

**ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA
DETERMINACIÓN DE NITRATOS, NITRITOS, COMPUESTOS FENÓLICOS Y,
ACEITES Y GRASAS UTILIZADOS COMO INDICADORES DE
CONTAMINACIÓN EN AGUAS NATURALES Y RESIDUALES INDUSTRIALES**

SILVIA JULIANA MOLINA GUEVARA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2010

**ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA
DETERMINACIÓN DE NITRATOS, NITRITOS, COMPUESTOS FENÓLICOS Y,
ACEITES Y GRASAS UTILIZADOS COMO INDICADORES DE
CONTAMINACIÓN EN AGUAS NATURALES Y RESIDUALES INDUSTRIALES**

**TESIS DE PROYECTO DE GRADO
MODALIDAD: PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN**

SILVIA JULIANA MOLINA GUEVARA

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de
Química**

Directora:

Dr. Marianny Yajaira Combariza Montañez

Química, Ph. D

Codirectora:

Yaneth Quintero López, Química, Espec. Química Ambiental

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2010**

A DIOS TODOPODEROSO por haberme dado la sabiduría y la fortaleza para que fuera posible alcanzar este triunfo.

A mis queridos padres Pedro y Nelly Esperanza, por todo su amor, apoyo en los momentos más difíciles y por sus palabras de aliento para seguir adelante en todo momento.

A mis hermanos Pedro Alexander, quien indiscutiblemente es nuestro ángel y en la gloria del señor, espero este orgulloso de mí, Carlos Javier, Leonel Fernando, José Luis, María Alejandra y Jhoan Andrés por su inmenso cariño, muestras de afecto y darme ánimos para alcanzar esta meta tan importante en mi carrera profesional.

A mi preciosa sobrina Danna Alexandra.

Y por supuesto a mi Linda y Balto, compañía desinteresada y fiel en todo momento.

Agradecimientos

Agradecimientos

*Al Laboratorio del Centro de Estudios e Investigaciones (CEIAM),
por el apoyo económico e institucional en la realización de este
proyecto.*

*A la Dra. Marianny Yajaira Combariza Montañez por su entrega
de conocimientos, preocupación y orientación.*

*A la Especialista en Química Ambiental Yaneth Quintero López y a
la Química Patricia Pico, por la ayuda constante y valioso apoyo.*

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	25
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	28
1.1 CONTAMINACIÓN DEL RECURSO HÍDRICO	28
1.1.1 NITRATOS Y NITRITOS	29
1.1.2 COMPUESTOS FENÓLICOS	31
1.2 ANÁLISIS DEL RECURSO HÍDRICO	34
1.3 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD ANALÍTICA DE DATOS AMBIENTALES	35
1.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE NITRATOS Y NITRITOS EN AGUAS	37
1.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN AGUAS	47
1.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ACEITES Y GRASAS EN AGUAS	52
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	59
2.1 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS	59
2.1.1 EQUIPOS Y MATERIAL DE LABORATORIO.	59
2.1.2 VERIFICACIÓN DE EQUIPOS.	59
2.1.3 MATERIAL DE VIDRIO VOLUMÉTRICO.	60
2.1.4 REACTIVOS	60
2.1.5 SOLUCIONES PREPARADAS EN EL LABORATORIO.	61
2.1.6 MANEJO Y DISPONIBILIDAD DE RESIDUOS.	61
2.2 MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	61
2.3 PRE-TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	61
2.4 VERIFICACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS PARA LOS DIFERENTES PROCESOS DE ESTANDARIZACIÓN	62
2.4.1 DETERMINACIÓN DE NITRATOS POR EL MÉTODO DEL SALICILATO SÓDICO.	63
2.4.2 DETERMINACIÓN DE NITRITOS POR EL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO, SM 4500-NO ₂ -.	63

2.4.4 DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS POR EL MÉTODO EXTRACCIÓN SOXHLET, SM 5520 D.	65
2.5 DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS PARA LA CUANTIFICACION DE NO ₃ -, NO ₂ - EN AGUAS NATURALES Y CF EN AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES	66
2.5.1 ANÁLISIS INSTRUMENTAL	67
2.5.2 VERIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS ESTABLECIDAS EN LA LITERATURA	68
2.5.3 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MERITO	69
2.5.4 EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO INTER-LABORATORIOS.	72
2.5.5 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN LOS MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	73
2.6 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN-SOXHLET PARA LA CUANTIFICACION DE ACEITES Y GRASAS EN AGUAS	77
2.6.1 ANÁLISIS INSTRUMENTAL	78
2.6.2 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MERITO	79
2.6.3 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE EN EL MÉTODO EXTRACCIÓN-SOXHLET	82
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE NITRATOS EN AGUAS NATURALES	85
3.1 VERIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS ESTABLECIDAS EN LA LITERATURA	85
3.2 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MERITO	87
3.2.1 EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD Y DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.	87
3.2.2 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO.	91
3.2.3 EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO.	92
3.2.4 EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO A TRAVÉS DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	95
3.3 EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO EN EL ENSAYO DE APTITUD INTERLABORATORIOS.	96
3.4 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO	97

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE NITRITOS EN AGUAS NATURALES	99
4.1 VERIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS ESTABLECIDAS EN LA LITERATURA	99
4.2 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MERITO	101
4.2.1 EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD Y DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.	101
4.2.2 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO.	104
4.2.3 EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO.	105
4.2.4 EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO A TRAVÉS DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN.	108
4.3 EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO EN EL ENSAYO DE APTITUD INTERLABORATORIOS.	109
4.4 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO	109
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN AGUAS RESIDUALES	112
5.1 VERIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS ESTABLECIDAS EN LA LITERATURA	112
5.2 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MERITO	114
5.2.1 EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD Y DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.	114
5.2.2 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO.	117
5.2.3 EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL SISTEMA.	118
5.2.4 EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO A TRAVÉS DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN.	121
5.3 EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO EN EL ENSAYO DE APTITUD INTERLABORATORIOS.	122
5.4 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO	122
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE ACEITES Y GRASAS EN AGUAS	124
6.1 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MERITO	124
6.1.1 INTERVALO DE TRABAJO DEL MÉTODO.	124

6.1.2 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN INSTRUMENTAL.	125
6.1.3 DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO.	126
6.1.4 DETERMINACIÓN DEL LÍMITE SUPERIOR DEL MÉTODO.	127
6.1.5 EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO.	127
6.1.6 EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO.	128
6.2 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO	129
CONCLUSIONES	132
RECOMENDACIONES	135
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. RUTA DE LOS CONTAMINANTES POTENCIALES RELACIONADA CON EL MEDIO HÍDRICO.	29
FIGURA 2. ESTRUCTURA Y ABREVIATURAS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS CLASIFICADOS COMO CONTAMINANTES PRIORITARIOS POR LA EPA.	32
FIGURA 3. ETAPAS DEL PROCESO DE ANÁLISIS DE CALIDAD DE LOS RECURSOS HÍDRICOS.	34
FIGURA 4. FIGURAS ANALÍTICAS DE MERITO EN LA ESTANDARIZACIÓN DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS.	36
FIGURA 5. MECANISMO DE CUANTIFICACIÓN DE NO_2^- EMPLEANDO LA REACCIÓN SHINN.	39
FIGURA 6. MECANISMO DE CUANTIFICACIÓN DE NO_3^- EMPLEANDO EL MÉTODO DEL SALICILATO DE SODIO.	43
FIGURA 7. REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.	48
FIGURA 8. DIAGRAMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA EN EL DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.	67
FIGURA 9. ESPECTROFOTÓMETRO UV/VIS DE UN HAZ DE LUZ MARCA MILTON ROY MODELO 601.	68
FIGURA 10. METODOLOGÍA PARA CALCULAR LA INCERTIDUMBRE DE LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS, NITRITOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS.	74
FIGURA 11. DIAGRAMA CAUSA-EFECTO PARA LA MEDICIÓN DE NITRATOS, NITRITOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS, EMPLEANDO ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS.	75
FIGURA 12. SISTEMA DE EXTRACCIÓN B-811 MARCA BUCHI.	79
FIGURA 13. DIAGRAMA CAUSA-EFECTO PARA LA MEDICIÓN DE ACEITES Y GRASAS, EMPLEANDO EXTRACCIÓN SOXHLET.	83
FIGURA 14. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL ION NO_3^- EN LA REGIÓN UV/VIS.	86

