 Linealidad e intervalo lineal 43
8.3 Límite de detección y cuantificación 45
8.1.2 Precisión 46

8.1.3 Exactitud 48
8.1.4 Incertidumbre 49
8.2 NITRATOS 51
8.2.1 Linealidad e intervalo lineal 51
8.2.3 Límite de detección y cuantificación 53
8.2.4 Precisión 54
8.2.5 Exactitud 56
8.2.6 Incertidumbre 58
9. CONCLUSIONES 60
10. RECOMENDACIONES 61
11. BIBLIOGRAFÍA ..... **¡Error! Marcador no definido.**
12. ANEXOS 64

ABREVIATURAS

AOAC	Asociación oficial de Química Analítica
CV	Coeficiente de variación
Uv/Vis	Ultravioleta visible
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
%R	Porcentaje de recuperación
%E	Porcentaje de error
$\bar{x}$	Promedio
S	Desviación estándar
S^2	Varianza
Ppm	Partes por millón (mg/L)
s	Segundo
g	Gramo
Uexp	Incertidumbre expandida
Uc	Incertidumbre combinada
Uest	Incertidumbre estándar
NO_2^-	Nitrito
NO_3^-	Nitrato
LMP	Límite máximo permisible
OMS	Organización Mundial de la Salud
Abs	Absorbancia

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre de figura	Página
1	Grafica de linealidad	14
2	Fuentes de incertidumbre involucradas en el método de medición para nitritos y nitratos	41
3	Determinación del intervalo lineal para nitritos	44
4	Determinación del intervalo lineal para nitratos	52

LISTA DE TABLAS

Tablas	Nombre de la tabla	Página
1	Valores orientativos aceptables según la AOAC para el factor de recuperación en función de la concentración del analitos	19
2	Límites del coeficiente de variación para análisis de trazas en función de la concentración de analito. (AOAC)	22
3	Función de distribución para el cálculo de incertidumbre	28
4	Datos para la determinación del rango lineal de nitritos	43
5	Test de rechazo para la linealidad de nitritos	45
6	Determinación del límite de detección del método para nitritos	45
7	Determinación del límite de detección instrumental para nitritos	45
8	Determinación del límite de cuantificación del método para nitritos	46
9	Repetibilidad para nitritos	46
10	Reproducibilidad para nitritos	47
11	Test t-student para reproducibilidad – nitritos	47
12	Porcentaje de erros nitritos	48
13	Porcentaje de recuperación – nitritos	49
14	Incertidumbre combinada total para patrón bajo- nitritos	50
15	Incertidumbre combinada total para patrón medio- nitritos	50
16	Incertidumbre combinada total para patrón alto- nitritos	51
17	Datos para la determinación del rango lineal para nitratos	52
18	Test de rechazo – nitratos	53
19	Determinación del límite de detección del método – nitratos	53
20	Determinación del límite de detección instrumental – nitratos	54
21	Determinación del límite de cuantificación- nitratos	54
22	Repetibilidad- nitratos	54
23	Reproducibilidad- nitratos	55
24	Test t-student para reproducibilidad entre analistas – nitratos	56
25	Porcentaje de error- nitratos	56
26	Porcentaje de recuperación- nitratos	57
27	Incertidumbre combinada total para patrón bajo- nitratos	58
28	Incertidumbre combinada total para patrón medio- nitratos	58
29	Incertidumbre combinada total para patrón alto- nitratos	59

LISTA DE ANEXOS

anexos	Nombre de anexo	Página
A	Evaluación de la linealidad – nitritos	65
B	Límite de detección – nitritos	66
C	Datos primarios de validación – nitritos	67
D	Evaluación de la exactitud – nitritos	68
E	Análisis de varianza ANOVA – nitritos	69
F	Tabla de distribución t-student	60
G	Incertidumbre – nitritos	71
H	Evaluación de la linealidad – nitratos	74
I	Límite de detección – nitratos	74
J	Datos primarios de validación – nitratos	76
K	Evaluación de la exactitud – nitratos	77
L	Análisis de varianza ANOVA – nitratos	78
M	incertidumbre – nitratos	79

RESUMEN

Mediante el presente trabajo de grado se presenta la validación de un método analítico para la determinación de nitratos y nitritos en agua potable, natural y residual mediante ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS, según los métodos 4500-NO^-_3 B. método ultravioleta selectivo y 4500-NO^-_2 B. método colorimétrico del Methods for Examination of Water and Wastewater. 2017, Ed 23ª; métodos propuestos para la determinación de nitritos y nitratos. La metodología para el análisis de nitratos y nitritos consistió en la preparación de una solución madre a partir de una solución certificada de ambas especies. Para la medición de absorbancia de nitratos y nitritos se tomaron diferentes alícuotas a diferentes concentraciones y, haciendo uso de un medio acido (para nitratos) y un medio colorimétrico (para nitritos). El procedimiento se llevó a cabo en un espectrofotómetro de UV-VIS GENESYS^{TM} 10s y a una longitud de onda de 220 y 275 nm para nitratos y 543 nm para nitritos.

Cada parámetro de validación requiere de cuidados muy importantes, por lo que se hizo uso del manual de control de calidad, ya que, este muestra la metodología a seguir para cada parámetro de validación de métodos analíticos en el laboratorio de aguas de la universidad de córdoba, tales como; límite de detección y cuantificación, linealidad e intervalo lineal, precisión definida como repetibilidad y reproducibilidad, exactitud expresada como porcentaje de error y porcentaje de recuperación, e incertidumbre.

Para la validación de nitratos, se encontró un intervalo de trabajo entre 0,50 y 7,00 mg/L, se obtuvo un buen comportamiento lineal con un coeficiente de determinación R^2 de 0,9997; el límite de detección del método fue 0,05 mg/L y el de cuantificación se tomó como el primer punto de la curva, es decir 0,50 mg/L. la precisión del método evaluada como repetibilidad y expresada como coeficiente de variación fue 1,39 % para rango bajo, 1,89 % para rango medio y 1,13 % para rango alto, a su vez también se evaluó como reproducibilidad y expresada como coeficiente de variación arrojando los valores de 2,46 % para rango bajo, 2,59 % para rango medio

y 1,55 % para rango alto. La exactitud evaluada como porcentaje de error fue de 9,82 % para rango bajo, 0,20 % para rango medio y 0,70 % para rango alto. Se determinó el porcentaje de recuperación, encontrándose 101,7% para 1,00 mg/L y 103,3 % en 3,00 mg/L en agua potable, 96,6% en 3 mg/L y 97,0% en 5,00 mg/L en agua natural y 106,2 % en 1,00 mg/L y 101,4 % en 3,00 mg/L en agua residual. Así como también se determinó la incertidumbre de 1 ± 0,05 para rango bajo, 3 ± 0,14 para rango medio y 5 ± 0,23 para rango alto.

Para la validación de nitritos, se encontró un intervalo de trabajo entre 0,01 y 2,00 mg/L, se obtuvo un comportamiento lineal muy bueno con un coeficiente de determinación R^2 de 1; el límite de detección del método fue 0,004 mg/L y el límite de cuantificación se tomó como el primer punto de la curva, el cual es 0,01 mg/L. la precisión del método evaluada como repetibilidad y expresada como coeficiente de variación fue 6,38 % para rango bajo, 7,49 % para rango medio y 5,13 % para rango alto, a su vez, también se evaluó como reproducibilidad y expresada como coeficiente de variación, arrojando los valores de 6,12 % para rango bajo, 7,76 % para rango medio y 5,15 % para rango alto. La exactitud evaluada como porcentaje de error fue de 0,58 % para rango bajo, 4,93 % para rango medio y 1,38 % para rango alto. Se determinó el porcentaje de recuperación, encontrándose 115,00 % para 0,40 mg/L y 119,00 % para 1,00 mg/L en agua natural, y 87,0 % para 0,40 mg/L y 115 % para 1,00 mg/L en agua residual, y 100% para 0,40 mg/L y 101,8% para 1,00 mg/L en agua potable, así como también se determinó la incertidumbre de 0,05 ± 0,028 para rango bajo, 1 ± 0,038 para rango medio y 1,60 ± 0,060 para rango alto.

1. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural de utilidad pública y gestión social, vulnerable y escaso, que debe ser protegido en su ecosistema, de múltiples usos, los cuales ante su escasez deben ser priorizados y utilizados racional y eficazmente, indispensable para la supervivencia humana y del planeta. El estado y la ley deben garantizar el acceso equitativo y de calidad a toda la población, su gestión debe ser integral e integrada y de responsabilidad compartida entre las diversas contrapartes públicas y privadas implicadas en su conservación, distribución y consumo, sin descuidar que es además un bien cultural que debe ser respetado en sus diferencias (KIOTO, 2003).

En la problemática de conservación y disponibilidad de agua de buena calidad convergen diferentes causas: unas comunes en cualquier lugar del planeta y otras derivadas de la situación política, económica y social del país. Entre las primeras se debe mencionar el aumento en la población y en la producción y consumo de bienes y en general del aumento de la actividad antrópica, todo lo cual incrementa la demanda del recurso y genera mayor cantidad de residuos, provocando así deterioro de la calidad y agotamiento de los recursos hídricos (Carrasquilla y Morillo, 1994).

Lo anterior se ve reflejado en el departamento de córdoba, ya que siendo este departamento donde la oferta hídrica superficial es amplia; puesto que cuenta con los ríos Sinú, san Jorge y canalete, además de otras importantes corrientes de agua (CVS, 2012), se pasa por momentos en el que igual a nivel mundial se sufre por disponibilidad de fuentes no contaminadas que permite el usos de sus aguas en las diferentes actividades.

La presencia de concentraciones elevadas de compuestos nitrogenados en los acuíferos supone una limitación al uso de los recursos hidrológicos, a la vez condiciona las prácticas agrícolas correctas destinadas a optimizar la Producción y a evitar la acumulación de fertilizantes nitrogenados en suelos y aguas.

En este sentido, ya sea desde la perspectiva de la contaminación como desde la potencial reutilización de estos nutrientes en la agricultura, el conocimiento de la distribución espacial de nitrato, nitrito y amonio, relacionado con la dinámica hidrológica regional, es necesario para la correcta gestión de las aguas subterráneas.

Ante esta necesidad se validó en el Laboratorio de Aguas de la universidad de córdoba los métodos analíticos cuantitativos de nitratos obtenidos en agua mediante la técnica ultravioleta selectiva, y nitritos a través de la técnica colorimétrica, proporcionando valores confiables de concentración en las muestras procesadas, es decir, se validó la aptitud del método estimando la incertidumbre del resultado de un modo que es ampliamente reconocido, internamente consistente y fácil de interpretar, porque es un requisito importante en la práctica de los análisis químicos y se hizo teniendo en cuenta que el laboratorio presta servicios a la comunidad realizando diferentes análisis fisicoquímicos ambientales, proporcionando resultados de calidad e innovándolos con procesos eficientes y confiables, bajo los requisitos establecidos en la norma NTC-ISO/IEC/17025:2005, lo cual permite monitorear la calidad del agua para prevenir o revertir sus efectos contaminantes, contribuyendo al fortalecimiento de la capacidad analítica local.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Validar e implementar la metodología para la determinación de nitritos y nitratos en aguas potables, residuales y superficiales mediante espectrometría UV-VIS.

2.2 Objetivos específicos

- Presentar de manera ordenada el plan de validación acoplado a los parámetros del laboratorio de aguas de la Universidad de Córdoba bajo la norma NTC: ISO/IEC 17025: 2017.
- Determinar cada uno parámetros que requiere la validación del método.
- Implementar la validación del método para la determinación de nitritos y nitratos en aguas potables, residuales y superficiales.
- Estimar la incertidumbre de medición asociada a los métodos validados.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 antecedentes

Anteriormente se presentó un trabajo que corresponde a M. Zúñiga (2014), quien validó un método analítico para determinar nitritos en agua potable, en la Universidad de Córdoba. En este trabajo se empleó una técnica de espectrometría mediante el método colorimétrico y se determinaron los parámetros de validación de métodos analíticos como linealidad y rango lineal, límite de detección y cuantificación, precisión, exactitud e incertidumbre.

3.2 Contaminación del agua

La contaminación del agua se debe a la presencia de organismos patógenos que causan el deterioro de su calidad e inhiben su disponibilidad como recurso hídrico para consumo humano. Dentro de estos contaminantes se encuentran: los materiales inertes, productos químicos, organismos vivos, residuos industriales, entre otros.

Según la OMS el agua está contaminada “cuando su composición se encuentra modificada de tal forma que no cuenta con las condiciones necesarias para su uso”. La contaminación del agua provoca graves efectos en los organismos, poblaciones y ecosistemas, alterando los ciclos naturales y generando problemas ambientales, económicos y sociales [Belgrano, R.; colasurdo, V.; Díaz, O. 2003].

En Colombia, en las diferentes actividades socioeconómicas la mayoría de las aguas utilizadas son descargadas a las fuentes hídricas sin tratamiento alguno. Estos vertimientos se han ido incrementando debido al crecimiento poblacional e

industrial, generando degradación y contaminación del recurso hídrico [Boris, D.; Rojas, F.; Guerrero, L.; Rodríguez, L.; Soto, M.; Aguilar, M.; Sandoval, S. 2010].

3.3 nitritos y nitratos

Los nitratos y nitritos se encuentran en diferentes formas en los sistemas naturales y son los responsables de la contaminación de los recursos hídricos. [Coy, G. 1999]. Dicha contaminación, es palpable en las actividades industriales, pozos sépticos, agricultura, porquerizas, etc. [CDMB.; p3-p12].

El nitrógeno total oxidado es la suma del nitrato y nitrito. El nitrato generalmente se presenta en cantidades pequeñas en el agua superficial, pero puede alcanzar altas concentraciones en algunas aguas subterráneas. En exceso, contribuye a la metahemoglobinemia enfermedad conocida en lactantes. El límite de Nitratos de 10mg/L, se ha exigido en el agua potable para prevenir este trastorno. El nitrato se encuentra sólo en trazas en las aguas residuales domésticas frescas, pero en efluentes de plantas de tratamiento de nitrificación biológica, el nitrato puede encontrarse en concentraciones hasta de 30 mg/L. Es un nutriente importante para muchos autótrofos fotosintéticos y en algunos casos se ha identificado un limitante en el crecimiento. En el ambiente, las altas concentraciones de nitratos y nitritos causan la perdida de la biodiversidad. [ONU-DAES. 2005- 2015].

El nitrito es un estado de oxidación intermedio de nitrógeno, tanto en la oxidación de amoníaco a nitrato y en la reducción de nitrato. Dicha oxidación y la reducción puede ocurrir en plantas de tratamiento de aguas residuales, sistemas de distribución de agua, y las aguas naturales. Además, puede entrar en el sistema de

suministro de agua a través de su uso como un inhibidor de la corrosión en agua de proceso industrial. El nitrito es un agente etiológico actual de metahemoglobinemia. [De Esparza, María Luisa, 2000].

La formación del nitrito se presenta por la acción de bacterias nitrosomonas. La nitrificación es una etapa importante en la que ocurre la oxidación biológica del amonio con el oxígeno en nitrito. A su vez, las nitrobacter, se encargan de oxidar los nitritos hasta la formación de nitratos.

Analíticamente, los nitratos y nitrito pueden ser determinados por métodos de espectrometría ultravioleta-visible (UV/VIS), electroquímicos cromatográficos y enzimáticos entre otros. [DECRETO 1600 de 1993]. [Eugene; W.R.; Baird, R.B.; Eaton, AD.; Clesceri, L. 2012; p4-110].

3.3.1 Nitrificación

$$NH_4 + 2O_2 \longrightarrow NO^-_3 + H_2O$$

Parte del amonio producido por la descomposición se convierte en nitrato a través de un proceso llamado nitrificación. Las bacterias que llevan a cabo esta reacción obtienen energía de sí misma La nitrificación requiere presencia de oxígeno, por consiguiente, la nitrificación puede suceder solamente en capas de la superficie de los suelos y sedimentos. El proceso de nitrificación tiene algunas importantes consecuencias. Los iones de amonio tienen carga positiva y por consiguiente se pegan a partículas y materias orgánicas del suelo que tienen carga negativa. La

carga positiva proviene del nitrógeno de amonio sea lixiviado del suelo por las lluvias.