FIGURA 15. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE NITRATOS EN AGUAS NATURALES.	89
FIGURA 16. GRÁFICO DE CONTROL DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA DEL SISTEMA PARA UN ESTÁNDAR DE 5 MG NO ₃ ⁻ /L.	94
FIGURA 17. GRÁFICO DE CONTROL DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO PARA UNA MUESTRA DE AGUA NATURAL REFORZADA DE 5 MG NO ₃ ⁻ /L.	95
FIGURA 18. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL ION NO ₂ ⁻ EN LA REGIÓN UV/VIS.	100
FIGURA 19. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE NITRITOS EN AGUAS NATURALES.	102
FIGURA 20. GRÁFICO DE CONTROL DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA DEL SISTEMA PARA UN ESTÁNDAR DE 0,5 MG NO ₂ ⁻ /L.	107
FIGURA 21. GRÁFICO DE CONTROL DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO PARA UNA MUESTRA DE AGUA NATURAL REFORZADA DE 0,5 MG NO ₂ ⁻ /L.	107
FIGURA 22. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL ION C ₆ H ₅ O ⁻ EN LA REGIÓN UV/VIS.	113
FIGURA 23. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES.	115
FIGURA 24. GRÁFICO DE CONTROL DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA DEL SISTEMA PARA UN ESTÁNDAR DE 0,6 MG C ₆ H ₅ O ⁻ /L.	120
FIGURA 25. GRÁFICO DE CONTROL DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO PARA UNA MUESTRA DE AGUA NATURAL REFORZADA DE 0,6 MG C ₆ H ₅ O ⁻ /L.	120
FIGURA 26. GRÁFICO DE CONTROL DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO PARA UN ESTÁNDAR DE 300 MG/L.	128
FIGURA 27. CONTRIBUCIÓN DE INCERTIDUMBRES ESTÁNDAR EN LA MEDICIÓN DE ACEITES Y GRASAS.	131

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. PROMEDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS AGUAS NATURALES.	28
TABLA 2. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS.	41
TABLA 3. FIGURAS ANALÍTICAS DE MERITO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATO POR EL MÉTODO DESARROLLADO POR MONTEIRO Y COLABORADORES.	43
TABLA 4. RESULTADOS DE LA EXACTITUD EN LOS ANÁLISIS NITRATOS EN MUESTRAS DE AGUAS POTABLES POR EL MÉTODO DESARROLLADO POR MONTEIRO Y COLABORADORES.	44
TABLA 5. RESULTADOS DE LA PRECISIÓN DEL ESTUDIO INTERLABORATORIO.	49
TABLA 6. RESULTADOS DE LA EXACTITUD DEL ESTUDIO INTERLABORATORIO.	49
TABLA 7. COMPARACIÓN DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ACEITES Y GRASAS.	55
TABLA 8. VERIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS EN AGUAS NATURALES.	86
TABLA 9. EVALUACIÓN DEL INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL DEL MÉTODO.	88
TABLA 10. EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD Y DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.	89
TABLA 11. DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO.	91
TABLA 12. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO.	93
TABLA 13. EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO.	96
TABLA 14. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL LABORATORIO EN LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS.	97
TABLA 15. RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LAS CONTRIBUCIONES, INCERTIDUMBRE COMBINADA E INCERTIDUMBRE EXPANDIDA, ASOCIADA AL MÉTODO DEL SALICILATO DE SODIO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS EN AGUAS NATURALES.	98

TABLA 16. VERIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS EN AGUAS NATURALES.	100
TABLA 17. EVALUACIÓN DEL INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL DEL MÉTODO.	102
TABLA 18. EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD Y DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.	103
TABLA 19. DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO.	105
TABLA 20. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO.	106
TABLA 21. EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO.	108
TABLA 22. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL LABORATORIO EN LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS.	109
TABLA 23. RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LAS CONTRIBUCIONES, INCERTIDUMBRE COMBINADA E INCERTIDUMBRE EXPANDIDA, ASOCIADA AL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO SM 4500-NO ₂ ⁻ PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS EN AGUAS NATURALES.	110
TABLA 24. VERIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES.	113
TABLA 25. EVALUACIÓN DEL INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL DEL MÉTODO.	115
TABLA 26. EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD Y DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.	116
TABLA 28. EVALUACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO.	118
TABLA 29. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO.	118
TABLA 30. RESULTADOS DEL ESTUDIO LA EXACTITUD DEL MÉTODO.	121
TABLA 31. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL LABORATORIO EN LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.	122
TABLA 32. RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LAS CONTRIBUCIONES, INCERTIDUMBRE COMBINADA E INCERTIDUMBRE EXPANDIDA, ASOCIADA AL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DIRECTO SM 5530 D PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES.	123
TABLA 33. DETERMINACIÓN DEL INTERVALO DE TRABAJO DEL MÉTODO.	124

TABLA 34. DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN INSTRUMENTAL.	125
TABLA 35. DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO.	126
TABLA 36. DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y SUPERIOR DEL MÉTODO.	127
TABLA 37. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO.	127
TABLA 38. EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO.	129
TABLA 39. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS EN AGUAS.	130

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Lavado del material volumétrico u otros	169
ANEXO 2. Verificación del material volumétrico aforado clase A tipo IN y EX	171
ANEXO 3. Preparación de soluciones usadas en los procesos de estandarización	174
ANEXO 4. Evaluación del intervalo de respuesta lineal, de la linealidad y de la sensibilidad de los métodos espectrofotométricos	175
Anexo 5. Evaluación de los límites de detección y cuantificación de métodos espectrofotométricos	179
Anexo 6. Evaluación de la precisión de los métodos espectrofotométricos	181
Anexo 7. Evaluación de la exactitud de los métodos espectrofotométricos	183
ANEXO 8. Estimación de la incertidumbre de los métodos espectrofotométricos	185
ANEXO 9. Respuestas del instrumento obtenidas para cada ensayo de intervalo de linealidad del método de cuantificación de nitratos en aguas naturales por UV/VIS	189
ANEXO 10. Resultados de los blancos de reactivos para la determinación del límite de detección y de cuantificación del método de cuantificación de nitratos en aguas naturales por UV/VIS	190
ANEXO 11. Respuestas del instrumento obtenidas para cada ensayo del intervalo de linealidad del método de cuantificación de nitratos en aguas naturales a bajas concentraciones por UV/VIS	191
ANEXO 12. Curva de calibración promedio a bajas concentraciones del método de determinación de nitratos en aguas naturales, para la determinación del límite de detección y de cuantificación del método por UV/VIS	192
ANEXO 13. Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método para determinar nitratos en aguas naturales a bajas concentraciones por UV/VIS	193
ANEXO 14. Resultados de la precisión del sistema en la determinación de nitratos por UV/VIS	194
ANEXO 15. Resultados de la repetibilidad del método en la determinación de nitratos por UV/VIS	196

ANEXO 16. Resultados de la precisión intermedia y exactitud del método en la determinación de nitratos por UV/VIS.	198
ANEXO 16. Resultados de la precisión intermedia y exactitud del método en la determinación de nitratos por UV/VIS.	199
ANEXO 17. Respuestas del instrumento obtenidas para cada ensayo de intervalo de linealidad del método de cuantificación de nitritos en aguas naturales por UV/VIS.	198
ANEXO 18. Resultados de los blancos de reactivos para la determinación del límite de detección y de cuantificación del método de cuantificación de nitritos en aguas naturales por UV/VIS	199
ANEXO 19. Respuestas del instrumento obtenidas para cada ensayo del intervalo de linealidad del método de cuantificación de nitritos en aguas naturales a bajas concentraciones por UV/VIS	200
ANEXO 20. Curva de calibración promedio a bajas concentraciones del método de determinación de nitritos en aguas naturales, para la determinación del límite de detección y de cuantificación del método por UV/VIS	201
ANEXO 21. Evaluación del intervalo de respuesta lineal, de la linealidad y de la sensibilidad del método para determinar nitritos en aguas naturales a bajas concentraciones por UV/VIS	202
ANEXO 22. Resultados de la precisión del sistema en la determinación de nitritos por UV/VIS	203
ANEXO 23. Resultados de la repetibilidad del método en la determinación de nitritos por UV/VIS	205
Anexo 24. Resultados de la precisión intermedia y exactitud del método en la determinación de nitritos por UV/VIS	208
ANEXO 24. Resultados de la precisión intermedia y exactitud del método en la determinación de nitritos por UV/VIS	209
ANEXO 25. Respuestas del instrumento obtenidas para cada ensayo de intervalo de linealidad del método de cuantificación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales por UV/VIS	209

ANEXO 26. Resultados de los de los blancos de reactivos para la determinación del límite de detección y de cuantificación del método de cuantificación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales por UV/VIS	210
ANEXO 27. Respuestas del instrumento obtenidas para cada ensayo del intervalo de linealidad del método de cuantificación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales a bajas concentraciones por UV/VIS	211
ANEXO 28. Curva de calibración promedio a bajas concentraciones del método de determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales, para la determinación del límite de detección y de cuantificación del método por UV/VIS	212
ANEXO 29. Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método para determinar compuestos fenólicos en aguas residuales industriales a bajas concentraciones por UV/VIS	213
ANEXO 30. Resultados de la precisión del sistema en la determinación de compuestos fenólicos por UV/VIS	214
ANEXO 31. Resultados de la repetibilidad del método en la determinación de compuestos fenólicos por UV/VIS	216
ANEXO 32. Resultados de la precisión intermedia y exactitud del método en la determinación de compuestos fenólicos por UV/VIS	218
ANEXO 33. Resultados del intervalo de trabajo del método para determinar aceites y grasas en aguas por extracción Soxhlet	220
Anexo 34. Resultados de los de los blancos de reactivos para la determinación de los límites de detección y de cuantificación instrumental para el método de aceites y grasas en aguas por extracción Soxhlet	222
Anexo 35. Resultados de la determinación del límite de detección del método para la cuantificación de aceites y grasas en aguas por extracción Soxhlet	223
Anexo 36. Resultados de la determinación del límite superior del método para la cuantificación de aceites y grasas en aguas por extracción Soxhlet	224
Anexo 37. Resultados de la precisión intermedia del método en la determinación de aceites y grasas por extracción Soxhlex	225
anexo 37. Resultados de la precisión intermedia del método en la determinación de aceites y grasas por extracción Soxhlex	226

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

4-AATP	4- Aminoantipirina
APHA	American Public Health Association
ASE	Extracción con disolventes acelerada
AWWA	American Water Works Association
C₂Cl₄	Tetracloroetileno
Cd	Cadmio
CEIAM	Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales
CH₂Cl₂	Cloruro de metileno
r	Coeficiente de correlación
r²	Coeficiente de determinación
CV %	Coeficientes de variación
CVf	Coeficientes de variación de los factores respuesta
EAA	Etil acetoacetato
EC	Electroforesis capilar
ECA	Etilcianoacetato
EIS	Electrodos de iones selectivos
EMME	Éster etoxietileno maleico
EPA	Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos
FIA	Análisis de inyección en flujo
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier

GC	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IC	Cromatografía iónica
ICONTEC	Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación
IDEAM	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales
a	Intercepto
IR	espectrofotometría infrarroja
L	Litros
LCI	Límite de Cuantificación Instrumental
LCM	Límite de cuantificación del método
LDI	Límite de Detección Instrumental
LDM	Límite de detección del método
LLE	Extracción líquido-líquido
MBTH	3-Metil-2-benzotiazolinona hidrazona clorhidrato
MCR	Material de referencia certificado
µg	Microgramos.
mg	Miligramos.
µL	Microlitros.
mL	Mililitros.
MMA	4-(1-metil-1-mesitilcilobutano-3-il)-2- aminotiazol
MPAT	5-Metil-4-{{(1E)-fenilmetileno}}amino}- 2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona
MS	Espectrometría de masas
NEDH	N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato

NO₂⁻	Nitritos
NO₂⁺	Iones nitronio
NO₃⁻	Nitratos
NS	1-naftol-4-sulfonato de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
b	Pendiente
PNA	p-Nitroanilina
%R	Porcentajes de recuperación
S	Desviación estándar.
SA	Sulfanilamida
SFE	Extracción por fluidos supercríticos
SIA	Análisis de inyección secuencial
Sonicación	Extracción por agitación con ultrasonidos
Soxhlet	Extracción solido-líquido
SPE	Extracción en fase solida
UV/VIS	Ultravioleta-visible
WPCF	Water Pollution Control Federation
λ	Longitud de onda

RESUMEN

TÍTULO: ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS, NITRITOS, COMPUESTOS FENÓLICOS Y, ACEITES Y GRASAS UTILIZADOS COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN EN AGUAS NATURALES Y RESIDUALES INDUSTRIALES*

Autor: Silvia Juliana Molina Guevara**

Palabras claves: Nitratos, nitritos, compuestos fenólicos, aceites y grasas, contaminación, estandarización.

En la evaluación de la calidad del agua, los nitratos, nitritos, compuestos fenólicos y los aceites y grasas indican el grado de afectación del líquido. Su presencia modifica los procesos químicos y biológicos que normalmente ocurren en aguas naturales, trayendo consigo efectos perjudiciales tanto para el ecosistema como para los seres humanos. De esta manera el propósito del presente estudio fue el desarrollo y la estandarización de los métodos analíticos para la determinación de nitratos y nitritos en aguas naturales, compuestos fenólicos en aguas residuales industriales mediante, espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS), y aceites y grasas usando el método de extracción soxhlet.

La validación de éstas técnicas estableció evidencia documental, para el laboratorio del CEIAM, de que los procedimientos analíticos desarrollados produjeron resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad establecidos. Entre los atributos que se tuvieron en cuenta para demostrar la competencia de los métodos utilizados se encuentran: Linealidad e intervalo de respuesta lineal, sensibilidad, límite de detección del método, límite de cuantificación del método, precisión y exactitud [15]. Adicionalmente se realizaron ensayos de intercalibración con referentes externos, y se estimó la incertidumbre en las medidas y resultados obtenidos de los procesos de validación de los diferentes métodos, para lo cual se aplicaron criterios técnicos uniformes y consistentes.

* Trabajo de Grado.

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
Directora: Marianny Yajaira Combariza Montañez, Codirectora: Yaneth Quintero López

ABSTRACT

TITLE: STANDARDIZATION OF METHODS OF ANALYSIS FOR DETERMINATION NITRITES, NITRATES, PHENOLIC COMPOUNDS AND, OILS AND GREASES USED AS INDICATORS OF POLLUTION IN NATURAL AND INDUSTRIAL WASTE WATER*

Author: Silvia Juliana Molina Guevara **

Keywords: Nitrates, nitrites, phenolic compounds, oil and grease, pollution, standardization.

In the assessment of water quality, nitrates, nitrites, phenolic compounds and oils and greases indicate the degree of involvement of the liquid. His presence changes the chemical and biological processes that normally occur in natural waters, bringing with adverse effects both for the ecosystem and to humans. Thus the purpose of this study was the development and standardization of analytical methods for determining nitrate and nitrite in natural waters, phenolic compounds in industrial wastewater through, ultraviolet-visible spectrophotometry (UV / VIS), and oils and greases using the soxhlet extraction method.

The validation of these techniques introduced documentary evidence, for CEIAM laboratory of experimental approaches that were precise and accurate results within the specifications and quality attributes set. Among the attributes that were considered to demonstrate the power of the methods used are: Linearity and linear response range, sensitivity, detection limit of the method, the method quantification limit, precision and accuracy. Additionally intercalibration tests were performed with external referents, and estimated the uncertainty in measurement and results of the validation processes of the different methods, for which technical criteria were applied uniform and consistent.

* Graduation Project.

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
Directora: Marianny Yajaira Combariza Montañez, Codirectora: Yaneth Quintero López

INTRODUCCIÓN

El agua es fundamental para la vida en el planeta. Sin embargo, y debido al impacto de las diversas actividades humanas, se vierten hoy en ríos, lagos y acuíferos, grandes cantidades de contaminantes que alteran la calidad del preciado líquido. Estas prácticas alteran los ecosistemas y deterioran la calidad de vida del hombre porque tienen impactos dramáticos sobre actividades como el abastecimiento de agua potable, el riego, la pesca y la recreación, entre otros [1-2].

En Colombia, pese al enorme potencial en términos de recursos hídricos (aproximadamente cada colombiano dispone cerca de 40.000 metros cúbicos de agua al año), muchas poblaciones carecen de acceso a agua potable, puesto que cerca del 50% de la población del país, es decir 20 millones de personas viven en alto riesgo de escasez de agua, y más del 80% de los colombianos no disponen de servicios básicos de saneamiento. Esta situación se debe principalmente a un manejo inadecuado de los recursos hídricos unido a un control insuficiente de su contaminación [3-6]. Con base en lo anterior, se deben plantear soluciones a esta problemática mediante mecanismos de uso eficiente de los recursos hídricos que incluyan políticas de manejo y conservación de los recursos naturales, en especial del agua, junto con iniciativas económicas, sociales y educativas.