Por otra parte, el ion de nitrato con carga negativa no se mantiene en las partículas del suelo y puede ser barrido del perfil del suelo. Esto lleva a una disminución de la fertilidad del suelo y a un enriquecimiento de nitrato de las aguas corrientes de la superficie y del subsuelo. (Álzate, caravelli & zaritzky, 2017)

3.3.2 Desnitrificación

$$NO^-_3 \longrightarrow N_2 + N_2O$$

Uno de los procesos biológicos más utilizados para la eliminación de nitrógeno en las aguas residuales es la desnitrificación. El proceso de desnitrificación transforma el nitrato presente en nitrógeno gas utilizando organismos heterótrofos facultativos o autótrofos, en condiciones anóxicas (ausencia de oxígeno y presencia de nitrato). Con este proceso se completa la eliminación biológica de nitrógeno en aguas residuales. La desnitrificación requiere de una fuente de energía, orgánica o inorgánica (dador de electrones), y el nitrato o nitrito como aceptor de electrones. Algunas de las fuentes externas de carbono o dadores de electrones comúnmente encontrados en las aguas residuales son: metanol, etanol, ácido acético y el metano disuelto. Algunos autores mencionan otros compuestos como el sulfuro, que pueden utilizarse en los procesos de desnitrificación. (J. Sánchez et al, 2015) (Peñafiel, Moreno & Ochoa-Herrera, 2016)

$$NO^-_3 \longrightarrow NO^-_2 \longrightarrow NO \longrightarrow N_2O \longrightarrow NO$$

3.4 Técnicas de análisis para la determinación de nitritos y nitratos

Analíticamente, los nitratos y nitritos pueden ser determinados por métodos de espectrometría ultravioleta-visible (UV/VIS), electroquímicos, cromatográficos y enzimáticos entre otros.

Los métodos para la determinación de Nitratos en agua son complejos debido a las interferencias que se puedan encontrar y los rangos de concentración en las diferentes técnicas los cuales limitan su aplicación.

3.4.1 método colorimétrico

Principio del método: el nitrito (NO_2^-) se determina por la formación de un colorante azo 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 µg de $NO_2^- \frac{N}{L}$, y se puede aplicar al de 5 a 50 µg 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 µg N/1 con 1 cm de recorrido de luz a 543 nm. Diluyendo las muestras se pueden determinar concentraciones más altas de NO_2.

3.4.2 método espectrométrico ultravioleta selectivo

Principio del método: esta técnica se utiliza solamente para seleccionar muestras con bajo contenido en materia orgánica, es decir, aguas naturales incontaminadas

y suministros de agua potable. La curva de calibrado de NO_3 verifica la ley de Beer hasta los 11 mg N/1.

La medida de la absorción UV a 220 nm hace posible la determinación rápida de NO_3. Dado que la materia orgánica disuelta puede absorber también a 220 nm y NO_3 no lo hace a 275 nm, se puede utilizar una segunda medida a 275 nm para corregir el valor de NO_3. Esta corrección empírica dependerá de la naturaleza y concentración de la materia orgánica y puede variar de unas aguas a otras. En consecuencia, este método no es recomendable cuando se precise una corrección importante para la absorbancia de la materia orgánica, aunque puede ser útil para controlar los niveles de NO_3 en un sistema de agua con tipo con tipo constante de materia orgánica. Los factores de corrección para la absorbancia de muestras orgánicas se pueden establecer por el método de adiciones en combinación con el análisis del contenido original de NO_3 por otro método.

La filtración de la muestra tiene por objeto eliminar posibles interferencias de las partículas suspendidas. La acidificación con HCl 1/V sirve para impedir interferencias por concentraciones de hidróxido o carbonato de hasta 1.000 mg de $CaCO_3$ /1. El cloruro no afecta a la determinación.

3.4.3 Interferencias

Nitratos. Interferirá en muestras que contengan materia orgánica disuelta, agentes tensoactivos, NO_2^-, Cr^{6+}, iones inorgánicos que normalmente no se encuentran en aguas naturales, tales como clorito y clorato.

Nitritos. El tricloruro de nitrógeno (NCl_3) imparte un falso color rojo cuando se agrega el reactivo de coloración; la incompatibilidad química impide que coexistan

NO_2^-, cloro libre y NCl3. Los siguientes iones no deben estar presentes porque interfieren debido a su precipitación bajo las condiciones del ensayo: Sb_3^+, Au_3^+, Bi_3^+, Fe_3^+, Pb_2^+, Hg_2^+, Ag_2^+, cloroplatinato ($PtCl_6^{2-}$) y metavanadato (VO_3^{2-}); el ion cúprico puede causar bajos resultados porque cataliza la descomposición de la sal de diazonio

No se encontró en la literatura metodología para corregir las anteriores interferencias. En la muestra no deben estar presentes iones coloreados que alteren el sistema de color. Los sólidos suspendidos se deben remover por filtración a través de membrana con diámetro de poro de 0,45 µm.

3.5 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

3.5.1 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, etc. Durante la validación, es necesario:

- confirmar esta relación
- demonstrar 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 ± 10 % o incluso ± 20% y graficar las señales. (Eurachem, 2016)

3.5.2 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). (Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición, 2010)

Figura 1. Grafica de linealidad. (Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición, 2010)

3.5.2.1 Evaluación Estadística de la Linealidad.

El estudio de la linealidad no solo implica una representación gráfica, sino que es necesario realizar la comprobación estadística para lo cual se hizo uso de los siguientes parámetros:

3.5.2.2 Ecuación de la Recta

3.5.2.2.1 Pendiente y ordenada en el origen.

En la recta de regresión y = b*x + a, x es la concentración, y es la respuesta, b el valor de la pendiente y, a es el término independiente. La pendiente b se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad. El término independiente a, u ordenada en el origen, es la intersección

de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de cero en caso de no existir sesgo.

3.5.2.2.2 Coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r^2)

El coeficiente de correlación indica el grado entre la variable x (concentración), y la variable y (respuesta). Si r es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables.

El valor recomendable para el coeficiente de correlación es ≥ 0.999 aunque en el caso de impurezas se admite ≥ 0.990.

La información obtenida mediante el cálculo de r es limitada y no justifica por si sola la linealidad, siendo r2 coeficiente de determinación el que aporta una mayor significación estadística, ya que expresa la proporción de la variación total de y explicada por el modelo. El valor recomendable para el coeficiente de determinación es ≥0.99.

3.5.2.2.3 Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente

Se trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba de t de Student. Para un grado de significación α igual a 0.05.

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} \qquad \textbf{(Ec.1)}$$

Donde:

b: valor de la pendiente

S_b: varianza de la pendiente, viene dada por:

$$S_b = \sqrt{S_b^2} \qquad \text{(Ec.2)}$$

S_b^2: Varianza de la pendiente

$$S_b^2 = \frac{s_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \quad \text{(Ec.3)}$$

$s_{y,x}^2$: Varianza residual

$$s_{y,x}^2 = \frac{\sum e_i^2}{n-2} \quad \text{(Ec.4)}$$

e_i^2: Valor residual

3.5.2.3 Test de determinación de correlación lineal

Se puede realizar una evaluación de curva de calibración global en la cual se puede realizar una evaluación estadística de prueba t-Student, como mejor indicador de modelo lineal.

Se calcula un valor de t con n-2 grados de libertad y se compara con un valor tabulado de t para el nivel de confianza requerido (α=0.05), dos-colas, en este caso para un ‘’n’’ que depende de los niveles de calibración.

Se desea probar si existe entonces una correlación significativa: la hipótesis nula H_0 es que no existe correlación entre X e Y. Si el valor observado de tr es mayor que t_{cri}, se rechaza la hipótesis nula H_0, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad \text{(Ec.5)}$$

Donde:

t_r: Valor del estimador t-Student obtenido para el coeficiente de correlación

|r|: valor absoluto del coeficiente de correlación

n-2: Número de grados de libertad

r^2: Valor del coeficiente de determinación

3.5.3 Límite de detección

Se entiende por límite de detección la minina cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no sea necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales. 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.

3.5.3.1 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* es la desviación estándar de los análisis del blanco este se expresa en mg/L.

3.5.3.2 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.

El límite de cuantificación es entre 3 y 10 veces el límite de detección según cada caso este viene descrito en la siguiente expresión: (Richter, 2017)

$$LDM = CEb + tn-1 \times S \qquad (Ec.6)$$

Donde:

CE: concentración promedio Del estándar analizado

t: Distribución de student para un nivel de confianza Del 95% con n-1 grados de libertad

n: numero de replicas

S: Desviación estándar en el análisis de las replicas

3.5.4 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:

$$\%\text{error} = \frac{(\text{valor teórico} - \text{valor experimental})}{\text{valor teórico}} * 100 \qquad \text{(Ec.7)}$$

Porcentaje de recuperación:

$$\%\text{Recuperación} = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{\text{adición}}} * 100 \qquad \text{(Ec.8)}$$

Donde:

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

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

$x_{adición}$: Concentración añadida

A continuación, se presentan algunos criterios de aceptación útiles para la estimación de la recuperación en función de la concentración del analito según la AOAC.

Tabla 1. Valores orientativos aceptables según la AOAC para el factor de recuperación en función de la concentración del analito.

% Analito	**Relación**	**Unidades**	**R (%)**
100	1	100%	98-102
10	10^{-1}	10%	98-102
1	10^{-2}	1%	97-103
0.1	10^{-3}	0.1%	95-105
0.01	10^{-4}	100 mg/L	90-107
0.001	10^{-5}	10 mg/L	80-110
0.0001	10^{-6}	1mg/L	80-110

3.5.5 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 (Sr) y reproducibilidad (SR) se pueden calcular los límites de repetibilidad, r, y de repetibilidad, R, que permiten al analista saber si la diferencia entre análisis duplicados es significativa, en la respectivas condiciones.

3.5.5.1 Reproducibilidad

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 series medidas y se calcula de la siguiente manera: (L. Aguirre et, al 2010)

$$\mathrm{CV}(\%) = \frac{\mathrm{S}}{\overline{\mathrm{X}}} * 100 \qquad (\mathrm{Ec.}\,9)$$

Dónde:

% CV: porcentaje de coeficiente de variación

S= desviación estándar

$\overline{X}$=media aritmética de los resultados

3.5.5.2 Repetibilidad

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones de trabajo diferentes (por un mismo analista, con los mismos equipos y reactivos) (L. Aguirre et, al 2010)

3.5.5.3 Análisis de varianza (ANOVA)

La técnica ANOVA permite manejar cualquier arreglo o estructura experimental, por medio de esta es posible estimar las varianzas más exactamente, permite obtener mayor información de los datos experimentales, además permite conocer la interacción entre la repetibilidad y la reproducibilidad. Aunque para este método la computación numérica es más compleja, esta es resuelta mediante el uso de herramienta de análisis de datos (Llamosa et al, 2007).

El análisis numérico se realiza mediante el cálculo de las componentes individuales de repetibilidad y reproducibilidad. La varianza interna (Sw) para cada una de las p condiciones se estima como la desviación estándar de las n mediciones de cada condición. La repetibilidad (r) se obtiene como resultado del promedio de las p varianzas que estiman la variabilidad interna de cada condición (Freund, 1981).

$$r = \sqrt{Sr^2} = \sqrt{\sum S\,w^2} \qquad \text{(Ec.10)}$$

La reproducibilidad (R) o variabilidad entre las condiciones (S_L) se obtiene mediante la referencia de la varianza (Sm^2) de los p promedios menos la varianza representativa del ruido del experimento (Sr^2) entre la cantidad de mediciones de cada condición.

$$R = \sqrt{S_L^2} = \sqrt{Sm^2 - \frac{sr^2}{n}} \qquad \text{(Ec.11)}$$

3.5.5.4 Coeficiente de Variación (CV)

Es una medida de la variabilidad, también conocido como desviación estándar relativa (DER), cuyas unidades se expresan en tanto por ciento, el CV es un ejemplo del error relativo. Los errores relativos se utilizan con frecuencia al comparar las precisiones de los resultados que tienen diferentes unidades o magnitudes (Castro et al, 1989).

Tabla 2. Límites del coeficiente de variación para análisis de trazas en función de la concentración de analito (AOAC)

% Analito	Relación	Unidades	Cv%
10	10^{-1}	10%	2.8

1.0	10^{-2}	1%	2.7
0.1	10^{-3}	0.1%	3.7
0.01	10^{-4}	100 ppm	5.3
0.001	10^{-5}	10 ppm	7.3
0.0001	10^{-6}	1 ppm	11
0.00001	10^{-7}	100 ppb	15
0.000001	10^{-8}	10 ppb	21
0.0000001	10^{-9}	1 ppb	30

3.5.6 Incertidumbre

La incertidumbre es un intervalo asociado con un resultado de medida que expresa el intervalo de valores que razonablemente pueden atribuirse a la cantidad que se está midiendo. Una estimación de la incertidumbre debe tener en cuenta todos los efectos reconocidos que operan en el resultado. Las incertidumbres asociadas con cada efecto se combinan de acuerdo con procedimientos bien establecidos.

Se describen varios enfoques para obtener una estimación de la incertidumbre de los resultados de las mediciones químicas estos tienen en cuenta:

- la precisión a largo plazo global del método (es decir, la precisión intermedia o la reproducibilidad)
- el sesgo y su incertidumbre, incluyendo la incertidumbre estadística que corresponde a las medidas de exactitud, y la incertidumbre en el valor de referencia

- La calibración de equipos. Las incertidumbres asociadas con la calibración de equipos tales como balanzas, termómetros, pipetas y frascos son a menudo insignificantemente pequeña en comparación con la precisión global y la incertidumbre en el sesgo. Si esto se puede verificar entonces las incertidumbres de calibración no necesitan ser incluidas en la estimación de la incertidumbre
- cualquier efecto significativo que opera además de lo anterior. Por ejemplo, los intervalos de temperatura o el tiempo permitidos por el método no pueden ejecutarse plenamente en los estudios de validación, y sus efectos pueden necesitar ser añadidos. Tales efectos pueden ser útilmente cuantificados mediante estudios de robustez.

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 et al., 2016)

3.5.6.1 Tipos de incertidumbre

Tipo A: componentes que pueden ser evaluados a partir de distribuciones estadísticas de series de resultados que pueden caracterizarse por desviaciones estándar.

Tipo B: pueden caracterizarse también por desviaciones estándar, pero se evalúan a partir de distribuciones de probabilidad supuestas, basadas en la experiencia o en otro tipo de información.

3.5.6.1.1 Incertidumbre combinada (A, B)

Se plantea cuando la magnitud a medir depende de otra o varias magnitudes, es decir, medidas indirectas, por lo que la incertidumbre de la variable a medir depende de la de otro parámetro ya medido de forma directa o indirecta. Para que sea aplicable la teoría que va a exponerse, es necesario que todas las medidas se realicen con las mismas condiciones, por lo que debe utilizarse el mismo instrumento y escala para medir una magnitud dentro de todo el proceso experimental, igualmente en lo posible mantener las condiciones ambientales, así como cualquier otro factor que pueda afectar la medición (Lesmes, 2001).

3.5.6.1.2. Incertidumbre Expandida (U)

Proporciona un intervalo en el cual el valor de la medida es determinado con un alto nivel de confianza. (U) es obtenida por el producto entre la incertidumbre estándar combinada con un factor de cobertura k.

El valor del factor de K está basado en el nivel de confianza requerido. Para un nivel de confianza aproximadamente del 95%, K es 2 (Lesmes, 2001).

El factor de cobertura K, depende de nivel de confianza requerido. Para la mayoría de los propósitos se recomienda k igual a 2. Sin embargo, este valor puede ser insuficiente cuando la incertidumbre combinada está basada en observaciones estadísticas con pocos grados de libertad. La escogencia de este factor depende del número de grados de libertad efectivos.