La investigación científica desempeña un papel importante en la conservación y el empleo racional del agua a través de la generación de conocimiento sobre los tipos y niveles de contaminación, el establecimiento de su impacto sobre el medioambiente y la estandarización de métodos de análisis para el diagnóstico,

control e implementación de posibles soluciones al deterioro del recurso. Por otra parte, el desarrollo y estandarización de técnicas de análisis de aguas es fundamental para asegurar la calidad de las mediciones [7].

La degradación de los cuerpos hídricos es causada principalmente por el vertimiento de aguas de tipo industrial y doméstico sin el tratamiento previo adecuado para remover los compuestos contaminantes. En la evaluación de la calidad del agua, los compuestos nitrogenados, fenólicos y los aceites y grasas indican el grado de afectación del líquido. Su presencia afecta los procesos químicos y biológicos que normalmente ocurren en aguas naturales [8-9].

Actualmente los laboratorios ambientales que realizan análisis de aguas requieren la implementación de métodos rápidos, precisos y económicos. Adicionalmente, la realización de estas mediciones está regulada por entidades gubernamentales de control, como el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) y el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC), que se encargan de acreditar los laboratorios asegurando a los clientes la emisión de resultados válidos y confiables en forma oportuna e imparcial [10-11].

El laboratorio del Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM) implementó su sistema de gestión de calidad bajo la Norma ISO/NTC 17025 “Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayo y calibración” ante la entidad encargada de la acreditación de los laboratorios en el sector ambiental, el IDEAM [12]. Durante la implementación del sistema de gestión de calidad mencionado se contempló la estandarización de varios métodos de análisis de aguas que se realizan en el laboratorio.

El presente estudio tiene como propósito el desarrollo y la estandarización de los métodos analíticos para la determinación de nitratos y nitritos en aguas naturales, compuestos fenólicos en aguas residuales industriales mediante, espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS), y aceites y grasas usando el método de extracción soxhlet. Estos estudios se desarrollaron con base en los métodos normalizados establecidos en [13], excepto la determinación de nitratos, realizada por el método del salicilato sódico contemplado en [14].

La validación de éstas técnicas estableció evidencia documental, para el laboratorio del CEIAM, de que los procedimientos analíticos desarrollados produjeron resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad establecidos. Entre los atributos que se tuvieron en cuenta para demostrar la competencia de los métodos utilizados se encuentran: Linealidad e intervalo de respuesta lineal, sensibilidad, Límite de detección, Límite de cuantificación, precisión y exactitud [15]. Adicionalmente se realizaron ensayos de intercalibración con referentes externos, y se estimó la incertidumbre en las medidas y resultados obtenidos de los procesos de validación de los diferentes métodos, para lo cual se aplicaron criterios técnicos uniformes y consistentes [16-17].

1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

1.1 CONTAMINACIÓN DEL RECURSO HÍDRICO

El agua superficial contiene una amplia variedad de sustancias disueltas o en suspensión que determinan su composición química (**Tabla 1**) la cual a su vez varía con la naturaleza del agua, localización geográfica y/o estación del año [18].

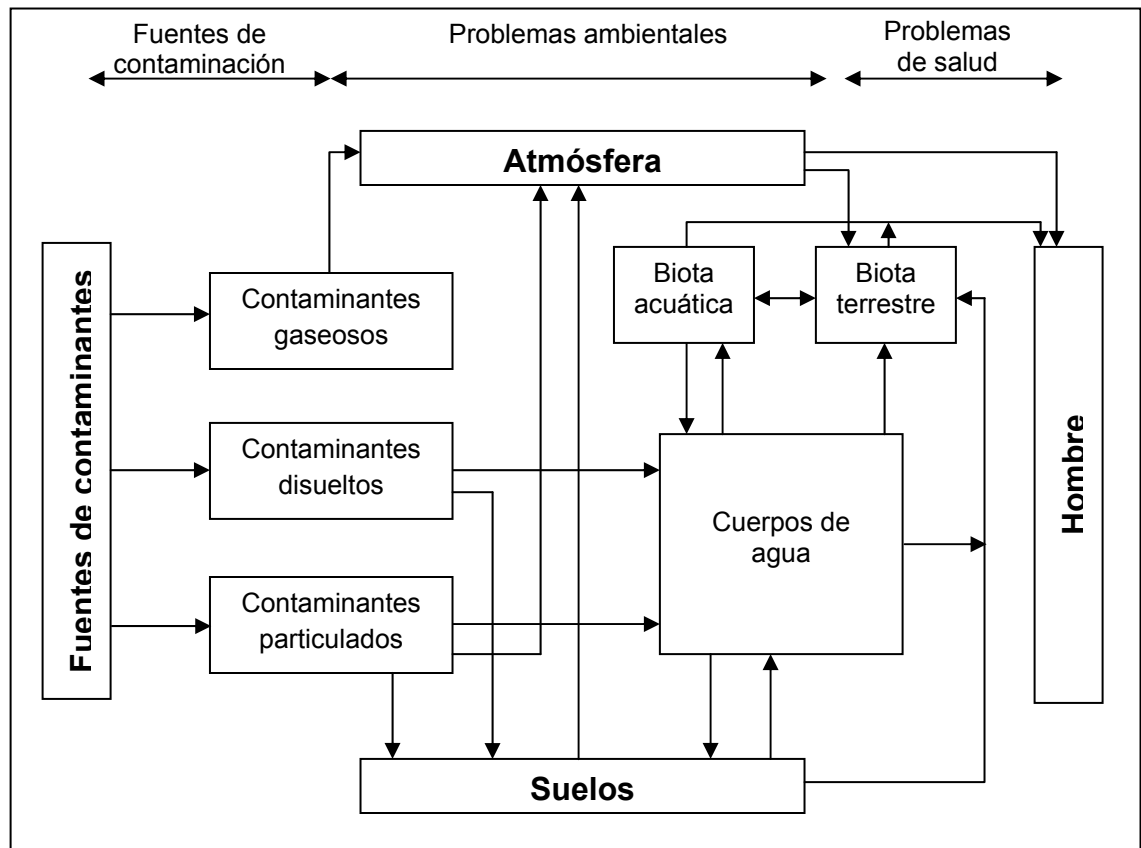
Tabla 1. Promedio de la composición química de las aguas naturales.

Aniones	%	Cationes	%	Otros	%
CO ₃ ²⁻	33.40	Ca ²⁺	19.36	(Fe,Al) ₂ O ₃	
SO ₄ ²⁻	15.31	Mg ²⁺	4.87	SiO ₂	9.24
NO ₃ ⁻	7.44	Na ⁺	7.46	H ₃ BO ₃	
PO ₄ ³⁻	1.15	K ⁺	1.77		
Cl ⁻	<0,10				

El deterioro de los recursos hídricos es uno de los más importantes problemas ambientales a nivel mundial, la vulnerabilidad del medio hídrico radica primordialmente en su alto poder para disolver y transportar una gran variedad de sustancias de desecho. Los contaminantes llegan a los cuerpos de agua a través de diversas trayectorias, las cuales incluyen la atmósfera y el suelo (**Figura 1**) [19]. De esta manera las aguas naturales se han convertido en el medio por excelencia mediante el cual se lleva a cabo el drenaje de productos generados por fuentes naturales (*i.e.* erosión, erupciones volcánicas y disolución de materiales de la corteza terrestre de degradación) o antropogénicas, es decir, producto de las

actividades humanas (*i.e.* minería, agricultura, transporte, vertimientos industriales, aguas domesticas, entre otras) [20]. Este último proceso altera la composición química del medio hídrico generando su degradación y contaminación [21-23].

Figura 1. Ruta de los contaminantes potenciales relacionada con el medio hídrico.



1.1.1 Nitratos y nitritos

Los nitratos y nitritos son aniones ubicuos que se encuentran en una amplia gama de matrices de sistemas naturales. Se catalogan como contaminantes importantes de los recursos hídricos y son generados en el ambiente durante la biodegradación de la materia orgánica nitrogenada [24]. La contaminación por

nitratos y nitritos se asocia mayoritariamente a actividades como la agricultura (fertilizantes, pesticidas, herbicidas y plaguicidas, etc) y la industria alimenticia, en menor proporción con actividades industriales, tanques sépticos, desechos de salas de ordeño, limpieza del ganado, gallineros, porquerizas, etc. En general, las concentraciones de compuestos nitrogenados en aguas naturales no superan niveles mayores de 18 mg NO_3^-/L y 1.0 mg NO_2^-/L , pero puede llegar a alcanzar elevados niveles como consecuencia de las actividades mencionadas anteriormente [25-26].

Los humanos están expuestos a los nitratos y nitritos por la ingestión de vegetales, agua y embutidos [27]. La elevada concentración de estos contaminantes en aguas de consumo se considera peligrosa para la salud humana ya que produce metahemoglobinemia, una enfermedad que reduce el transporte de oxígeno, generando cianosis y en concentraciones más altas asfixia [28]. Adicionalmente puede haber efectos cancerígenos y teratogénicos por la producción de nitrosocompuestos en el organismo. Desde el punto de vista del ecosistema niveles altos de nitratos y nitritos en el medio hídrico causan pérdida de la biodiversidad, ya que impiden y/o retardan el crecimiento de los seres vivos, alterando las función vascular y disminuyendo el nivel de oxígeno [29, 30].

Debido al impacto perjudicial sobre la salud que tienen los nitratos y los nitritos, algunos organismos han establecido límite de tolerancia de dichos iones en fuentes de alimenticias y aguas. Es así como en aguas potables la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece concentraciones máximas admisibles de 50 mg NO_3^-/L y 3 mg NO_2^-/L , [31] mientras el decreto Colombiano 1594 de 1984 estipula concentraciones permisibles de 10 mg NO_3^-/L y 1.0 mg NO_2^-/L [10].

1.1.2 compuestos fenólicos

Son compuestos que se caracterizan por tener un núcleo aromático unido a un grupo hidroxilo, bajo esta definición quedan incluidos el fenol propiamente dicho, los clorofenoles, nitrofenoles, alquilfenoles y polihidroxibencenos. Las propiedades de cada uno de estos compuestos químicos dependerán de la naturaleza de los grupos substituidos en el anillo bencénico. Son ampliamente utilizados en muchas áreas debido a sus múltiples aplicaciones como desinfectantes, antioxidantes, plaguicidas. Se emplean u originan en procesadoras de alimentos, industria farmacéutica, pigmentos, explosivos, refinerías de petróleo, fábricas procesadoras de metales, resinas fenólicas, etc [32].

La presencia de los compuestos fenólicos en el medio hídrico es muy marcada en la actualidad, debido al incremento en la producción de estas sustancias. Generando modificaciones en las propiedades organolépticas del agua, trayendo consigo efectos tóxicos y de bioacumulación en el ecosistema y por ende en los seres vivos [33].

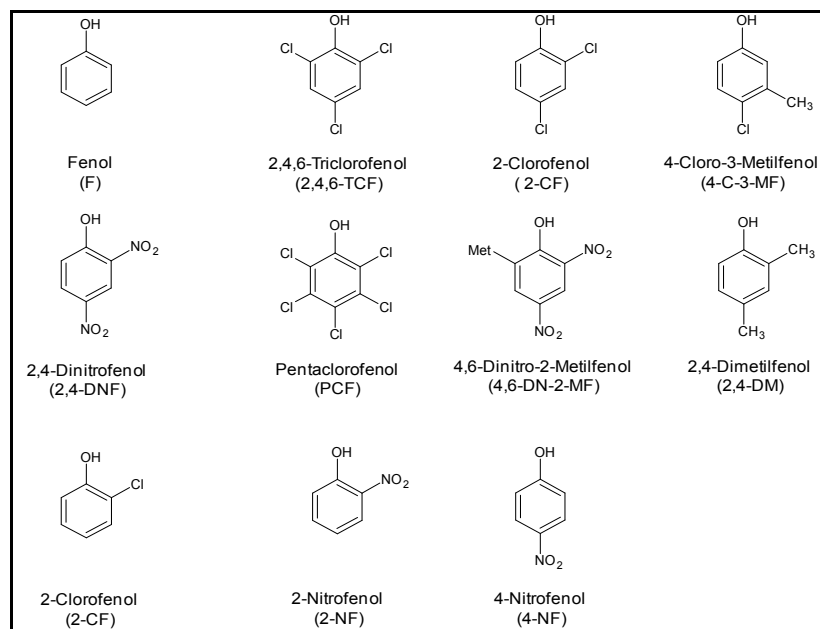
La toxicidad de los compuestos fenólicos en seres vivos varía de acuerdo con las clases, posición y número de sustituyentes en el núcleo aromático, siendo más elevada en los fenoles halogenados y aumentando en el orden orto- > meta- > para-. Los mecanismos de acción de los fenoles sobre los distintos organismos son diversos y comprenden efectos oncogénicos y mutagénicos [34].

Los compuestos fenólicos de origen natural, provenientes de combustibles fósiles y aceites esenciales, son fácilmente biodegradables, por tanto no existe acumulación en organismos acuáticos, gracias a la acción bacteriana que los descompone en dióxido de carbono [35]. Las aguas naturales contienen bajas

concentraciones de compuestos fenólicos naturales, usualmente inferiores a 1 µg/l, siendo los cresoles y los ácidos siríngico, vainílico y p-hidroxibenzoico los más comunes [36]. Todo lo contrario ocurre con los compuestos fenólicos sintéticos, que se catalogan como “compuestos refractarios” debido a su baja degradabilidad y su larga permanencia en los cuerpos de agua. En algunos casos sus concentraciones alcanzan hasta 4000 mg/L, razón por la cual la Agencia para la Protección del Ambiente de Estados Unidos (EPA) los clasifica como agentes contaminantes medioambientales de gran importancia (**Figura 2**) [37-38].

La cantidad máxima admisible para los compuestos fenólicos sintéticos en aguas residuales, según la EPA, es de 1mg/L [39], mientras el decreto 1594 de 1984 señala que la concentración debe ser de 0,2 mg/L [10].

Figura 2. Estructura y abreviaturas de los compuestos fenólicos clasificados como contaminantes prioritarios por la EPA.



1.1.3 ACEITES Y GRASAS

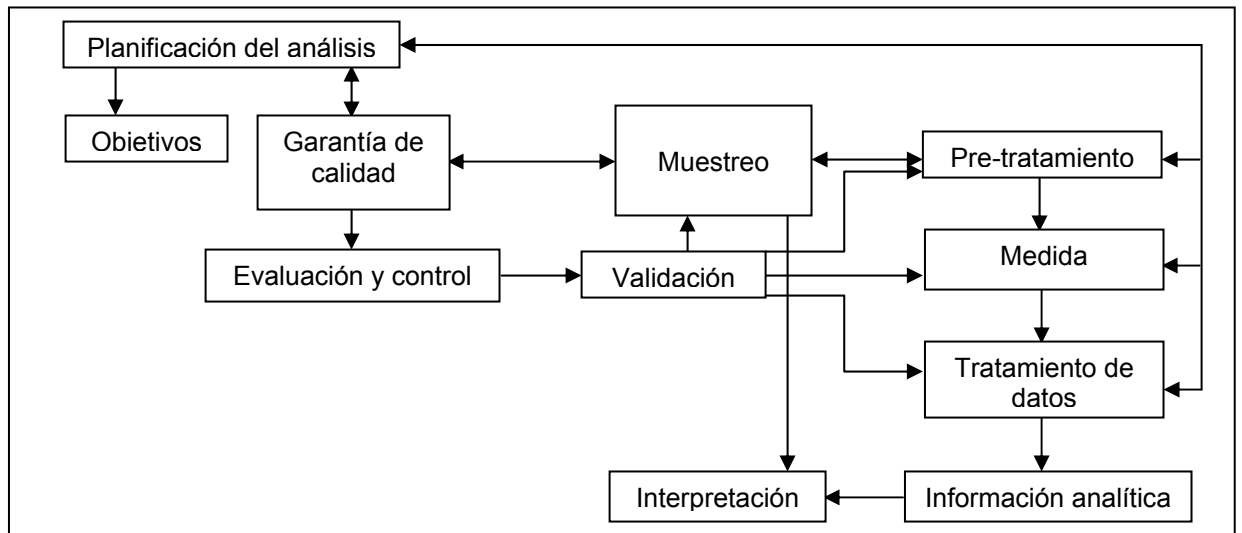
Los aceites y las grasas están clasificados como residuos peligrosos que presentan una gran estabilidad a la descomposición por bacterias, están constituidos por compuestos biogénicos tales como aceites vegetales, grasas animales, material vegetativo, además de una gran variedad de sustancias que pertenecen al grupo de los hidrocarburos del petróleo con alto y bajo peso molecular (*i.e* gasolina, combustibles pesados y aceites lubricantes) [40]. Generalmente los aceites y grasas se encuentran en los cuerpos de agua en forma de emulsiones o saponificados por la acción de productos químicos y detergentes. Estos contaminantes provienen de actividades humanas, derivadas principalmente de las industrias y refinerías de petróleo, mataderos y fábricas procesadoras de alimentos [41-42].