La incertidumbre combinada está dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{U_{ci}}{C_i} = \sqrt{\left[\frac{U_a}{a}\right]^2 + \left[\frac{U_b}{b}\right]^2 + \left[\frac{U_c}{c}\right]^2 + \cdots \left[\frac{U_n}{n}\right]^2} \qquad \text{(Ec.13)}$$

$$U_c = U*C \qquad \text{(Ec.14)}$$

Donde:

Ua, Ub, Uc… Un, corresponden a la incertidumbre o tolerancia de cada una de las fuentes involucradas en el cálculo de la incertidumbre, a, b, c… n, corresponden a las magnitudes de dichas fuentes de incertidumbre y Ci corresponden a la concentración para la cual se está determinando la incertidumbre.

La incertidumbre expandida está dada por:

$$U = K*U_c \qquad \text{(Ec.15)}$$

Donde:

K: es el factor de cobertura

U_c: es la incertidumbre combinada.

3.5.6.2 Identificación de las fuentes de incertidumbre

Una vez determinado el mensurando, el principio, el método y el procedimiento de medición, se identifican las posibles fuentes de incertidumbre. Éstas provienen de los diversos factores involucrados en la medición, por ejemplo:

- Los resultados de la calibración del instrumento.
- La incertidumbre del patrón o del material de referencia.
- La repetibilidad de las lecturas.
- La reproducibilidad de las mediciones por cambio de observadores, instrumentos u otros elementos.
- Características del propio instrumento, como resolución, histéresis, deriva, etc.
- La definición del propio mensurando.
- El modelo particular de la medición.
- Variaciones en las magnitudes de influencia.

No es recomendable desechar alguna de las fuentes de incertidumbre por la suposición de que es poco significativa sin una cuantificación previa de su contribución, comparada con las demás, apoyadas en mediciones. Es preferible la inclusión de un exceso de fuentes que ignorar algunas entre las cuales pudiera detectarse alguna importante, No obstante, siempre estarán presentes efectos que la experiencia, conocimientos y actitud crítica del metrólogo permitirán calificar como irrelevantes después de las debidas consideraciones (Lesmes, 2001).

3.5.6.3 Cuantificación de los componentes de la incertidumbre

Para convertir cada componente de la incertidumbre a su respectiva incertidumbre estándar, u(x), se emplean los siguientes criterios para seleccionar el tipo de función de distribución que presenta el componente en cuestión (ver tabla 3):

Tabla 3. Funciones de Distribución para cálculo de Incertidumbre.

Distribución	**Significado**	**Se utiliza cuando**	**Incertidumbre**
Rectangular	Cada valor en el intervalo tiene la misma probabilidad de suceder.	Un certificado u otra especificación establece límites (±a) sin especificar un nivel de confianza, o cuando se hace un estimado en la forma de un intervalo (±a) sin conocimiento del tipo de distribución.	$U(x) = \frac{a}{\sqrt{3}}$ (Ec.16)
Triangular	La probabilidad de ocurrencia es mayor para valores en el centro del intervalo y menor hacia los limites	Los valores cercanos a x son más frecuentes que los cercanos a los límites (±a), o cuando se hace una estimación en la forma de un intervalo (±a) descrito por una distribución simétrica	$U(x) == \frac{a}{\sqrt{6}}$ (Ec.17)

Normal	Los datos varían aleatoriamente con distribución normal de probabilidad	Se obtiene un estimado por observaciones repetidas. Se reporta una incertidumbre como desviación estándar relativa o coeficiente de variación, sin que se especifique la distribución.Se reporta una incertidumbre en la forma de un intervalo de confianza (c), sin que se especifique la distribución.	$u(x) = s$ (Ec. 18) $u(x) = s * u(x) = x(s/\bar{x})$ (Ec. 19) $u(x) = x * CV$ /100 (Ec. 20) $u(x) = \frac{c}{2 \text{ ó } 3}$ (Ec. 21) Para 95 o 99,7%

Fuente. Lemes, L. 2001.

5. Espectrofotometría de UV-Vis

5.1 Generalidades

La espectroscopía de UV-Vis utiliza la radiación del espectro electromagnético, cuya longitud de onda está comprendida entre 100 y los 800 nm (energía comprendida

entre las 286 y 36 kcal mol-1) y su efecto sobre la materia es producir transiciones electrónicas entre los orbitales atómicos y/o moleculares de la sustancia. En algunos casos, los efectos y la detección pueden llegar al IR cercano (800 – 900 nm). En la espectroscopía UV-Vis, una especie química (en general una molécula, aunque puede tratarse de una especie monoatómica, un ion o un complejo) absorbe UV-Vis, y la energía adquirida por el sistema causa la transición de un electrón de un estado basal o fundamental (EF) a uno excitado (EE). La energía de la transición está relacionada con la longitud de onda de la radiación a través de la ecuación de Planck.

Un gráfico o representación de la respuesta del sistema en función de la longitud de onda o frecuencia se denomina espectro. En general en los espectros UV-Vis, se observa una señal debida a cada transición electrónica del EF al EE. Los átomos dan líneas agudas, mientras que las moléculas poliatómicas dan señales en forma de bandas puesto que la absorción de luz involucra también energía suficiente para causar cambios en energía vibracional y rotacional de cada uno de sus estados electrónicos en el EE, tal como ocurre cuando se irradia al EF con luz infrarroja. En este caso, se originan líneas de absorción de diferentes intensidades que no se resuelven con la aparición de un continuo o banda. Para una sustancia determinada, la longitud de onda a la cual se produce el máximo de absorbancia en el espectro se conoce como λmáx.

La señal espectral permite, por un lado, identificar algunos grupos funcionales presentes en las moléculas y, por el otro, estimar la concentración de una sustancia.

La espectrometría es la técnica espectroscópica usada para evaluar la concentración de una especie y utiliza un instrumento llamado espectrómetro.

En el caso de la espectrometría que utiliza fotones (UV-Vis, IR), se suele llamar espectrofotometría.

Para la medición de la intensidad de la absorción se usan espectrofotómetros en los cuales se pueden medir la absorbancia o la transmitancia.

5.2 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 λ 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:

$$A = -\log T = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \qquad \text{(Ec.22)}$$

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:

$$A = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon c l \qquad \text{(Ec.23)}$$

Donde:

A: absorbancia medida.

I: intensidad de la luz transmitida.

I_0: intensidad de la luz incidente.

ε: coeficiente de absorción molar, característico de cada sustancia absorbente a cada longitud de onda.

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

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

5.3 Instrumentación

El instrumento usado en la espectrofotometría UV-Vis se denomina espectrofotómetro UV-Vis, y permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto de una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia. Se mide la transmitancia de la muestra que se expresa habitualmente como porcentaje (%T) o bien Absorbancia A.

5.3.1 Partes básicas del espectrofotómetro.

El equipo se compone generalmente de una fuente de luz (por lo general una lámpara incandescente de tungsteno para las longitudes de onda en el rango visible, o una lámpara de arco de deuterio en el ultravioleta), un soporte para la muestra, una red de difracción o monocromador para separar las diferentes longitudes de

onda de la luz, y un detector. El detector suele ser un fotodiodo o un CCD. (Litter et al, 2009).

6. NORMATIVIDAD

En Colombia la norma estipulada para la calidad de agua regida por la Resolución 2115 de 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, estipula que la concentración máxima permisible de Nitritos es de 0.1 mg/L y para Nitratos 10 mg/L. (Minambiente, 2007).

7. METODOLOGÍA

7.1 Materiales

- Erlenmeyeres, 250 mL, SCHOTT Duran
- Probetas de 100 mL, In 20 ºC +/- 1 mL
- Probetas de 250 mL, In 20 ºC +/- 1 mL
- Pipeta graduada de 1 mL, Ex 20 ºC +/- 0.001mL
- Pipeta graduada 5 mL, Ex 20 ºC +/- 0.005mL
- Pipeta graduada 10 mL, Ex 20 ºC +/- 0.05mL
- Pipeta graduada 25 mL, Ex 20 ºC +/- 0.05mL
- Pipeta graduada 50 mL, Ex 20 ºC +/- 0.05mL
- Balones aforados de 1L, LMS, Ex 20 ºC +/- 0.004mL
- Balones aforados de 100 mL LMS, Ex 20 ºC +/- 0.1mL

- Transferpipeta, (100-1000)uL
- Transferpipeta, (10-100)uL
- Frasco lavador
- Beakers de 50 mL
- Beakers de 500 mL
- Beakers de 1000 mL
- Termómetro de 100°C
- Termómetro 250°C

7.2 Equipos

- Balanza analítica OHAUS Pioneer
- Horno Binder
- Espectrómetro ultravioleta visible UV-VIS (GENESYS^{TM} 10S)
- pH-metro METROHM 691

7.3 Reactivos

- Solución estandar de Nitrato 1000 ppm
- Solución estandar de Nitrito 1000 ppm
- Agua libre de nitrito
- Agua libre de nitrato
- Ácido fosfórico, H_3PO_4, 85 %
- Sulfanilamida
- Diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina
- Ácido sulfúrico,H_2SO_4, concentrado 95-97 %,
- Ácido clorhídrico, HCl, 1N

7.4 Estandarización del método

Para la determinación de nitrógeno se siguió los procedimientos establecidos en el Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 2017.; métodos propuestos para la determinación de nitritos y nitratos.

7.4.1 Preparación de reactivos

Nitritos

- **Patrones de calibración**: Se prepararon a partir de la solución estándar por dilución en serie. Los patrones de calibración que se prepararon tuvieron concentraciones de 0.00mg/L, 0.010 mg/L, 0.025 mg/L, 0.500 mg/L, 1.000 mg/L, 2.000 mg/L.
- **Reactivo colorante**: a 800 mL de agua se le adicionaron 100 mL de ácido fosfórico H_3PO_4 al 85%; 10g de sulfanilamida. Luego de disolver completamente la sulfanilamida se agregó 1g de diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina. Al estar completamente mezclado se diluyó hasta 1 L con agua destilada.
- **Curva de calibrado:** se realizó la curva de calibración con los 6 patrones de calibración previamente preparados y un blanco, cada análisis se hará por triplicado.

Se graficó la concentración vs absorbancia de cada patrón para definir visualmente el intervalo lineal.

- **Análisis de Nitritos**

Tratamiento de las muestras

Para el análisis de Nitritos, se recolectaron muestras de agua natural (escorrentía de la troncal terminal de transporte de montería) y residual (registro final-salida Unicor) y se refrigeraron a 4°C, sin la adición de reactivos.

Análisis de muestras

Se midieron 50 ml de muestra y se transvasaron a un Erlenmeyer de 250 ml, posteriormente se añadió 2,00 ml de solución colorante, seguidamente se agitó la solución. Se pasó una pequeña porción a la cubeta del fotómetro de UV-VIS y se midió la absorbancia entre 10 minutos y 2 horas a 543 nm.

Nitratos

- **Patrones de calibración**: Se prepararon a partir de la solución estándar por dilución en serie. Los patrones de calibración que se prepararon tuvieron concentraciones de 0.00mg/L, 0.50 mg/L, 1.00 mg/L, 2.00 mg/L, 3.00 mg/L, 5.00mg/mL, 7.00mg/L.
- **Curva de calibrado:** se realizara la curva de calibración con los 7 patrones de calibración previamente preparados y un blanco, cada análisis se hará por triplicado.

Se graficó la concentración vs absorbancia de cada patrón para definir visualmente el intervalo lineal.

- **Análisis de Nitratos**

Tratamiento de las muestras

Para el análisis de Nitratos, se recolectaron muestras de agua potable (grifo Unicor), natural (escorrentía de la troncal terminal de transporte de montería) y residual (registro final-salida Unicor) y se refrigeraron a 4°C, sin la adición de reactivos.

Análisis de muestras

Se midieron 50 ml de muestra y se transvasaron a un Erlenmeyer de 250 ml, posteriormente se añadió1 ml de solución HCl 1N, seguidamente se agitó la solución. Se pasó una pequeña porción a la cubeta del fotómetro de UV-VIS y se midió la absorbancia a 220 y 275 nm respectivamente.

7.5 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

7.5.1 Linealidad e Intervalo lineal

Para evaluar la linealidad, se prepararon 6 soluciones patrones a partir de la solución estándar de nitritos 1000 mg/L, que comprendió valores entre 0,00 y 2,00 mg/L de nitrato y, 6 patrones a partir de la solución estándar de nitratos 1000mg/L, que comprendió valores entre 0,00 y 7,00 mg/L. cada nivel de concentración se analizó bajo las mismas condiciones de trabajo. Seguidamente se construyó una curva de para la determinación del intervalo lineal, con los valores de la absorbancia obtenidos en función de las concentraciones en mg/L de las soluciones patrones.

Se tomó visualmente la linealidad a partir de la curva de calibrado ya mencionada. Se calculó la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, varianza de la pendiente, varianza de los residuales, así como también se aplicó un test de significación estadística de la desviación estándar de la pendiente, test de determinación de correlación lineal, finalizando con un análisis de la variancia (ANOVA) sin antes cumplir los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad de los residuales.

Intervalo lineal

Se estableció a partir de la curva de calibración, donde se observó linealidad.

7.5.2 Límites de Detección

Nitritos

7.5.2.1 Límite de detección instrumental

Se prepararon 6 blancos independientes, tomando 50,00 mL de agua destilada, con la posterior adición de 2,00 mL de solución colorante y se analizaron a 540 nm, se calculó la desviación estándar y se halló el límite de detección instrumental con la siguiente ecuación:

$$LDI = 1{,}645 * S_b \qquad \text{(Ec.24)}$$

S_b: Desviación estandar de los blancos (como concentración)

7.5.2.2 Límite de detección del método

Se prepararon y se analizaron 6 réplicas para nitritos y 10 réplicas para nitratos de una concentración cuatro veces mayor al límite de detección instrumental. Luego se halló la concentración promedio, posteriormente se reemplazaron los datos en la (Ec 6), Con un *t-student* del 99% de confianza para un n-1.

7.5.2.3 Límite de cuantificación

Se tomó como el primer punto de la curva de calibrado.

Nitratos

Límite de detección instrumental

Se prepararon 10 blancos independientes, tomando 50,00 mL de agua destilada, con la posterior adición de 1,00 mL de solución HCl 1N y se analizaron a 540 nm, se calculó la desviación estándar y se halló el límite de detección instrumental.

Para el cálculo de límite de detección del método y de cuantificación, se procedió igual que en los cálculos de nitritos.

7.5.4 Precisión

Se evaluó la repetibilidad y la reproducibilidad en tres niveles de concentración que cubrieron el intervalo lineal.

Repetibilidad: Se analizaron 6 réplicas de estándares (baja, media y alta concentración) respecto al rango lineal que se obtuvo a partir de la linealidad, el procedimiento analítico se aplicó bajo las mismas condiciones de operación (mismo día, analista, equipo y reactivos). Se determinó 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.*

$$G_{exp} = \frac{S^2_{maxima}}{\sum S_i^2} \qquad \text{(Ec.25)}$$

Donde:

S_i^2*:* Varianza de cada grupo k

S^2_{maxima} : Varianza máxima de los grupos k

Reproducibilidad: Se analizaron 6 réplicas de estándares (baja, media y alta concentración) respecto al rango lineal que se obtuvo a partir de la linealidad, el procedimiento analítico se aplicó bajo diferentes condiciones de operación (diferente analista, diferente día, mismo equipo y mismos reactivos). Se determinó la reproducibilidad como el coeficiente de variación. Se compararon las medias de la medidas en los diferentes días mediante una prueba t, para determinar si existe diferencia significativa al nivel de confianza de 95% (α=0.05).

$$t_{calc} = \frac{|X_1 - X_2|}{S\sqrt{\left(\frac{1}{n_1}+\frac{1}{n_2}\right)}} \qquad \text{(Ec.26)}$$

Donde:

X_1: media de medidas día 1

X_2: media de medidas día 2

n_1: número de medidas día 1

n_1: número de medidas día 2

S: viene dada por

$$S^2 = \frac{(n_1-1)S_1^2+(n_2-1)S_2^2}{n_{1+}n_2-2} \qquad \text{(Ec.27)}$$

7.5.5 Exactitud

Se prepararon y se analizaron por triplicado estándares a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) que cubrieron el intervalo lineal, a estos se les calculó el porcentaje de error dado por la (Ec. #7).

Para determinar el porcentaje de recuperación, se doparon muestras de agua natural, potable y residual de concentración desconocidas con cantidades conocidas de patrón de nitratos y, muestras de agua natural y residual para nitrito, este procedimiento se realizó a tres niveles de concentración. Para la determinación del porcentaje de recuperación se tuvo en cuenta la (Ec. #8).

7.5.6 Incertidumbre

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

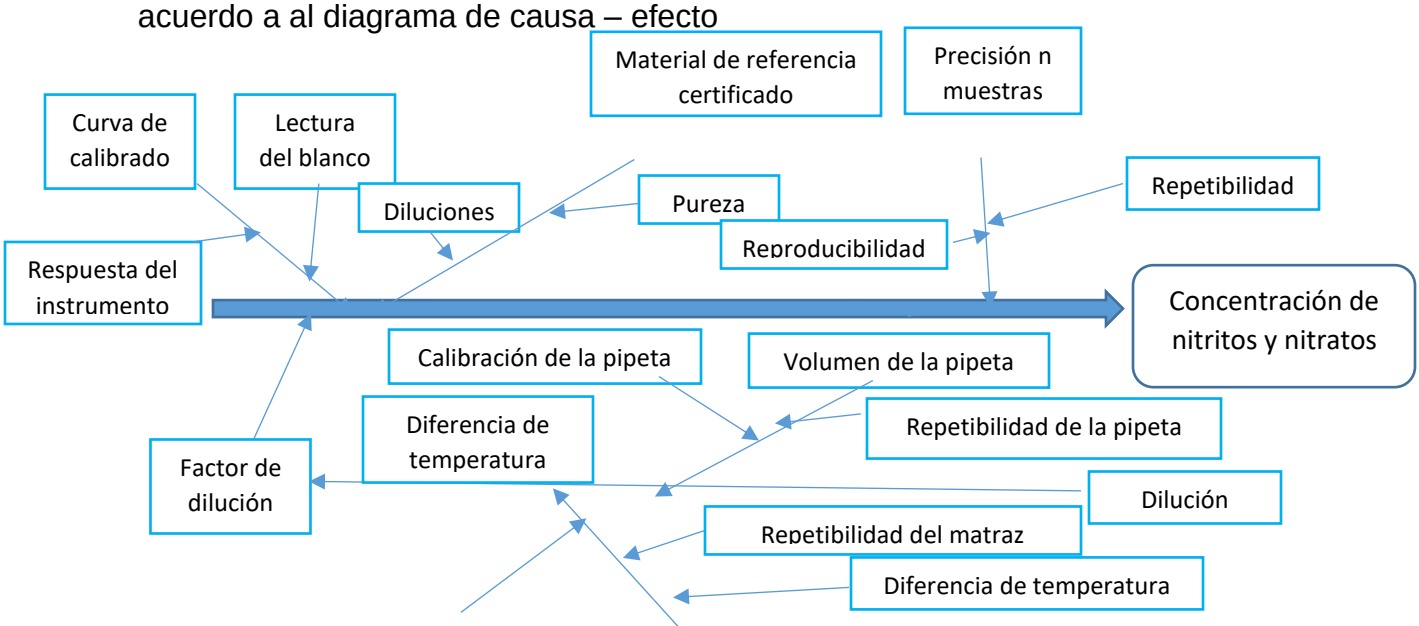

Figura 2. Fuentes de incertidumbre involucradas en el método de medición para Nitritos y Nitratos.

7.5.7 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 certificado.
- Incertidumbre debido a la repetibilidad y reproducibilidad.
- Incertidumbre debido a la preparación de los estándares.
- Incertidumbre debido a la alícuota del estandar.
- Incertidumbre de la medición de la alícuota de la muestra
- Incertidumbre debido a la preparación y medición del volumen del reactivo colorante.

Se utilizaron las ecuaciones 13, 14, 15 para calcular la incertidumbre de las mediciones que se asociaron a todas las fuentes señaladas. Se calculó el cuadrado de la incertidumbre obtenida, posteriormente se halló la incertidumbre total combinada con la (Ec. 15) y finalmente se obtuvo la incertidumbre final expandida, con un nivel de confianza aproximadamente del 95%, con un factor de cobertura k=2.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 NITRITOS

8.1.1 Linealidad e intervalo lineal

Para evaluar la linealidad se analizaron las soluciones de calibración, las cuales comprenden concentraciones de 0.00 mg/L, 0,01 mg/L, 0,03 mg/L, 0,50 mg/L, 1,00 mg/L, 2,00 mg/L de NO_2^- y se obtuvieron las absorbancias de cada una de ellas. (Ver anexo A)

La tabla 4 muestra las concentraciones máximas y mínimas del intervalo lineal y las absorbancias de cada una de ellas, para el análisis de nitritos, cada nivel de concentración fue preparado por dilución a partir de una solución de 10 mg/L que parte de una solución estándar de 1000 mg/L de NO_2^-.

Tabla 4. Datos para la determinación del rango lineal de nitritos

Concentración (mg/L)	Absorbancia promedio
0,00	0,001
0,01	0,012
0,03	0,023
0,50	0,447
1,00	0,887
2,00	1,753

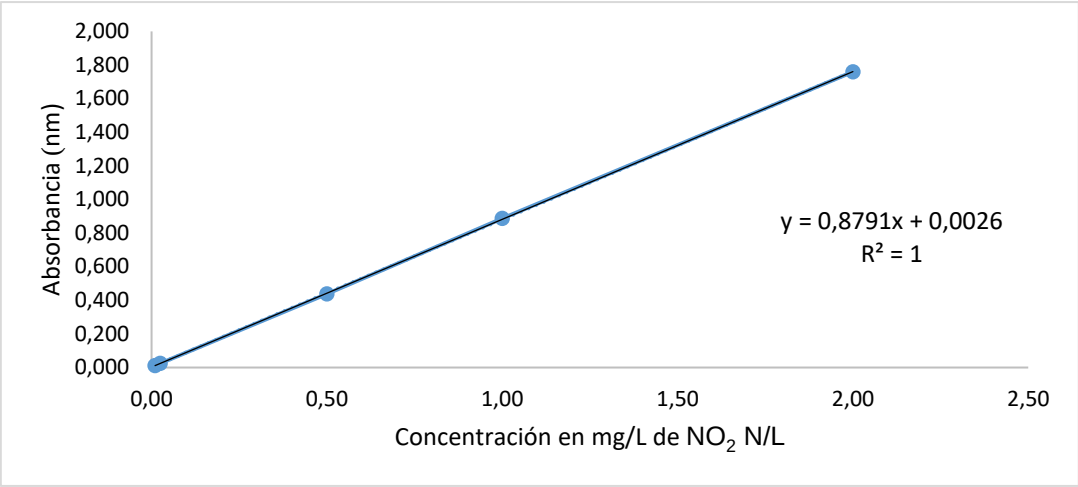

Figura 3. Determinación del intervalo lineal para nitritos

De la gráfica obtenida se puede observar que el intervalo de trabajo comprende valores que van desde 0,01 mg/L hasta 2,00 mg/L.

Se hizo un análisis de la curva de calibrado y se obtuvo la ecuación de la recta de la forma Y = A + Bx

A = 0,0026
B = 0,8791

Obteniéndose la ecuación

$$Y = 0{,}8791\ X + 0{,}0026 \qquad \text{(Ec.28)}$$

Se encontró que el coeficiente de correlación es r = 1 y el coeficiente de determinación es r^2 = 1, lo que indica una alta correspondencia entre la concentración y la señal analítica obtenida de las determinaciones realizadas con un 95% de confiabilidad.

Primeramente, se hizo un test de rechazo para descartar los datos anómalos, utilizando el contraste de Grubbs, encontrándose que no existen datos anómalos, debido a que $T_{calculado} < T_{tablas}$., por consiguiente se acepta la hipótesis nula, H_0: No hay datos atípicos en la muestra. Ver la tabla 5.

Tabla 5. Test de rechazo para linealidad de nitritos

Contrastes de Grubbs	T(valor mínimo)	T(valor máximo)	T(tabla n:6 α: 0,05)
	0,74	1,77	2,29

Se evaluaron los datos obtenidos mediante la prueba de Grubbs para rechazo de datos atípicos. Se observa que los T calculados, tanto como para el valor mínimo como máximo son menores al valor T crítico de 2,29, por lo que no se rechaza ningún dato.

8.3 Límite de detección y cuantificación

Para la determinación del límite de detección del método se analizaron 6 blancos independientes y se calculó desviación estándar de las concentraciones y se reemplazó en la ecuación 6.

Tabla 6. Determinacion del límite de detección del método para nitritos

LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO	
BK	
Absorbancia	Concentración
0,000	0,00
0,001	0,00
0,000	0,00
0,001	0,00
0,001	0,00
0,000	0,00
S	0,0004
Promedio	0,003
LDM	0,002

A partir de los datos anteriores se calculó el límite de detección instrumental haciendo uso de la ecuación 6.

Tabla7 .determinación del Límite de detección instrumental para nitritos

Límite de detección instrumental	
S	0,0004
LDI	0,001

Para la determinación del límite de cuantificación se analizaron 6 réplicas a una concentración de 0,01 mg/L.

Tabla 8.determinación del límite de cuantificación del método para nitritos

Absorbancia	Concentración
0,012	0,011
0,011	0,010
0,012	0,012
0,012	0,012
0,011	0,011
0,010	0,010
Promedio	0,010
S	0,0009
LCM	0,010

8.1.2 Precisión

Repetibilidad

Se avaluó a tres niveles de concentración por triplicado independientemente, por el mismo analista, el mismo, ver tabla 9.

Tabla 9. Repetibilidad para nitritos

Concentración	Estandar bajo [0,05 mg/L]	Estandar medio [1,00 mg/L]	Estandar alto [1,60 mg/L]
[mg/L promedio calculada]	0,05	1,05	1,62
Coeficiente de variación (%cv)	6,38	7,49	5,13

Teniendo en cuenta la tabla 9, se definió este parámetro en términos de porcentaje de coeficiente de variación (%CV) para los tres niveles de concentración (Bajo: 6,38 %; Medio: 7,49 %; Alto: 5,13 %). Según la tabla 9, se observa que los coeficientes de variación están por debajo de los límites establecidos por la AOAC, para un nivel de concentración próximo a 1 ppm se acepta como coeficiente de variación 6,38 y 7,49%, teniéndose en cuenta que para la concentración de 1,6 ppm se podría aceptar como límite el valor 5,13 %, y también se encuentran por debajo del 10%, valor establecido por el IDEAM por lo tanto se cumplen con las especificaciones establecidas.(ver datos completos tabla D1).

Reproducibilidad

Para evaluar la reproducibilidad se tomaron los datos de la evaluación de la repetibilidad como analista 1, día 1 y se hicieron análisis a los mismos tres niveles de concentración en diferentes días (día 2) y diferente analista (Analista2).Ver la tabla 10.

Tabla 10. Reproducibilidad nitritos

Analistas	Estándar bajo [0,05 mg/L]	Estándar medio [1,00 mg/L]	Estándar alto [1,60 mg/L]
Concentración promedio analista 1	0,05	1,05	1,62
Concentración promedio analista 2	0,05	0,97	1,65
CV (%)	6,12	7,76	5,15

La reproducibilidad definida como coeficiente de variación (%CV), evaluada a tres niveles de concentración baja, media y alta con 6,12 %, 7,76 % y 5,15% respectivamente, cumple con las especificaciones establecidas por la AOAC, y además están por debajo del 10% según el IDEAM.

Se comparó las medias de cada nivel de concentración en días diferentes, a partir de un test de t-Student usando la (Ec. 26) para un nivel de significancia de 0.05, con $(n_1 + n_2 - 2)$ grados de libertad. Ver la tabla 11.

Tabla 11. Prueba de Grubbs para rechazo de datos atípicos – nitritos

Estándar	Estándar bajo [0,05 mg/L]	Estándar medio [1,00 mg/L]	Estándar Alto [1,60 mg/L]
T de rechazo de datos (valor mínimo)	1,77	1,68	1,78
T de rechazo de datos (valor máximo)	1,38	1,40	1,63
T rechazo al 95%	2,29	2,29	2,29

Se evaluaron los datos obtenidos mediante la prueba de Grubbs para rechazo de datos atípicos. Se observa que los T calculados, tanto como para el valor mínimo

como máximo son menores al valor T crítico de 2,29, por lo que no se rechaza ningún dato

8.1.3 Exactitud

Porcentaje de Error

Se determinó la exactitud utilizando estándares a tres niveles de concentración y expresada como porcentaje de error. Ver la tabla 12.

Tabla12. Porcentaje de error nitritos

Analistas	Estándar bajo [0,05 mg/L]	Estándar medio [1,00 mg/L]	Estándar alto [1,60 mg/L]
Concentración promedio analista 1	0,05	1,05	1,62
Error (%)	0,58	4,93	1,38
Concentración promedio analista 2	0,05	0,97	1,65
Error (%)	0,93	3,04	3,33

Los porcentajes de error son menores al 10%, valor aceptado por el IDEAM.

A un nivel de concentración más alto, se observó un valor mayor en cuanto a los demás niveles.

Porcentaje de Recuperación

Se determinó la concentración de nitritos a muestras de agua natural, potable y residual, sin adicionados y con adicionados de 0,40 mg/L para el estandar bajo y 1,00 mg/L para el estandar alto. Luego se calculó el porcentaje de recuperación obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 13. Porcentaje de recuperación nitritos

Recuperación entre analistas	Agua natural adicionado bajo	Agua natural adicionado alto	Agua potable adicionado bajo	Agua potable adicionado alto	Agua residual adicionado bajo	Agua residual adicionado alto
% Recuperación analista 1	115,0	118,6	100,0	101,8	87,0	115,0
% Recuperación analista 2	110,9	118,7	98,0	101,5	83,0	113,0

Se obtuvo mejores valores en porcentajes de recuperación para el agua potable que para el agua natural y residual, por otra parte, las matrices de agua natural y residual mostraron valores mayores de recuperación en los adicionados altos.

Mientras tanto los porcentajes de recuperación en los dos tipos de agua están dentro de los límites establecidos por la AOAC (80% –110%). (Ver Anexo D).

8.1.4 Incertidumbre

Con el objetivo de establecer las contribuciones a la incertidumbre del método de análisis de nitritos por espectrofotometría de UV-VIS, esta se calculó a tres niveles de concentración: baja, media, alta. Se utilizó una plantilla realizada en el programa Excel obteniéndose la incertidumbre de 0,05 ± 0,028 mg/L para nivel bajo, 1,00 ± 0.038 mg/L para nivel medio y 1,60 ± 0.060 mg/L para nivel alto, ver tablas 14,15 y 16.

tabla14. incertidumbre combinada total para patrón bajo – nitritos

INCERTIDUMBRE COMBINADA TOTAL		
nivel Bajo	**cuadrado**	**FUENTES**
4,03E-03	1,62E-05	**IER Estándar certificado**
1,55E-02	2,41E-04	**IER preparación estándar bajo**
1,79E-03	3,22E-06	**IER Reactivo colorante**
1,03E-02	1,07E-04	**IER Volumen Reactivo colorante**
4,44E-03	1,97E-05	**IER Medición muestra**
1,84E-02	3,37E-04	**IER Repetibilidad**
2,76E-01	7,59E-02	**Reproducibilidad**
5,62E-02	3,16E-03	**curva de calibrado**
Sumatoria	7,98E-02	
Raíz	2,82E-01	
INCERTIDUMBRE FINAL EXP	0,050	
2,8E-02	0,028	
El valor es reportado como		
0,050	±	0,028

Tabla 15. incertidumbre combinada total para patrón medio – nitritos

INCERTIDUMBRE COMBINADA TOTAL			
nivel medio	**cuadrado**	**FUENTES**	
4,03E-03	1,62E-05	**IER Estándar certificado**	
1,42E-02	2,01E-04	**IER preparación estándar medio**	
1,79E-03	3,22E-06	**IER Reactivo colorante**	
1,03E-02	1,07E-04	**IER Volumen Reactivo colorante**	
4,44E-03	1,97E-05	**IER Medición muestra**	
1,76E-03	3,09E-06	**IER Repetibilidad**	
9,28E-04	8,62E-07	**Reproducibilidad**	
2,72E-03	7,40E-06	**curva de calibrado**	
Sumatoria	3,58E-04		
Raíz	1,89E-02		
INCERTIDUMBRE FINAL EXP			1,000
3,8E-02			0,038
El valor es reportado como			
1,000	±	0,038	

Tabla 16. incertidumbre combinada total para patrón alto

INCERTIDUMBRE COMBINADA TOTAL			
nivel alta		**cuadrado**	**FUENTES**
	4,03E-03	1,62E-05	**IER Estándar certificado**
	1,33E-02	1,77E-04	**IER preparación estándar medio**
	1,79E-03	3,22E-06	**IER Reactivo colorante**
	1,03E-02	1,07E-04	**IER Volumen Reactivo colorante**
	4,44E-03	1,97E-05	**IER Medición muestra**
	4,46E-03	1,99E-05	**IER Repetibilidad**
	1,94E-03	3,76E-06	**Reproducibilidad**
	2,07E-03	4,27E-06	**curva de calibrado**
Sumatoria		3,51E-04	
Raíz		1,87E-02	
INCERTIDUMBRE FINAL EXP			1,6
	6,0E-02		0,060
El valor es reportado como			
	1,600	±	0,060

8.2 NITRATOS

8.2.1 Linealidad e intervalo lineal

Para evaluar la linealidad se analizaron las soluciones de calibración, las cuales comprenden concentraciones de 0,50 mg/L, 1,00 mg/L, 2,00 mg/L, 3,00 mg/L, 5,00 mg/L, 7,00 mg/L de NO_3^- y se obtuvieron las absorbancias de cada una de ellas. (Ver anexo H)

La tabla 17 muestra las concentraciones máximas y mínimas del intervalo lineal y las absorbancias de cada una de ellas, para el análisis de nitratos, cada nivel de concentración fue preparado por dilución a partir de una solución estandar de 1000 mg/L de NO_3^-.