Los aceites y grasas aportan una cantidad considerable de diversos metales pesados y otros compuestos orgánicos que presentan una alta toxicidad para el medio ambiente y todos los seres vivos. La presencia de estos compuestos en las aguas naturales causa daño a la vegetación y a los animales, ya que se distribuyen sobre la superficie del agua creando una película que dificulta y/o impide el intercambio de oxígeno, causando la muerte de los diferentes organismos acuáticos y favoreciendo el crecimiento de algas y otras plantas anaerobias que deterioran la calidad del agua [43]. Diferentes normatividades incluyendo la Colombiana (decreto 1594 de 1984 y el 475 de 1998) han establecido que los aceites y grasas en aguas para consumo humano deben estar ausentes [10, 44].

1.2 ANÁLISIS DEL RECURSO HÍDRICO

El proceso de análisis de sustancias contaminantes en agua incluye las siguientes etapas: muestreo, pre-tratamiento de la muestra, medición (mediante ensayos químicos y/o técnicas instrumentales) y tratamiento estadístico de datos obtenidos (Figura 3) [45].

Figura 3. Etapas del proceso de análisis de calidad de los recursos hídricos.



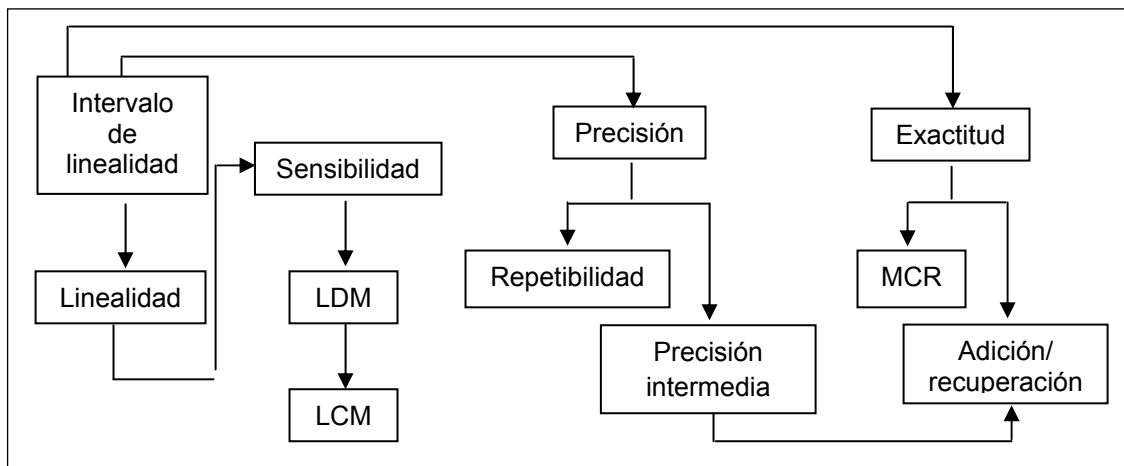
El objetivo de la etapa de muestreo es recolectar una muestra que sea representativa del cuerpo de agua que se requiere analizar. En este proceso se tienen en cuenta aspectos tales como la elección adecuada de los equipos y contenedores usados, así como la aplicación de protocolos de conservación de los analitos [46-47]. En la mayoría de los casos se requiere efectuar un pre-tratamiento a las muestras con el fin de eliminar o minimizar posibles interferencias, lo cual se logra por filtración, pre-concentración, separación, reacción previa y formación de derivados, entre otros [48]. Una vez adecuada la muestra se procede a la determinación del analito, para lo cual se debe

seleccionar el método más idóneo en función de la sensibilidad y selectividad requerida en el problema de análisis [49]. Generándose una serie de valores que se transforman mediante un tratamiento estadístico en resultados analíticos útiles para la interpretación medioambiental de los mismos [50]. Puesto que, con base en ellos se llegan a establecer leyes y normas de mitigación, control de la contaminación y protección del medio ambiente [45].

1.3 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD ANALÍTICA DE DATOS AMBIENTALES

El aseguramiento de la calidad analítica es fundamental en los laboratorios de análisis ambiental, ya que demuestra a los clientes y a los organismos de control que las evaluaciones se hacen de manera transparente, objetiva, documentada y que los procedimientos realizados en los laboratorios son válidos y confiables [51]. Para garantizar la confiabilidad de las medidas se deben cumplir con una serie de actividades sistemáticas y planificadas, entre las cuales se encuentra la estandarización de las metodologías analíticas [52]. Siendo este proceso un requisito de la norma NTC-ISO-IEC 17025 [12]. Por lo tanto, los laboratorios deben estandarizar todos los métodos que utilicen a través de la demostración formal de las siguientes figuras analíticas de mérito (**Figura 4**): intervalo de respuesta lineal, linealidad, sensibilidad, límites de detección (LDM) y cuantificación del método (LCM), precisión, exactitud e incertidumbre [53-55].

Figura 4. Figuras analíticas de merito en la estandarización de metodologías analíticas.



Donde la linealidad y el intervalo de linealidad son dos parámetros que se encuentran muy relacionados, puesto que se obtienen a partir del mismo grupo de ensayos. Siendo el intervalo de linealidad, el rango comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito, donde el método ha sido probado con un aceptable grado de linealidad, precisión y exactitud [56]. Mientras la linealidad representa la capacidad del método, dentro de un rango determinado (intervalo de linealidad), de obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra [57]. De otro lado, la sensibilidad de una metodología analítica se encuentra definida por los LDM y LCM [58-60], y corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo o que puede determinarse en una muestra, con razonable precisión y exactitud [61].

Igualmente importantes suelen ser la precisión y la exactitud, atributos de calidad que reflejan los errores aleatorios y sistemáticos presentes en las mediciones analíticas, respectivamente. Es así como la precisión indica la variabilidad del

método de ensayo evaluando la influencia del error sobre la medida en dos niveles distintos: repetibilidad y precisión intermedia [62-65]. Entretanto la exactitud hace referencia a la concordancia aproximada entre el valor obtenido en una medición y la cantidad realmente existente en el material examinado [66-68].

En la actualidad tiene gran importancia que los laboratorios determinen y suministren la incertidumbre asociada con los resultados analíticos [69-71]. Debido a que la incertidumbre es un parámetro que constituye un indicador comparativo de la calidad de la medición, a la vez que permite la obtención de un intervalo de confianza aproximado para el valor verdadero del mensurando [72-73].

1.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE NITRATOS Y NITRITOS EN AGUAS

En la bibliografía se aprecia que el análisis de nitratos y nitritos en muestras ambientales ha suscitado un creciente interés analítico, razón por la cual se ha propuesto una amplia variedad de técnicas para estas determinaciones. Las más extendidas han sido las espectrofotometrías en el UV/VIS, pero se han descrito también métodos electroquímicos, enzimáticos y cromatográficos, entre otros [74].

La estandarización de las metodologías analíticas para determinar nitratos y nitritos en aguas naturales fueron dos objetivos del presente trabajo, los cuales se desarrollaron por espectrofotometría UV/VIS. Puesto que, dichos analitos pueden sufrir una gran variedad de reacciones para su posterior medición espectrofotométrica, siendo muy comunes las reacciones de diazocoplación. [75-76].

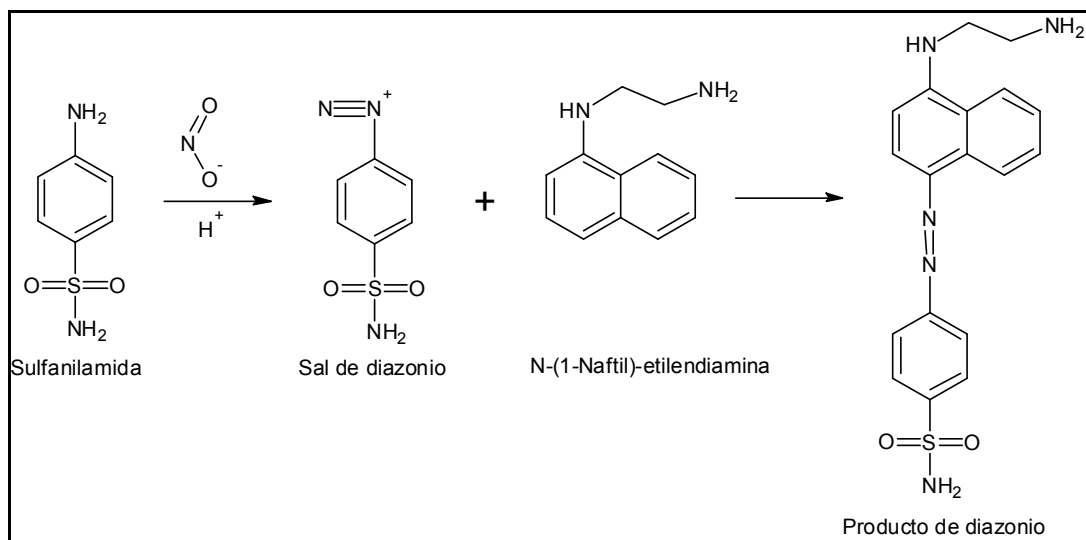
En 1879, Griess desarrollo un método que permitió la determinación de nitritos en diferentes matrices, presentándose un rango de linealidad de 1,4 - 35 mg/L y una absorptividad molar de $3,3 \times 10^4$ L/mol cm. Dicho método implicó la diazotización del NO_2^- con ácido sulfanílico y posterior acoplamiento con α -naftilamina, generándose un producto de diazonio que fue medido espectrofotométricamente a 520 nm. Ciertas desventajas afectan el desarrollo del método, entre las cuales se encuentran el alto poder carcinogénico de la 1-naftilamina, la inestabilidad del azocompuesto generado y la relativa lentitud de la reacción de acoplamiento [77-78].