Tabla 17. Datos para la determinación del rango lineal de Nitratos

Concentración (mg/L)	Absorbancia promedio
0,50	0,027
1,00	0,052
2,00	0,117
3,00	0,175
5,00	0,300
7,00	0,415

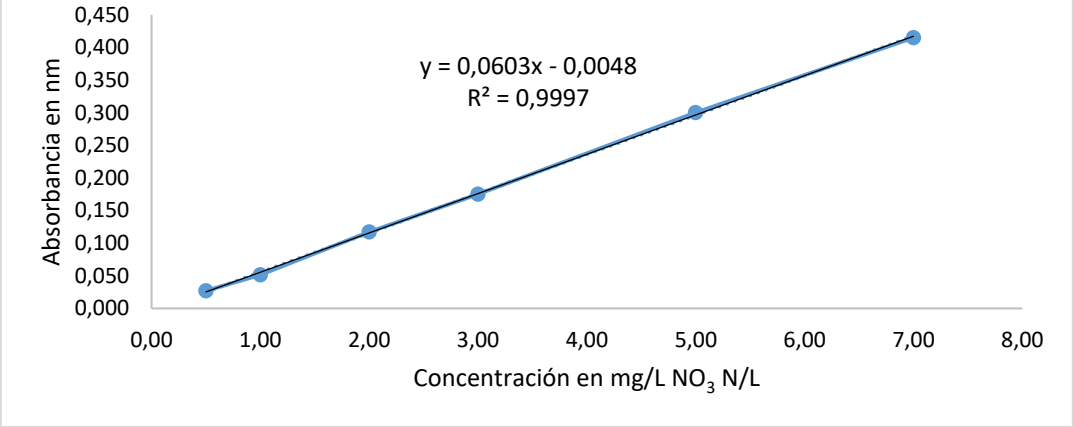

Figura 4. Determinación del intervalo lineal para nitratos

De la gráfica obtenida se puede observar que el intervalo de trabajo comprende valores que van desde 0,50 mg/L hasta 7,00 mg/L.

Se hizo un análisis de la curva de calibrado y se obtuvo la ecuación de la recta de la forma Y = Bx - A

A = 0,0048
B = 0,0603

Obteniéndose la ecuación

$$Y = 0,0603\ X - 0,0048 \quad \text{(Ec.29)}$$

Se encontró que el coeficiente de correlación es r = 0,9999 y el coeficiente de determinación es r^2 = 0,9997, lo que indica una alta correspondencia entre la

concentración y la señal analítica obtenida de las determinaciones realizadas con un 95% de confiabilidad.

Primeramente, se hizo un test de rechazo para descartar los datos anómalos, utilizando el contraste de Grubbs, encontrándose que no existen datos anómalos, debido a que $T_{calculado} < T_{tablas}$., por consiguiente se acepta la hipótesis nula, H_0: No hay datos atípicos en la muestra. Ver la tabla 18.

Tabla18. Test de rechazo – nitratos

Contrastes de Grubbs	T(valor mínimo)	T(valor máximo)	T(tabla n:6 α= 0,05)
	1,02	1,55	2,23

8.2.3 Límite de detección y cuantificación

Para la determinación del límite de detección del método se analizaron 10 blancos independientes y se calculó desviación estándar de las concentraciones y se reemplazó en la ecuación 6.

Tabla 19. Determinacion del límite de detección del método- nitratos

LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO	
BK	
Absorbancia	Concentración
0,003	0,13
0,001	0,10
0,000	0,08
0,002	0,11
0,002	0,11
0,003	0,13
0,001	0,10
0,001	0,10
0,000	0,08
0,000	0,08
S	0,0192
Promedio	0,10
LDM	0,054

A partir de los datos anteriores se calculó el límite de detección instrumental haciendo uso de la ecuación 6.

Tabla 20.determinación Límite de detección instrumental – nitratos

Límite de detección instrumental	
S	0,0192
LDI	0,032

Para la determinación del límite de cuantificación se analizaron 10 réplicas a una concentración de 0,5 mg/L.

Tabla 21.determinación del límite de cuantificación del método – nitratos

Absorbancia	Concentración
0,026	0,53
0,025	0,48
0,023	0,53
0,028	0,54
0,024	0,48
0,029	0,46
0,027	0,53
0,030	0,51
0,026	0,54
0,024	0,49
Promedio	0,51
S	0,0297
LCM	0,51

8.2.4 Precisión

Repetibilidad

Se avaluó a tres niveles de concentración por triplicado independientemente, por el mismo analista, el mismo, ver tabla 22.

Tabla 22. Repetibilidad – nitratos

Concentración	Estandar bajo [1,00 mg/L]	Estandar medio [3,00 mg/L]	Estandar alto [5,00 mg/L]
[mg/L promedio calculada]	1,10	3,01	5,04
Coeficiente de variación (%cv)	1,39	1,89	1,13

Teniendo en cuenta la tabla 22, se definió este parámetro en términos de porcentaje de coeficiente de variación (%CV) para los tres niveles de concentración (Bajo: 1,39 %; Medio: 1,98 %; Alto: 1,13 %). Según la tabla 22, se observa que los coeficientes de variación están por debajo de los límites establecidos por la AOAC, para un nivel de concentración próximo a 1 ppm se acepta como coeficiente de variación 1,39 %, teniéndose en cuenta que para la concentración de 3,00 y 5,00 ppm se podría aceptar como límite el valor de 1,98 y 1,13 %, y también se encuentran por debajo del 10%, valor establecido por el IDEAM por lo tanto se cumplen con las especificaciones establecidas.(ver datos completos tabla K1).

Reproducibilidad

Para evaluar la reproducibilidad se tomaron los datos de la evaluación de la repetibilidad como analista 1, día 1 y se hicieron análisis a los mismos tres niveles de concentración en diferentes días (día 2) y diferente analista (Analista2).Ver la tabla 23.

Tabla 23. Reproducibilidad – nitratos

Analistas	Estándar bajo [0,05 mg/L]	Estándar medio [1,00 mg/L]	Estándar alto [1,60 mg/L]
Concentración promedio analista 1	1,10	3,01	5,04
Concentración promedio analista 2	1,08	2,98	5,00
CV (%)	2,46	2,59	1,55

La reproducibilidad definida como coeficiente de variación (%CV), evaluada a tres niveles de concentración baja, media y alta con 2,46 %, 2,59 % y 1,55 % respectivamente, cumple con las especificaciones establecidas por la AOAC, y además están por debajo del 10% según el IDEAM.

Se comparó las medias de cada nivel de concentración en días diferentes, a partir de un test de t-Student usando la (Ec. 26) para un nivel de significancia de 0.05, con

($n_1 + n_2 - 2$) grados de libertad, se obtuvo que, todos los t-experimentales son menores a los t-tablas, por lo tanto no hay diferencia significativa entre las dos medias para cada nivel de concentración. Ver la tabla 24.

Tabla 24. *Prueba de Grubbs para rechazo de datos atípicos – nitratos*

Estándar	Estándar bajo [0,05 mg/L]	Estándar medio [1,00 mg/L]	Estándar Alto [1,60 mg/L]
T de rechazo de datos (valor mínimo)	1,77	1,68	1,78
T de rechazo de datos (valor máximo)	1,38	1,40	1,63
T rechazo al 95%	2,29	2,29	2,29

Se evaluaron los datos obtenidos mediante la prueba de Grubbs para rechazo de datos atípicos. Se observa que los T calculados, tanto como para el valor mínimo como máximo son menores al valor T crítico de 2,29, por lo que no se rechaza ningún dato.

8.2.5 Exactitud

Porcentaje de Error

Se determinó la exactitud utilizando estándares a tres niveles de concentración, 1,00 mg/L para el nivel bajo, 3,00 mg/L para el nivel medio y 5,00 mg/L para el nivel alto, y expresada como porcentaje de error. Ver la tabla 25.

Tabla 25. Porcentaje de error – nitratos

Analistas	Estándar bajo [1,00 mg/L]	Estándar medio [3,00 mg/L]	Estándar alto [5,00 mg/L]
Concentración promedio analista 1	1,10	3,01	5,04
Error (%)	9,82	0,20	0,70
Concentración promedio analista 2	1,08	2,98	5,00
Error (%)	8,16	0,54	0,07

El nivel bajo presentó un porcentaje de error mayor a los niveles medio y alto, debido a errores que hacen parte de la preparación de la solución a esa concentración. Los porcentajes de error son menores al 10%, valor aceptado por el IDEAM.

Porcentaje de Recuperación

Se determinó la concentración de nitratos a muestras de agua potable y residual, sin adicionar y con adiciones de 1,00 mg/L para el nivel bajo, 3,00 mg/L para el nivel alto, luego se calculó el porcentaje de recuperación obteniendo los siguientes resultados. Para muestras de agua natural se trabajaron adicionados de 3,00 mg/L para el nivel bajo y 5,00 mg/L para el nivel alto.

Tabla 26. Porcentaje de recuperación – nitratos

Recuperación entre analistas	Agua natural adicionado bajo	Agua natural adicionado alto	Agua potable adicionado bajo	Agua potable adicionado alto	Agua residual adicionado bajo	Agua residual adicionado alto
% Recuperación analista 1	96,6	97,0	101,7	100,3	100,1	89,6
% Recuperación analista 2	97,5	96,1	106,2	101,4	92,3	94,7

Se obtuvo mejores porcentajes de recuperación en el agua potable, para el nivel alto mostró un buen porcentaje de recuperación. Mientras tanto los porcentajes de recuperación en los tres tipos de agua están dentro de los límites establecidos por la AOAC (80% –110%). Ver Anexo D.

8.2.6 Incertidumbre

Con el objetivo de establecer las contribuciones a la incertidumbre del método de análisis de nitritos por espectrofotometría de Uv-vis, esta se calculó a tres niveles de concentración: baja, media, alta. Se utilizó una plantilla realizada en el programa Excel obteniéndose la incertidumbre de 1,00 ± 0,05 mg/L para nivel bajo, 3,00 ± 0.14 mg/L para nivel medio y 5,00 ± 0,23 mg/L para nivel alto, ver tablas 27,28 y 29.

Tabla 27. Incertidumbre combinada total para patrón bajo – nitratos

INCERTIDUMBRE COMBINADA TOTAL		
nivel Bajo	**cuadrado**	**FUENTE**
5,76,E-03	3,32,E-05	**Inc MRC**
1,59E-02	2,54E-04	**IER preparación estándar Bajo**
4,10E-03	1,68E-05	**IER Medición alícuota muestra**
1,40E-02	1,96E-04	**IER HCl**
8,76E-03	7,68E-05	**IER Repetibilidad**
6,77E-03	4,58E-05	**IER Reproducibilidad**
6,E-03	3,15E-05	**IER Curva de calibrado**
Sumatoria	6,54E-04	
Raíz	2,56E-02	
INCERTIDUMBRE FINAL EXP	1	
5,1E-02	0,05	
El valor es reportado como		
1	±	0,05

Tabla 28. Incertidumbre combinada total para patrón medio

INCERTIDUMBRE COMBINADA TOTAL		
nivel medio	**cuadrado**	
5,76,E-03	3,32,E-05	**Inc. MRC**
1,55E-02	2,40E-04	**IER preparación estándar Medio**
4,10E-03	1,68E-05	**IER Medición alícuota muestra**
1,40E-02	1,96E-04	**IER HCl**
3,05E-03	9,29E-06	**IER Repetibilidad**
5,14E-03	2,64E-05	**IER Reproducibilidad**
2,E-03	2,35E-06	**IER Curva de calibrado**
Sumatoria	5,24E-04	
Raíz	2,29E-02	

INCERTIDUMBRE FINAL EXP		3
1,4E-01		0,14
El valor es reportado como		
3 ±		0,14

Tabla 29. Incertidumbre combinada total para patrón alto

INCERTIDUMBRE COMBINADA TOTAL		
nivel alta	**cuadrado**	
5,76,E-03	3,32,E-05	**Inc. MRC**
1,55E-02	2,40E-04	**IER preparación estándar Alto**
4,10E-03	1,68E-05	**IER Medición alícuota muestra**
1,40E-02	1,96E-04	**IER HCl**
3,61E-03	1,30E-05	**IER Repetibilidad**
3,78E-03	1,43E-05	**IER Reproducibilidad**
9,E-04	8,10E-07	**IER Curva de calibrado**
Sumatoria	5,14E-04	
Raíz	2,27E-02	
INCERTIDUMBRE FINAL EXP		5
2,3E-01		0,23
El valor es reportado como		
5 ±		0,23

9. CONCLUSIONES

- La metodología utilizada para la determinación de nitratos y nitritos resultó apropiada, debido a que se cumplió con el objetivo de validar estos analitos, no obstante, se comprobó la linealidad del método para el intervalo de concentraciones que se utilizó, demostrando un elevado valor del coeficiente de determinación cercano a 1 para nitratos, para este caso se obtuvo un r^2 de 0,9997, mientras que para nitritos el coeficiente de determinación $r^2 = 1$, así como también se cumplieron todos los supuestos de la regresión lineal.
- El valor del límite de detección del método a reportar es 0,054 mg NO_3^- /L y 0,004 mg NO_2^- /L siendo ésta la mínima concentración que se puede detectar.
- El valor del límite de cuantificación a reportar es 0,50 mg NO_3^- /L, y 0,01 mg NO_3^- /L siendo este el menor valor cuantificable en la curva de calibrado.
- Los resultados en la precisión mostraron que los coeficientes de variación en la repetibilidad y reproducibilidad son menores que 3,69 % para nitratos y 8,84% para nitritos, criterio establecido por la AOAC y menores que 10% criterio establecido por el IDEAM, por tanto, se concluye que el método en estudio es preciso.
- La exactitud del método analítico cumple con los criterios de aceptación de la AOAC, por tanto, los resultados de la prueba obtenidos mediante el método analítico a ciertas condiciones poseen una proximidad al valor verdadero.
- La incertidumbre de medición del método para la determinación de nitratos por el método turbidimétrico, posee valores diferentes de acuerdo a cada nivel de concentración, se obtuvo: 1 ± 0.05, 3 ± 0.14, 5 ± 0.23, para nivel bajo, medio y alto respectivamente, mientras que para nitritos se obtuvo valores : 0,05 ± 0.028, 1 ± 0.038, 1,6 ± 0.060

10. RECOMENDACIONES

Para la correcta determinación de nitratos y nitritos en agua natural, residual y potable, se deben tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Lavar cuidadosamente todo el material a utilizar, según el protocolo de lavado de materiales que reposa en el laboratorio de aguas de la Universidad de Córdoba.
- Si la muestra posee una alta temperatura dejar atemperar.
- Cuando las muestras presentan demasiada turbiedad, ésta se debe filtrar previamente antes del análisis.
- Estudiar algunos tipos de variables que puedan afectar los resultados, tales como efecto del pH de la muestra, conductividad del agua destilada, con el fin de determinar las condiciones de trabajos más favorables.
- Para nitritos la lectura de las muestras se deben realizar en el tiempo establecido, es decir después de 10 min y antes de 2 horas como tiempo máximo, debido a que se puede originar una pérdida de color y afectar las mediciones.

Bibliografía

17025, I. (2005). *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO Geneva.*

al, V. P. (1997). "Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences" . En *Ecological applications vol 7* (págs. 773-750).

Alzate, j. c. (2017). *REMOCIÓN DE NITRÓGENO MEDIANTE NITRIFICACIÓN Y DESNITRIFICACIÓN AERÓBICA UTILIZANDO UN REACTOR BIOLÓGICO SECUENCIAL (SBR).* Comisión De Investigaciones Científicas (CIC), 47(1).

AM, S. (2002). *Incertidumbre en Métodos Analíticos de rutina.* Universitat Rovira L Virgili, Tarragona.

Barwick, V. M. (2016). *La Adecuación al uso de los Métodos Analíticos.*

Boris, D. R., Guerrero, L., Roa, L., Rodriguez, L. S., & Aguilera, M. S. (2010). Validación de Métodos y Determinación de la Incertidumbre de la Medición. " . En *" Aspectos Generales sobre Validación"* (pág. 50). Santiago de Chile .

Calderon, R. (2004). *"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 industral de santander , santander , bucaramanga .

Catro, M. G. (1989). *Validación de métodos analíticos .* Catalana España : AEFI.

CDMB, L. (s.f.). *Validación de métodos analíticos (Terminologías).* Santander , Bucaramanga .

Córdoba, G. d. (2012). *Geografía de Córdoba.* Obtenido de sitio web: http//www.cordoba.gov.co/v1/cordoba-geografia.html

Coy, G. (1999). *Protocolo estandarización de métodos analíticos.* Bogotá: IDEAM.

De Esperanza, M. L. (2000). *Evaluación del desempeño de los laboratorios de Latinoamérica que miden trazas de metales en agua mediante muestras de control. HDT 31. [online].* CEPIS (Centro Panaméricano de Ingeniería Sanitaria y ciencias del Ambiente). Recuperado el junio de 2000

Eugene, W., Baird, R., Eaton, A., & Clesceri, L. (2015). *Standard Methods For The Examination Of Water and Wastewater. 23ND Edition.* Washington, D.C. : American public Health Association. .

HARRIS, D. (2001). *Análisis Químico Cuantitativo 2da edición .* Barcelona: Editorial Reverté S.A.

IDEAM. (2006). *Estandarización de Métodos Análiticos.* subdirección de hidrología- programa de fisicoquímica ambiental. Minambiente, colombia.

INTERNATIONAL, A. (2006). *Guidelines for standard method perfomance requirements., appendix f.*

J. Figueruelo y M, D. (2004). Química Física del ambiente y de los procesos medioambientales. España: Reverté S.A.

L. Aguirre Ortega, F. J. (2010). *Validación de Métodos Analíticos .* Madrid .

Minambiente. (2007). *Resolución 2115 del 22 de junio de 2007. continuación de la resolución "por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos, y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humnao.* colombia.

ONU-DAES. (2015). El Agua fuente de vida 2005-2015. En *Decenio Internacional Para la Acción.* Recuperado el 19 de Octubre de 2015

Peñafiel, R. M.-H. (2016). *Eliminación de Nitrógeno y contaminación orgánica del agua residual industrial pretratada en Lagunas anaeróbicas mediante un biofiltro de arena.* Avances En Ciencias E Ingeniería, 8(14).

R., B., Colasurdo, V., & Díaz, O. (2003). *Métodos ultravioleta selectivo y de reducción con Hidracina en la Determinación del lón Nitrato en Aguas subterrraneas Vol 26, No 5.* Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires . Buenos Aires, Argentina : Quim Nova.

Ritcher, P. (2017). *VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. presentacion, Santiago de chile.*

Sanchéz Ramirez, J. B. (2015). *Estudio del proceso de desnitrificación en un reactor SBR alimentado con el afluente de un reactor anaeróbico de membranas sumergidas SANMER.* Ingeniería y Región, 12(2).

SINA. (1993). *DECRETO 1600 de 1993. Sistema Nacional Ambiental (SINA): sistemas Nacionales de Investigación Ambiental y de Información Ambiental.*

EURACHEM/CITAC.,(2012). Cuantificación de la incertidumbre de medidas analíticas., Eurolab. España.

Lesmes, M; (2001) La incertidumbre en mediciones químicas. subdirección de ensayos y Servicios Tecnológicos INGEOMINAS. Bogotá.

Ltter, M., Armienta, M., Farias, s. (2009). Metodologías Analíticas para la determinación y especiación de Arsénico en aguas y suelos. IBEROARSEN. Argentina. pp 43-51.

Freund, R, & Littell, R (1981). SAS for linear models: a guide to test ANOVA and GLM procedures (1). Sas Institute. ambiental., Minambiente. Colombia.

12. ANEXOS

ANEXO A. EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD – NITRITOS

Tabla A1. Linealidad

Concentración teórica [mg/L]	Absorbancia			Parámetros estadísticos					
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Media	Desviación estandar	Varianza	%cv	Concentración real en [mg/L]	%error
0,00	0,001	0,002	0,000	0,001	0,0011	1,1E-06	-	-	-
0,01	0,012	0,011	0,013	0,012	0,0010	1,0E-06	8,33	0,01	6,67
0,03	0,023	0,027	0,026	0,025	0,0021	4,3E-06	8,22	0,03	3,34
0,50	0,447	0,427	0,438	0,437	0,0100	1,0E-04	2,29	0,49	1,10
1,00	0,887	0,880	0,892	0,886	0,0060	3,6E-05	0,68	1,01	0,53
2,00	1,753	1,762	1,764	1,760	0,0059	3,4E-05	0,33	2,00	0,06

ANEXO B. LÍMITE DE DETECCIÓN – NITRITOS

Tabla B1. Límite de detección del método – nitritos

Replica	Absorbancia	Concentración [mg/L]
Blanco 1	0,006	0,004
Blanco 2	0,005	0,003
Blanco 3	0,005	0,002
Blanco 4	0,005	0,003
Blanco 5	0,005	0,003
Blanco 6	0,005	0,002
Concentración promedio [mg/L]	0,003	
Desv. Estándar	0,0004	
% CV	-	
Número de datos	6	
Valor mínimo	0,002	
Valor máximo	0,004	
T de rechazo de datos (valor mínimo)	0,71	
T de rechazo de datos (valor máximo)	1,94	
T rechazo al 95%	2,29	
Valor crítico	3,36	
Límite de detección instrumental (LDI)	0,001	
Límite de detección del método (LDM)	0,004	
Límite de cuantificación del método (LCM) estimado	0,004	

Tabla B2. Límite de cuantificación – Nitritos

Replica	Absorbancia	Concentración [mg/L]
Blanco 1	0,012	0,011
Blanco 2	0,011	0,010
Blanco 3	0,012	0,011
Blanco 4	0,012	0,011
Blanco 5	0,011	0,010
Blanco 6	0,010	0,008
Concentración promedio [mg/L]	0,010	
Desv. Estándar	0,0009	
% CV	9,37	
% Error relativo	0,91	
Número de datos	6	
Valor mínimo	0,008	
Valor máximo	0,011	
T de rechazo de datos (valor máximo)	1,63	
T rechazo de datos (valor máximo)	0,82	
T rechazo al 95%	2,29	
LCM estimado [mg/L]	0,004	
LCM calculado [mg/L]	0,010	

ANEXO C. DATOS PRIMARIOS DE VALIDACIÓN – NITRITOS

Tabla C1. Datos primarios

# Replica	Analista	Dia	Blanco	E.b (mg/L)	E.m (mg /L)	E.a (mg /L)	Muestra agua Potable (MP)	MP.Ab (mg/L)	MP.Aa (mg/L)	Muestra agua Natural	MN.Ab (mg/L)	MN.Aa (mg/L)	Agua Residual	MR.Ab (mg/L)	MR.Aa (mg/L)
			-	0,05	1,00	1,60		0,40	1,00	(MN)	0,40	1,00	(MR)	0,40	1,00
DATOS DE ABSORBANCIA															
1	1	1	0,000	0,047	0,990	1,411	0,004	0,350	0,912	0,078	0,435	1,127	0,249	0,566	1,224
2	1	1	0,000	0,049	0,980	1,540	0,002	0,367	0,914	0,075	0,457	1,115	0,256	0,590	1,235
3	2	1	0,000	0,045	0,890	1,480	0,003	0,339	0,890	0,076	0,489	1,114	0,257	0,503	1,220
4	2	1	0,000	0,044	0,790	1,430	0,003	0,341	0,882	0,070	0,501	1,109	0,262	0,512	1,231
1	1	2	0,000	0,042	0,820	1,450	0,000	0,344	0,901	0,077	0,496	1,121	0,265	0,598	1,289
2	1	2	0,000	0,048	0,890	1,310	0,001	0,356	0,906	0,069	0,490	1,112	0,243	0,511	1,297
3	2	2	0,000	0,047	0,870	1,330	0,004	0,354	0,908	0,075	0,502	1,123	0,248	0,580	1,230
4	2	2	0,000	0,050	0,770	1,500	0,003	0,345	0,910	0,068	0,553	1,111	0,249	0,590	1,302
1	1	3	0,000	0,049	0,980	1,420	0,001	0,356	0,883	0,074	0,499	1,119	0,267	0,521	1,268
2	1	3	0,000	0,046	0,890	1,440	0,000	0,357	0,877	0,075	0,487	1,110	0,258	0,580	1,247
3	2	3	0,000	0,043	0,900	1,432	0,003	0,360	0,892	0,071	0,498	1,117	0,255	0,579	1,270
4	2	3	0,000	0,048	0,910	1,564	0,000	0,354	0,890	0,074	0,537	1,121	0,244	0,502	1,220

Pendiente: ##### Intercepto: 0,0026

DATOS DE CONCENTRACIÓN															
1	1	1	-0,003	0,050	1,123	1,602	0,002	0,395	1,034	0,086	0,492	1,279	0,280	0,641	1,389
2	1	1	-0,003	0,053	1,112	1,749	-0,001	0,414	1,037	0,082	0,517	1,265	0,288	0,668	1,402
3	2	1	-0,003	0,048	1,009	1,681	0,000	0,383	1,009	0,083	0,553	1,264	0,289	0,569	1,385
4	2	1	-0,003	0,047	0,896	1,624	0,000	0,385	1,000	0,077	0,567	1,259	0,295	0,579	1,397
1	1	2	-0,003	0,045	0,930	1,646	-0,003	0,388	1,022	0,085	0,561	1,272	0,298	0,677	1,463
2	1	2	-0,003	0,052	1,009	1,487	-0,002	0,402	1,028	0,076	0,554	1,262	0,273	0,578	1,472
3	2	2	-0,003	0,050	0,987	1,510	0,002	0,400	1,030	0,082	0,568	1,274	0,279	0,657	1,396
4	2	2	-0,003	0,054	0,873	1,703	0,000	0,389	1,032	0,074	0,626	1,261	0,280	0,668	1,478
1	1	3	-0,003	0,053	1,112	1,612	-0,002	0,402	1,001	0,081	0,565	1,270	0,301	0,590	1,462
2	1	3	-0,003	0,049	1,009	1,635	-0,003	0,403	0,995	0,082	0,551	1,260	0,291	0,657	1,416
3	2	3	-0,003	0,046	1,021	1,626	0,000	0,407	1,012	0,078	0,564	1,268	0,287	0,656	1,442
4	2	3	-0,003	0,052	1,032	1,776	-0,003	0,400	1,009	0,081	0,608	1,272	0,275	0,568	1,385

ANEXO D. EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD – NITRITOS

Tabla D1. Exactitud y precisión - Nitritos

Concentración (mg/L)	Matriz	Día	Resultados		N° de réplicas	Veracidad				Precisión			
			Analista 1 (A1)	Analista 2 (A2)		Promedio		%Error relativo		%Recuperación		Repetibilidad		Precisión intermedia	
						A1	A2	A1	A2	A1	A2	Desviacion estándar de la	%CV	Desviacion estándar de la precisión intermedia (si)	%CV
0,05	E.b	1	0,05	0,05	4	0,050	0,050	0,58	0,93	-	-	0,0032	6,38	0,0031	6,12
		2	0,04	0,05	4										
		3	0,05	0,05	4										
1,00	E.m	1	1,12	1,11	4	1,049	0,970	4,93	3,04	-	-	0,0756	7,49	0,0783	7,76
		2	0,93	1,01	4										
		3	1,11	1,01	4										
1,60	E.a	1	1,60	1,75	4	1,622	1,653	1,38	3,33	-	-	0,0839	5,13	0,0843	5,15
		2	1,65	1,49	4										
		3	1,61	1,64	4										
-	MP	1	0,00	0,00	4	0,001	0,000	-	-	-	-	0,0016	-	0,0017	-
		2	0,00	0,00	4										
		3	0,00	0,00	4										
0,40	MP.Ab	1	0,40	0,41	4	0,401	0,394	-	-	100	98	0,0094	2,38	0,0095	2,38
		2	0,39	0,40	4										
		3	0,40	0,40	4										
1,00	MP.Aa	1	1,03	1,04	4	1,019	1,016	-	-	101,8	101,5	0,0117	1,15	0,0132	1,29
		2	1,02	1,03	4										
		3	1,00	0,99	4										
-	MN	1	0,09	0,08	4	0,082	0,079	-	-	-	-	0,0038	4,76	0,0038	4,67
		2	0,08	0,08	4										
		3	0,08	0,08	4										
0,40	MN.Ab	1	0,49	0,52	4	0,540	0,555	-	-	115	119	0,0361	6,59	0,0366	6,69
		2	0,56	0,55	4										
		3	0,56	0,55	4										
1,00	MN.Aa	1	1,28	1,27	4	1,268	1,266	-	-	118,6	118,7	0,0072	0,56	0,0069	0,54
		2	1,27	1,26	4										
		3	1,27	1,26	4										
-	MR	1	0,28	0,29	4	0,289	0,284	-	-	-	-	0,0095	3,32	0,0093	3,24
		2	0,30	0,27	4										
		3	0,30	0,29	4										
0,40	MR.Ab	1	0,64	0,67	4	0,635	0,616	-	-	87	83	0,0462	7,39	0,0453	7,24
		2	0,68	0,58	4										
		3	0,59	0,66	4										
1,00	MR.Aa	1	1,39	1,40	4	1,434	1,414	-	-	115	113	0,0296	2,08	0,0331	2,32
		2	1,46	1,47	4										
		3	1,46	1,42	4										