Para eludir estos inconvenientes en 1941 Shinn sustituyó el ácido sulfanílico y α -naftilamina por sulfanilamida (SA) y N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato (NEDH), respectivamente, dando lugar a la formación de la bencenosulfonamida, que presenta un máximo de absorción a 543 nm. Este método presentó un rango de linealidad de 0,5-14 mg/L, una absorptividad molar de $4,0 \times 10^4$, alta precisión y exactitud. Sorteándose de esta manera los inconvenientes mencionados anteriormente, además de generar una menor sensibilidad en las variaciones en el pH y siendo adecuado para el análisis rutinario [79]. En la actualidad el método de Shinn es ampliamente usado en laboratorios de análisis y fue empleado durante el desarrollo del proceso de estandarización de nitritos en aguas naturales, expuesto en el presente trabajo [80].

De esta manera, la reacción de Shinn (**Figura 5**) ha sido la base de una amplia variedad de desarrollos metodológicos para evaluar el contenido de nitratos y nitritos en matrices ambientales [81-83], fundamentados en el uso de sistemas de reactivos distintos a los que se mencionaron anteriormente. Entre ellos se encuentran: o-nitroanilina)/ácido 1-aminonaftaleno-2-sulfónico, p-nitroanilina (PNA)/sulfapiridina, 1-naftol-4-sulfonato de sodio (NS), PNA/floroglucionol,

PNA/Acetilacetona, PNA/ácido citrazinico, sulfatiazola/NS y p-aminoacetofenona/NEDH [84].

Figura 5. Mecanismo de cuantificación de NO_2^- empleando la reacción Shinn.



Dichos métodos presentan ventajas significativas como rapidez, buena sensibilidad y relativa simplicidad de sus procedimientos operacionales [85]. Con el fin de mejorar la sensibilidad, en la mayoría de los casos, se ha incluido una etapa de pre-concentración del azocompuesto. El anterior objetivo se ha logrado, *i.e.* bien sea por retención del complejo en una columna empacada con naftaleno y yoduro de tetradecildimetilbencilamonio o mediante la pre-concentración del azocompuesto como su ion asociado con dodecil sulfato: sobre un filtro de membrana soluble en un solvente orgánico [86].

En 2006, en el Departamento de Estudios de Posgrados e Investigación en Ciencias Químicas de la Universidad de Mangalore, India, Cherian y Narayana [75], desarrollaron dos métodos espectrofotométricos selectivos y rápidos para la determinación cuantitativa de nitritos en aguas y suelos. Dichos procedimientos no requirieron etapas previas de extracción o calentamiento, asimismo no

involucraron condiciones fuertes. Se fundamentaron en la diazotización de la PNA en medio ácido, y posterior acoplamiento con el ester etoxietileno maleico (EMME) y etilcianoacetato (ECA), generando complejos altamente estables (aproximadamente 6 horas) y con máximos de absorción a 439 y 465 nm, correspondientemente. Se demostró el cumplimiento de la ley de Beer en los dos procedimientos puesto que se obtuvieron intervalos de linealidad de 0.5-16 y 0.2-18 $\mu\text{g NO}_2^-/\text{mL}$, absorptividades molares de 5.04×10^4 y $1,21 \times 10^4$ L/mol cm , sensibilidades de Sandell de 0.98×10^{-2} y 0.98×10^{-2} $\mu\text{g/cm}^2$, límites de detección de los métodos de 0,07 y 0,05 $\mu\text{g/mL}$ y límites de cuantificación de los métodos de 0,21 y 0,15 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

En la actualidad se han desarrollado estudios similares, junto a numerosas investigaciones efectuadas sobre una amplia variedad de aminas diazotizables y agentes acoplantes. A continuación (**Tabla 2**) se hace referencia a algunos trabajos, especificando algunas de sus características (lo cual hacen posible la determinación de concentraciones del NO_2^- del orden de ppm) y algunas observaciones [87]:

Tabla 2. Comparación de los métodos espectrofotométricos para la determinación de nitritos.

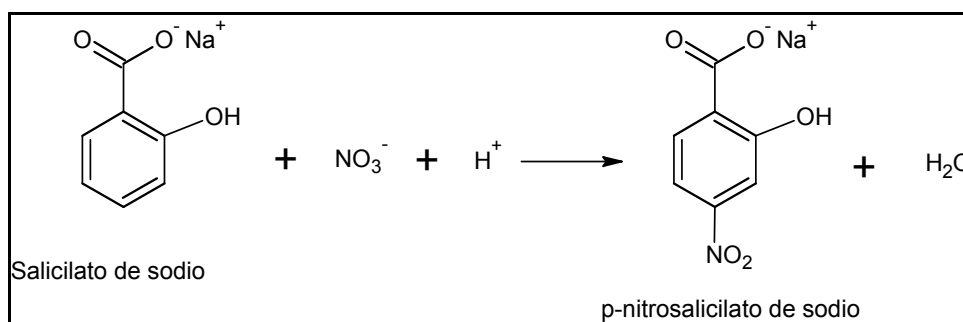
Reactivos	λ_{\max} (nm)	Rango de linealidad (mg/L)	Absortividad molar L/mol cm	Observaciones	Ref.
SA + EAA	356	0,2 -3,0	$1,22 \times 10^4$	Baja sensibilidad y estabilidad	75
Rodamina 6G	445	0 - 3,0	$1,2 \times 10^4$	Baja sensibilidad	88
Ácido p- aminobenzóico + NEDH	550	0,05 - 1,20	$2,74 \times 10^4$	Interferencias: Fe (II) y Fe(III)	
Dapsona + Iminodibencilo	570	0,02 - 0,60	$7,5 \times 10^4$	Interferencias: Fe (II), Fe(III), Vanadio, cobre y níquel	
Imipramina Clorhidrato + MBTH	640	0,02 - 7,00	$4,9 \times 10^3$	Baja sensibilidad	
PNA + Difenilamina	500	0,05 - 0,80	$1,425 \times 10^4$	Baja sensibilidad Interferencia: Fe ³⁺	89
PNA + Acetilacetona	490	0,05 - 1,40	$3,2 \times 10^4$	Baja sensibilidad Interferencias: Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , Co ²⁺ y Hg ²⁺	
PNA + 8-Hidroxiquinolina	550	0,01-0,06	$3,88 \times 10^4$	Depende del pH y tiempo	
PAA + Ácido citrazinico	495	0,05 - 1,20	$2,9 \times 10^4$	Baja sensibilidad, Interferencias: Fe ³⁺ and Cu ²⁺	
MMA + N,N-dimetilanilina	482	0,05-2,0	$2,03 \times 10^4$	Depende del pH y tiempo	90
PNA + SA	507	0.05 - 6.00	$1,59 \times 10^4$	Los procesos se favorecen	
PNA + Acetoacetato de etilo	356	0.20 - 3.0 0	$1,22 \times 10^4$	en condiciones de acidez	

La determinación de nitratos en aguas es difícil dado los procedimientos complejos con los que se cuentan, la posibilidad de encontrar sustancias interferentes y los rangos de concentración limitados que presentan las diferentes técnicas. La gran mayoría de los métodos espectrofotométricos propuestos para la determinación de nitratos en muestras ambientales, involucran el uso de reacciones de nitración, oxidación y/o reducción [91]. Seguidas por los procesos de diazotización, obteniéndose en todos los casos compuestos azoicos que son medidos espectrofotométricamente por el método de Shinn o cualquiera de sus métodos derivados. Sin embargo, la gran mayoría presentan desventajas significativas, puesto que, la intensidad del color desarrollado de los cromóforos es función del tiempo y la temperatura; por lo que ambos factores deben ser cuidadosamente controlados [92]. Algunos de los métodos espectrofotométricos más importantes, para la cuantificación de nitratos en aguas, son: ácido cromotrópico, ácido fenoldisulfónico, brucina y salicilato de sódico [91, 93].