ANEXO E. ANALISIS DE VARIANZA ANOVA- NITRITOS

Tabla E1. Análisis ANOVA

TABLA ANOVA DE UN FACTOR							
Matriz	*Fuente de variación*	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Cuadrado medio*	*F*	*p-valor*	*Valor crítico para F*
E.b	Entre grupos	6,47E-07	2	0,00000032	0,03	0,969	4,26
	Dentro de los grupos	9,12E-05	9	0,00001014			
	Total	9,19E-05	11				
E.m	Entre grupos	2,15E-02	2	0,01077273	1,88	0,207	4,26
	Dentro de los grupos	5,14E-02	9	0,00571526			
	Total	7,30E-02	11				
E.a	Entre grupos	1,56E-02	2	0,00777610	1,10	0,373	4,26
	Dentro de los grupos	6,34E-02	9	0,00704548			
	Total	7,90E-02	11				
MP	Entre grupos	1,04E-05	2	0,00000518	2,00	0,191	4,26
	Dentro de los grupos	2,33E-05	9	0,00000259			
	Total	3,36E-05	11				
MP.Ab	Entre grupos	1,82E-04	2	0,00009101	1,02	0,399	4,26
	Dentro de los grupos	8,03E-04	9	0,00008918			
	Total	9,85E-04	11				
MP.Aa	Entre grupos	1,16E-03	2	0,00057983	4,25	0,050	4,26
	Dentro de los grupos	1,23E-03	9	0,00013641			
	Total	2,39E-03	11				
MN	Entre grupos	1,62E-05	2	0,00000809	0,55	0,596	4,26
	Dentro de los grupos	1,33E-04	9	0,00001474			
	Total	1,49E-04	11				
MN.Ab	Entre grupos	3,62E-03	2	0,00180806	1,39	0,298	4,26
	Dentro de los grupos	1,17E-02	9	0,00130047			
	Total	1,53E-02	11				
MN.Aa	Entre grupos	8,63E-07	2	0,00000043	0,01	0,992	4,26
	Dentro de los grupos	4,61E-04	9	0,00005122			
	Total	4,62E-04	11				
MR	Entre grupos	7,87E-05	2	0,00003934	0,44	0,660	4,26
	Dentro de los grupos	8,14E-04	9	0,00009041			
	Total	8,92E-04	11				
MR.Ab	Entre grupos	2,29E-03	2	0,00114273	0,53	0,603	4,26
	Dentro de los grupos	1,92E-02	9	0,00213780			
	Total	2,15E-02	11				
MR.Aa	Entre grupos	7,02E-03	2	0,00351208	4,01	0,057	4,26
	Dentro de los grupos	7,88E-03	9	0,00087515			
	Total	1,49E-02	11				

ANEXO F. TABLA DE DISTRIBUCIÓN t- student

Tabla F1. Distribución t- student

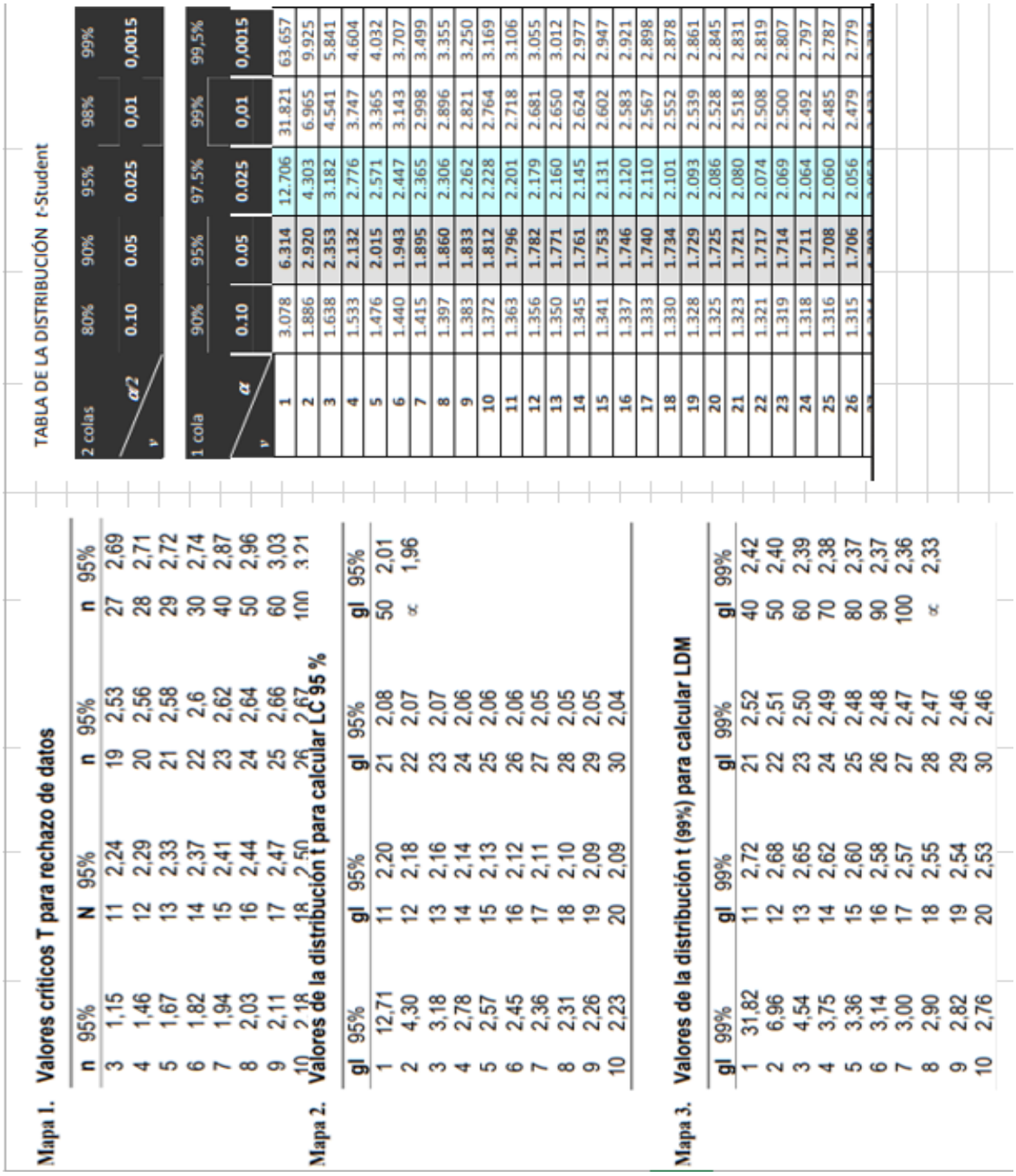

TABLA DE LA DISTRIBUCIÓN t-Student

2 colas	80%	90%	95%	98%	99%
α/2	0.10	0.05	0.025	0,01	0,0015
ν					

1 cola	90%	95%	97.5%	99%	99,5%
α	0.10	0.05	0.025	0,01	0,0015
ν					
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779

Mapa 1. Valores críticos T para rechazo de datos

n	95%	N	95%	n	95%	n	95%
3	1,15	11	2,24	19	2,53	27	2,69
4	1,46	12	2,29	20	2,56	28	2,71
5	1,67	13	2,33	21	2,58	29	2,72
6	1,82	14	2,37	22	2,6	30	2,74
7	1,94	15	2,41	23	2,62	40	2,87
8	2,03	16	2,44	24	2,64	50	2,96
9	2,11	17	2,47	25	2,66	60	3,03
10	2,18	18	2,50	26	2,67	100	3,21

Mapa 2. Valores de la distribución t para calcular LC 95 %

gl	95%	gl	95%	gl	95%	gl	95%
1	12,71	11	2,20	21	2,08	50	2,01
2	4,30	12	2,18	22	2,07	∝	1,96
3	3,18	13	2,16	23	2,07		
4	2,78	14	2,14	24	2,06		
5	2,57	15	2,13	25	2,06		
6	2,45	16	2,12	26	2,06		
7	2,36	17	2,11	27	2,05		
8	2,31	18	2,10	28	2,05		
9	2,26	19	2,09	29	2,05		
10	2,23	20	2,09	30	2,04		

Mapa 3. Valores de la distribución t (99%) para calcular LDM

gl	99%	gl	99%	gl	99%	gl	99%
1	31,82	11	2,72	21	2,52	40	2,42
2	6,96	12	2,68	22	2,51	50	2,40
3	4,54	13	2,65	23	2,50	60	2,39
4	3,75	14	2,62	24	2,49	70	2,38
5	3,36	15	2,60	25	2,48	80	2,37
6	3,14	16	2,58	26	2,48	90	2,37
7	3,00	17	2,57	27	2,47	100	2,36
8	2,90	18	2,55	28	2,47	∝	2,33
9	2,82	19	2,54	29	2,46		
10	2,76	20	2,53	30	2,46		

ANEXO G. INCERTIDUMBRE

Tabla G1. Incertidumbre curva de calibrado – nitritos

Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto	
Sxx	**3,242**	**Sxx**	**3,242**	**Sxx**	**3,242**
B1	**0,8766**	**B1**	**0,8766**	**B1**	**0,8766**
S	**3,E-03**	**S**	**3,E-03**	**S**	**3,E-03**
p	**3**	**p**	**3**	**p**	**3**
n	**6**	**n**	**6**	**n**	**6**
Conc	**0,05**	**Conc**	**1**	**Conc**	**1,6**
c promedio	**0,589**	**c promedio**	**0,589**	**c promedio**	**0,589**
incer combinada	**2,81E-03**	**incer combinada**	**2,72E-03**	**incer combinada**	**3,31E-03**
Incer estandar	5,62E-02	**Incer estandar**	2,72E-03	**Incer estandar**	2,07E-03

Tabla G2. Incertidumbre del estandar nitritos

Incertidumbre debido a estándar de nitritos 1000 mg/L				
Concentración de la solución	**µ (reporta certificado de análisis)**	**U1**	**UC1**	**IER**
1000 ppm	6,98E+00	4,03E+00	4,03E+00	4,0E-03
SUMA IER				
4,03E-03				

Tabla G3. Incertidumbre de la preparación del estandar de 10 mg/L

Incertidumbre calibración de la balanza	µ11	Desviación estandar de la balanza (S)	µ12	Uc	Peso de sulfanilamida para preparación de reactivo colorante (g)	IER	-	-
9,66E-05	4,8E-05	0,0001	4,47E-05	6,58E-05	1,3715	4,80E-05	-	-
Incertidumbre pesaje de sulfanilamida								
% pureza de sulfanilamida	X_2(% pureza/100)	U2/100	µ13	IER6	-	-	-	-
99	0,99	0,01	0,0001	5,77E-05	5,83E-05	-	-	-
Incertidumbre pureza de sulfanilamida								

Incertidumbre calibración de la balanza	µ14	Desviación estandar de la balanza (S)	µ15	U_c	Peso de N-(1-naftil)-etilendiamina dihidroclorada para preparación del reactivo combinado)	IER	-	-
1,45E-04	7,25E-05	0,0001	4,47E-05	8,52E-05	19,9998	4,26E-06	-	-
Incertidumbre peso de N-(1-naftil)-etilendiamina dihidroclorada								
Tolerancia de probeta	µ20	Volumen tomado de H_3PO_4 4 (mL)	Diferencia de temperatura	µ21	(S llenado de probeta)	µ(probeta)	Uc	IER
0,5	2,89E-01	100	5	6,06E-02	0,0747	0,0283	2,96E-01	6,06E-04
IER incertidumbre alícuota de H_3PO_4								
% de pureza H_3PO_4	X_2(% pureza/100)	U2(reportado pureza etiqueta)	U2/100	µ22	IER	-	-	-
85	0,85	0,15	0,002	8,66E-04	1,02E-03	-	-	-
IER incertidumbre pureza de H_3PO_4								
SUMA IER								
1,79E-03								

Tabla G4. Incertidumbre preparación de estándares de calibración

ESTANDARES	Conc (mg/L)	Volumen ml	µ3 (reporte tranferpipeta)	U14	X3(Vol material)	U15	U6(s de pipeta)	UC9	IER	
Estandar 1	0,010	0,050	0,000004	1,15E-06	0,050	1,82E-05	8,32,E-05	8,51E-05	**1,7E-03**	IER15
Estandar 2	0,025	0,125	0,000004	1,15E-06	0,125	4,55E-05	1,51,E-04	1,58E-04	**1,3E-03**	IER16
Estandar 3	0,500	0,025	0,000004	1,15E-06	0,025	9,09E-06	6,05,E-05	6,12E-05	**2,4E-03**	IER17
Estandar 4	1,000	0,050	0,000004	1,15E-06	0,050	1,82E-05	8,32,E-05	8,51E-05	**1,7E-03**	IER18

Estandar 5	2,000	0,100	0,000004	1,63E-06	0,100	3,64E-05	1,85,E-04	1,89E-04	**1,9E-03**	IER19

Tabla G5. Incertidumbre aforo de estándares de calibración

ESTANDARES	Conc (mg/L)	Volumen ml	µ3 (reporte balón)	U14	X3(Vol Balón)	U15	U6(s del balon)	UC9	IER	
Estandar 1	0,010	50	0,06	2,45E-02	50	1,29E-02	6,39E-03	2,84E-02	**5,7E-04**	IER22
Estandar 2	0,025	50	0,06	2,45E-02	50	1,29E-02	6,39E-03	2,84E-02	**5,7E-04**	IER23
Estandar 3	0,500	50	0,06	2,45E-02	50	1,29E-02	6,39E-03	2,84E-02	**5,7E-04**	IER24
Estandar 4	1,000	50	0,06	2,45E-02	50	1,29E-02	6,39E-03	2,84E-02	**5,7E-04**	IER25
Estandar 5	2,000	50	0,06	2,45E-02	50	1,29E-02	6,39E-03	2,84E-02	**5,7E-04**	IER26

Tabla G6. Incertidumbre preparación estándares de trabajo

ESTANDARES	Conc (mg/L)	Volumen (mL)	µ3 (reporte transferpipeta)	U14	X3(Vol material)	U15	U6(s de Pipeta)	UC9	IER	
Alícuota STD bajo	0,05	0,0025	0,000004	1,15E-06	0,02	7,27E-06	6,05E-05	6,09E-05	**3,0E-03**	IER29
Alícuota STD medio	1	0,05	0,000004	1,15E-06	0,05	1,82E-05	8,32E-05	8,51E-05	**1,7E-03**	IER30
Alícuota STD Alto	1,6	0,08	0,000004	1,63E-06	0,08	2,91E-05	6,05E-05	6,71E-05	**8,4E-04**	IER31

Tabla G7. Incertidumbre aforo estándares de trabajo

ESTANDARES	Conc (mg/L)	Volumen	µ3 (reporte balón)	U14	X3(Vol Balón)	U15	U6(s del balon)	UC9	IER	
Alícuota STD bajo	0,05	50 ml	0,06	2,45E-02	50	1,82E-02	6,39E-03	0,031	**6,2E-04**	IER32
Alícuota STD medio	1	50 ml	0,06	2,45E-02	50	1,82E-02	6,39E-03	0,031	**6,2E-04**	IER33
Alícuota STD Alto	1,6	50 ml	0,06	2,45E-02	50	1,82E-02	6,39E-03	0,031	**6,2E-04**	IER34

Tabla G8. Incertidumbre debido a la reproducibilidad- Nitritos

	STD-0,05	STD-1,000	STD-1,600	M - Residual	M - Natural
DIA 1	0,047	1,039	1,624	0,922	0,358
	0,042	1,044	1,630	0,938	0,351
	0,048	1,043	1,647	0,922	0,349
	0,047	1,042	1,651	0,926	0,349
	0,048	1,050	1,671	0,933	0,355
	0,047	1,052	1,620	0,934	0,350
Promedio	**0,047**	**1,045**	**1,641**	**0,929**	**0,352**
s	**0,00**	**0,00**	**0,02**	**0,01**	**0,00**
%CV	**4,86**	**0,46**	**1,18**	**0,74**	**1,04**
Ucomb	**8,54E-04**	**1,84E-03**	**7,32E-03**	**2,58E-03**	**1,38E-03**
IER	**1,84E-02**	**1,76E-03**	**4,46E-03**	**2,78E-03**	**3,92E-03**

ANEXO H. Evaluación de la linealidad de Nitratos

Tabla H1. Linealidad – Nitratos

Concentración teórica [mg/L]	Absorbancia			Parámetros estadísticos					
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Media	Desviación estandar	Varianza	%cv	Concentración real en [mg/L]	%error
0,00	0,002	0,001	0,000	0,001	0,0011	1,1E-06	-	-	-
0,50	0,027	0,025	0,029	0,027	0,0020	4,0E-06	7,41	0,53	5,55
1,00	0,052	0,050	0,053	0,052	0,0015	2,3E-06	2,96	0,94	6,31
2,00	0,117	0,118	0,117	0,117	0,0006	3,3E-07	0,49	2,03	1,31
3,00	0,177	0,176	0,173	0,175	0,0021	4,3E-06	1,19	2,99	0,39
5,00	0,296	0,307	0,297	0,300	0,0061	3,7E-05	2,03	5,06	1,13
7,00	0,415	0,414	0,416	0,415	0,0010	1,0E-06	0,24	6,96	0,51

ANEXO I. LIMITE DE DETECCIÓN – NITRATOS

Tabla I1. Límite de detección del método- nitratos

Replica	Absorbancia	Concentración [mg/L]
Blanco 1	0,003	0,13
Blanco 2	0,001	0,10
Blanco 3	0,000	0,08
Blanco 4	0,002	0,11
Blanco 5	0,002	0,11
Blanco 6	0,003	0,13
Blanco 7	0,001	0,10
Blanco 8	0,001	0,10
Blanco 9	0,000	0,08
Blanco 10	0,000	0,08
Concentración promedio [mg/L]	0,10	
Desv. Estándar	0,0192	
% CV	-	
Número de datos	10	
Valor mínimo	0,08	
Valor máximo	0,13	
T de rechazo de datos (valor mínimo)	1,12	

T de rechazo de datos (valor máximo)	1,47
T rechazo al 95%	2,29
Valor crítico 99% n-1	2,82
Límite de detección instrumental (LDI)	0,032
Límite de detección del método (LDM)	0,054
Límite de cuantificación del método (LCM) estimado	0,192

Tabla I2. Límite de cuantificación - nitratos

Replica	**Absorbancia**	**Concentración [mg/L]**
Blanco 1	0,026	0,51
Blanco 2	0,025	0,50
Blanco 3	0,023	0,46
Blanco 4	0,028	0,54
Blanco 5	0,024	0,48
Blanco 6	0,029	0,56
Blanco 7	0,027	0,53
Blanco 8	0,030	0,58
Blanco 9	0,026	0,51
Blanco 10	0,024	0,48
Concentración promedio [mg/L]	0,51	
Desv. Estándar	0,0381	
% CV	7,42	
% Error relativo	1,90	
Número de datos	10	
Valor mínimo	0,46	
Valor máximo	0,58	
T de rechazo de datos (valor máximo)	1,39	
T rechazo de datos (valor máximo)	1,65	
T rechazo al 95%	2,29	

LCM estimado [mg/L]	0,192
LCM calculado [mg/L]	0,514

ANEXO J. DATOS PRIMARIOS NITRATOS

Tabla j1. Datos primarios Nitratos

# Replica	Analista	Dia	Blanco	E.b (mg/L)	E.m (mg /L)	E.a (mg /L)	Muestra agua Potable	MP.Ab (mg/L)	MP.Aa (mg/L)	Muestra agua Natural	MN.Ab (mg/L)	MN.Aa (mg/L)	Agua Residaul (MR)	MR.Ab (mg/L)	MR.Aa (mg/L)
			-	1,00	3,00	5,00		1,00	3,00		3,00	5,00		1,00	3,00
DATOS DE ABSORBANCIA															
1	1	1	0,002	0,065	0,176	0,298	0,091	0,156	0,277	0,018	0,195	0,310	0,072	0,134	0,237
2	2	1	0,002	0,064	0,181	0,299	0,096	0,160	0,276	0,019	0,199	0,309	0,063	0,106	0,230
1	1	2	0,002	0,062	0,179	0,299	0,094	0,156	0,276	0,021	0,189	0,313	0,060	0,125	0,224
2	2	2	0,002	0,062	0,173	0,301	0,092	0,155	0,276	0,019	0,194	0,310	0,054	0,120	0,228
1	1	3	0,002	0,062	0,179	0,304	0,098	0,155	0,274	0,018	0,197	0,311	0,060	0,114	0,232
2	2	3	0,002	0,060	0,176	0,294	0,091	0,156	0,277	0,021	0,195	0,309	0,061	0,114	0,234

Pendiente: 0,0603 Intercepto: -0,005

DATOS DE CONCENTRACIÓN															
1	1	1	0,113	1,158	2,999	5,023	1,59	2,667	4,675	0,378	3,314	5,222	1,274	2,303	4,011
2	2	1	0,113	1,141	3,082	5,040	1,67	2,734	4,658	0,395	3,381	5,206	1,125	1,838	3,895
1	1	2	0,113	1,108	3,049	5,040	1,64	2,667	4,658	0,428	3,215	5,272	1,075	2,153	3,795
2	2	2	0,113	1,108	2,949	5,073	1,61	2,651	4,658	0,395	3,298	5,222	0,975	2,070	3,862
1	1	3	0,113	1,108	3,049	5,123	1,71	2,651	4,625	0,378	3,348	5,239	1,075	1,971	3,928
2	2	3	0,113	1,075	2,999	4,957	1,59	2,667	4,675	0,428	3,314	5,206	1,092	1,971	3,961

ANEXO K. EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD – NITRATOS

Tabla K1. Exactitud

Concentración (mg/L)	Matriz	Día	Resultados		N° de réplicas	Veracidad				Precisión			
						Promedio		%Error relativo		%Recuperación		Repetibilidad		Precisión intermedia	
			Analista 1 (A1)	Analista 2 (A2)		A1	A2	A1	A2	A1	A2	Desviación estándar de la repetibilidad (sr)	%CV	Desviacion estándar de la precisión intermedia (si)	%CV
1,00	E.b	1	1,13	1,11	2	1,098	1,082	9,82	8,16	-	-	0,0151	1,39	0,0268	2,46
		2	1,08	1,08	2										
		3	1,08	1,05	2										
3,00	E.m	1	2,97	3,06	2	3,006	2,984	0,20	0,54	-	-	0,0567	1,89	0,0777	2,59
		2	3,02	2,92	2										
		3	3,02	2,97	2										
5,00	E.a	1	5,00	5,01	2	5,035	4,997	0,70	0,07	-	-	0,0567	1,13	0,0777	1,55
		2	5,01	5,05	2										
		3	5,10	4,93	2										
-	MP	1	1,56	1,65	2	1,618	1,596	-	-	-	-	0,0598	3,72	0,0813	5,06
		2	1,61	1,58	2										
		3	1,68	1,56	2										
1,00	MP.Ab	1	2,64	2,71	2	2,635	2,658	-	-	101,7	106,2	0,0287	1,09	0,0413	1,56
		2	2,64	2,62	2										
		3	2,62	2,64	2										
3,00	MP.Aa	1	4,65	4,63	2	4,626	4,637	-	-	100,3	101,4	0,0214	0,46	0,0294	0,63
		2	4,63	4,63	2										
		3	4,60	4,65	2										
-	MN	1	0,35	0,37	2	0,368	0,379	-	-	-	-	0,0253	6,78	0,0351	9,39
		2	0,40	0,37	2										
		3	0,35	0,40	2										
3,00	MN.Ab	1	3,29	3,35	2	3,266	3,304	-	-	96,6	97,5	0,0454	1,38	0,0676	2,06
		2	3,19	3,27	2										
		3	3,32	3,29	2										
5,00	MN.Aa	1	5,20	5,18	2	5,218	5,185	-	-	97,0	96,1	0,0253	0,49	0,0357	0,69
		2	5,25	5,20	2										
		3	5,21	5,18	2										
-	MR	1	1,25	1,10	2	1,115	1,037	-	-	-	-	0,0736	6,84	0,1037	9,64
		2	1,05	0,95	2										
		3	1,05	1,06	2										
1,00	MR.Ab	1	2,28	1,81	2	2,116	1,933	-	-	100,1	89,6	0,1926	9,52	0,1951	9,64
		2	2,13	2,04	2										
		3	1,94	1,94	2										
3,00	MR.Aa	1	3,98	3,87	2	3,885	3,880	-	-	92,3	94,7	0,0563	1,45	0,0861	2,22
		2	3,77	3,84	2										
		3	3,90	3,93	2										

ANEXO L. ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA – NITRATOS

Tabla L1. Test Anova

TABLA ANOVA DE UN FACTOR							
Matriz	*Fuente de variación*	*uma de cuadrado*	*Grados de libertad*	*Cuadrado medio*	*F*	*p-valor*	*Valor crítico para F*
E.b	Entre grupos	3,58E-03	2	0,00178869	7,80	0,065	9,55
	Dentro de los grupos	6,88E-04	3	0,00022932			
	Total	4,27E-03	5				
E.m	Entre grupos	1,74E-03	2	0,00087141	0,27	0,779	9,55
	Dentro de los grupos	9,63E-03	3	0,00321047			
	Total		5				
E.a	Entre grupos	6,42E-04	2	0,00032105	0,07	0,937	9,55
	Dentro de los grupos	1,44E-02	3	0,00481571			
	Total	1,51E-02	5				
MP	Entre grupos	6,42E-04	2	0,00032105	0,09	0,917	9,55
	Dentro de los grupos	1,07E-02	3	0,00357739			
	Total	1,14E-02	5				
MP.Ab	Entre grupos	2,29E-03	2	0,00114660	1,39	0,374	9,55
	Dentro de los grupos	2,48E-03	3	0,00082555			
	Total	4,77E-03	5				
MP.Aa	Entre grupos	2,75E-04	2	0,00013759	0,30	0,761	9,55
	Dentro de los grupos	1,38E-03	3	0,00045864			
	Total	1,65E-03	5				
MN	Entre grupos	6,42E-04	2	0,00032	0,50	0,650	9,55
	Dentro de los grupos	1,93E-03	3	0,00064			
	Total	2,57E-03	5				
MN.Ab	Entre grupos	9,45E-03	2	0,00472	2,29	0,249	9,55
	Dentro de los grupos	6,19E-03	3	0,00206			
	Total	1,56E-02	5				
MN.Aa	Entre grupos	1,19E-03	2	0,00059623	0,93	0,485	9,55
	Dentro de los grupos	1,93E-03	3	0,00064209			
	Total	3,12E-03	5				
MR	Entre grupos	3,15E-02	2	0,01573133	2,91	0,199	9,55
	Dentro de los grupos	1,62E-02	3	0,00541194			
	Total	4,77E-02	5				
MR.Ab	Entre grupos	2,10E-02	2	0,01050284	0,28	0,772	9,55
	Dentro de los grupos	1,11E-01	3	0,03710392			
	Total	1,32E-01	5				
MR.Aa	Entre grupos	1,94E-02	2	0,00967729	3,06	0,189	9,55
	Dentro de los grupos	9,49E-03	3	0,00316461			
	Total	2,88E-02	5				

ANEXO M. INCERTIDUMBRE – NITRATOS

Tabla M1. Incertidumbre curva de calibrado

Nivel bajo		Nivel medio		Nivel alto	
Sxx	**14,800**	**Sxx**	**14,800**	**Sxx**	**14,800**
B1	**0,0596**	**B1**	**0,0596**	**B1**	**0,0596**
S	**0,0002**	**S**	**0,0002**	**S**	**0,0002**
p	**1**	**p**	**1**	**p**	**1**
n	**8**	**n**	**8**	**n**	**8**
Co	**1**	**Co**	**3**	**Co**	**5**
c promedio	**4,20**	**c promedio**	**4,20**	**c promedio**	**4,20**
Incer estandar	**0,006**	**Incer estandar**	**0,005**	**Incer estandar**	**0,005**
incer combinada	0,006	**incer combinada**	0,002	**incer combinada**	0,001

Tabla M2. Incertidumbre del estandar de nitratos.

Concentración de la solución ppm	µ1(reporta certificado de análisis	U2	UC1	IER
1000	9,98E+00	5,76E+00	5,76E+00	**5,8E-03**

Tabla M3. Incertidumbre preparación estandar de calibración

Estándares	Conc (mg/L)	Volumen	µ3 (reporte transferpipeta)	U14	X3(Vol material)	U15	U6(s de transferpipeta)	UC9	IER
Estandar 1	0,5	0,025ml	0,000004	2,3094E-06	0,025	9,09327E-06	0,0001	0,0001	**3,5E-03**
Estandar 2	1	0,05ml	0,000004	2,3094E-06	0,05	1,81865E-05	0,0001	0,0001	**1,6E-03**
Estandar 3	2	0,1ml	0,000004	2,3094E-06	0,1	3,63731E-05	0,0002	0,0002	**1,9E-03**
Estandar 4	3	0,15ml	0,000004	2,3094E-06	0,15	5,45596E-05	0,0002	0,0002	**1,1E-03**
Estandar 6	5	0,250 ml	0,000004	2,3094E-06	0,25	9,09327E-05	0,0002	0,0002	**7,1E-04**
Estandar 7	7	0,350 ml	0,000004	2,3094E-06	0,35	0,000127306	0,0002	0,0002	**6,5E-04**

Tabla M4. Incertidumbre aforo preparación de estándares

Estándares	Conc (mg/L)	Volumen	µ3 (reporte balón)	U14	X3(Vol Balón)	U15	U6(s del balon)	UC9	IER
Estandar 1	0,3	50 ml	0,06	0,03464102	50	0,018186533	0,0064	0,040	**7,9E-04**
Estandar 2	1	50 ml	0,06	0,03464102	50	0,018186533	0,0064	0,040	**7,9E-04**
Estandar 3	2	50 ml	0,06	0,03464102	50	0,018186533	0,0064	0,040	**7,9E-04**
Estandar 4	3	50 ml	0,06	0,03464102	50	0,018186533	0,0064	0,040	**7,9E-04**
Estandar 6	5	50 ml	0,06	0,03464102	50	0,018186533	0,0064	0,040	**7,9E-04**
Estandar 7	7	50 ml	0,06	0,03464102	50	0,018186533	0,0064	0,040	7,9E-04

Tabla M5. Incertidumbre preparación estándares de trabajo

estándares	Conc (mg/L)	Volumen	µ3 (reporte transferpipeta)	U14	X3(Vol material)	U15	U6(s de transfer)	UC9	IER
Alícuota STD bajo	1	0,05ml	0,000004	2,3094E-06	0,1	3,64,E-05	0,0001	0,0001	**8,4E-04**
Alícuota STD medio	3	0,15ml	0,000004	2,3094E-06	1	3,64,E-04	0,0002	0,000	**3,9E-04**
Alícuota STD Alto	5	0,25ml	0,000004	2,3094E-06	1	3,64,E-04	0,0002	0,000	**3,9E-04**

Tabla M6. Incertidumbre aforo estándares de trabajo

estándares	Conc (mg/L)	Volumen	µ3 (reporte balón)	U14	X3(Vol Balón)	U15	U6(s del balón)	UC9	IER
Alícuota STD bajo	1	50 ml	0,06	0,03464102	50	0,030310889	0,0064	0,046	**9,3E-04**
Alícuota STD medio	3	50 ml	0,06	0,03464102	50	0,030310889	0,0064	0,046	**9,3E-04**
Alícuota STD Alto	5	50 ml	0,06	0,03464102	50	0,030310889	0,0064	0,046	**9,3E-04**

Tabla M7. Incertidumbre alícuota de muestra

Muestra	Vol	µ5(Reporte probeta)	U11	X5(Vol probeta)	U12	s (probeta)	U13	UC8	IER
	50 ml	0,5	2,04E-01	50	1,82E-02	0,0064	2,41E-03	2,05E-01	**4,10E-03**

Tabla M8. Incertidumbre debido a la reproducibilidad - Nitratos

	STD-1,00	STD-3,00	STD-5,00	M - Natural	M - Residual	M - Potable
DIA 1	1,10	2,96	4,99	0,32	1,23	1,53
	1,09	2,96	4,98	0,34	1,08	1,53
	1,05	3,01	5,01	0,37	1,03	1,58
	1,05	3,00	5,00	0,34	0,93	1,55
	1,05	2,96	5,09	0,32	1,03	1,73
	1,05	2,96	5,08	0,47	1,05	1,78
Promedio	**1,06**	**2,97**	**5,02**	**0,36**	**1,06**	**1,62**
s	**0,02**	**0,02**	**0,05**	**0,06**	**0,10**	**0,11**
%CV	**2,32**	**0,81**	**0,95**	**15,92**	**9,35**	**6,86**
Ucomb	**9,30E-03**	**9,06E-03**	**1,81E-02**	**2,18E-02**	**3,73E-02**	**4,20E-02**
IER	**8,76E-03**	**3,05E-03**	**3,61E-03**	**6,02E-02**	**3,53E-02**	**2,59E-02**