Siendo el método del salicilato sódico el que presenta la mayor difusión y aplicabilidad en los laboratorios como análisis de rutina. Por lo tanto, fue el usado en el presente trabajo para realizar la determinación de nitratos en aguas naturales, teniendo en cuenta las ventajas y limitaciones inherentes de los métodos espectrofotométricos. Dicho método está basado en la formación de los iones nitronio (NO_2^+) a partir de la nitración del salicilato de sodio, bajo condiciones de acidez (H_2SO_4) y calentamiento. De esta manera los NO_2^+ sufren reacciones de diazotación con hidróxido de sodio y tartrato de disodio y potasio, dando lugar a la formación del p-nitrosalicilato de sodio que es medido por espectrofotometría UV/VIS a 415 nm (**Figura 6**). Debido a que el procedimiento involucra el calentamiento de las muestras hasta sequedad total, se requiere un estricto control de temperatura ($\sim 75\text{-}80\text{ }^\circ\text{C}$). Lo cual origina desventajas significativas en el método tales como alta laboriosidad, lentitud y limitación del

número de muestras que se pueden manejar. Sin embargo, se ha demostrado que el color desarrollado y por ende las propiedades ópticas del p-nitrosalicilato de sodio permanecen estables cerca de 2 días. El método proporcionó resultados altamente reproducibles en el intervalo de 0,2 a 16 mg NO₃⁻/L [14, 94].

Figura 6. Mecanismo de cuantificación de NO₃⁻ empleando el método del salicilato de sodio.



En 2002, en el Centro de Tecnología Mineral, CETEM, Coordenação de Química Analítica, Rio de Janeiro / RJ, Brazil, Monteiro y colaboradores [95], desarrollaron y estandarizaron el método del salicilato sódico para la medición de nitratos en aguas potables, lo anterior se realizó con base en el procedimiento estándar establecido en [14]. Se evaluaron las principales figuras analíticas de merito (**Tabla 3**) del método, obteniéndose resultados satisfactorios.

Tabla 3. Figuras analíticas de merito para la determinación de nitrato por el método desarrollado por Monteiro y colaboradores.

Figuras analíticas de merito	Resultados
Absortividad molar (L/mol cm)	1,01 × 10 ⁴
Coefficiente de correlación en la curva de calibración (R ²)	0,9993
Pendiente de la curva de calibración	0,024
Rango de concentración del método (mg NO ₃ ⁻ /L)	0,10 – 1,0
Límite de detección (mg NO ₃ ⁻ /L)	0,01

Límite de determinación (mg NO ₃ ⁻ /L)	0,10
--	------

Puesto que, se comprobó una alta linealidad (coeficiente de correlación, $R^2 > 0,999$) dentro del intervalo de trabajo (0,10–1,0 mg NO₃⁻/L) del método, un límite de detección (0,01 mg NO₃⁻/L) y de cuantificación del método (0,1 mg NO₃⁻/L) menores que los establecidos por la EPA (10 mg NO₃⁻/L) en aguas potables y una buena precisión (desviación estándar relativa > 4%). Asimismo, se demostró una aceptable exactitud, ya que su estudio (**Tabla 4**) proporcionó porcentajes de recuperación de 88, 98 y 106%.

Tabla 4. Resultados de la exactitud en los análisis nitratos en muestras de aguas potables por el método desarrollado por Monteiro y colaboradores.

Muestras	Concentración inicial (mg/L)	Concentración adicionada (mg/L)	Concentración obtenida (mg/L)	% Recup.
I	0,12 ± 0,02	1,0	0,99 ± 0,03	88
II	0,15 ± 0,03	1,0	1,13 ± 0,02	98
III	0,09 ± 0,01	1,0	1,17 ± 0,03	106

Con base en lo anterior, se concluye que el método estandarizado se aplicó eficazmente para la determinación de nitratos en aguas potables. Durante la etapa de estandarización, la metodología demostró ser lineal, reproducible y aceptablemente exacta, características que la hacen adecuada y confiable para el objetivo propuesto.

Igualmente importante es la determinación espectrofotométrica de NO₃⁻, antecedida por reacciones de reducción de dicho ión a NO₂⁻. La etapa de reducción se efectúa por métodos enzimáticos y/o con el empleo de agentes reductores [96-97]. Aunque los métodos enzimáticos encuentran su mayor aplicación en muestras biológicas, se ha abierto camino en análisis ambientales,

siendo generalizado el uso de la nitrato reductasa bacteriana acoplada con la reacción de Griess [98-99].

Mientras, la reducción por agentes reductores se logra haciendo pasar la muestra a través de una columna que contiene el agente reductor [87]. Posteriormente, el NO_2^- generado se determina por el método Griess-Shinn, aunque también se emplean variantes del mismo [100-101]. Se han utilizado varios agentes reductores como zinc, cobre, sulfato de hidracina y cadmio (Cd) cuperizado. Siendo mas extenso el uso de Cd cuperizado como agente reductor, este fue propuesto por Potzl y Reiter en 1960 y diversos autores [102-105] lo han incorporado a sus métodos logrando rendimientos de reducción superiores al 90% en todos los casos [106]. Con el fin de incrementar la reproducibilidad, disminuir el tiempo de análisis y minimizar el gasto de reactivos, se han adaptado estos métodos para análisis de inyección en flujo (FIA) y análisis de inyección secuencial (SIA) [100-101, 107-109].

De otro lado, los nitratos presentan una amplia gama de reacciones electroquímicas, esto ha permitido el desarrollo de un gran número de métodos potenciométricos y amperométricos para la cuantificación de dicho ión. En la actualidad se usan electrodos de iones selectivos (EIS) basados en sales cuaternarias de amonio, que son excelentes intercambiadoras de iones incorporadas a una membrana polimérica [110]. Sustituyéndose de esta manera electrodos de membrana líquida con solución de referencia interna por electrodos de membrana líquida sobre un soporte conductor [111-113]. Se han reportaron intervalos de linealidad del orden de 10^{-5} a 10^1 mol/L, límites de detección de 10^{-5} mol/L y una buena selectividad, siendo marcado el efecto para los iones yoduro y clorato [114-115]. Igualmente importantes ha resultado ser el desarrollo de los biosensores amperométricos, los cuales emplean mecanismos o principios biológicos para el reconocimiento de los NO_3^- . En la mayoría de los trabajos

reportados ha sido generalizado el uso de la enzima nitrato reductasa y su agente de reducción natural nicotinamida adenina dinucleótido [99], exhibiéndose límites de detección del orden de 10^{-6} mol NO_3^-/L [116].

En la actualidad la IC ha recobrado gran importancia en los procesos de separación y determinación de nitratos y nitritos. Lo anterior con el fin de incrementar la reproducibilidad, selectividad y sensibilidad en la detección de dichos iones, generando bajos límites de detección y cuantificación en cortos tiempos de análisis [117-118]. Adicionalmente, la IC ofrece la posibilidad de realizar la determinación simultánea de iones tales como fluoruros, cloruros, fosfatos, bromuros, sulfatos y sulfitos [119]. En general, las muestras se miden directamente sin pre-tratamiento, excepto filtración a través de poro de $0.45 \mu\text{m}$ [120-121]. La separación de NO_3^- y NO_2^- por IC se lleva a cabo en columnas de intercambio aniónico empaquetadas con moléculas hidrofóbicas que contienen grupos iónicos funcionales (*i.e.* cloruro de N-cetilpiridina y salicilato de N-cetilpiridina), diversas sales de amonio cuaternario o de fosfonio [122]. Recientemente se han usado microcolumnas y nuevos rellenos en las columnas de intercambio de iones, *i.e.* zwitter-iónicas, permitiendo una mayor selectividad [123-129].

Con respecto a los eluyentes, aquellos que presentan baja conductancia son típicamente usados en el proceso de separación de nitratos y nitritos [130], entre estos figuran: ftalato [131], benzoato, sulfobenzoato, citrato [132], ácido cianurico [133], gluconato-borato [134], alcanosulfonatos [135], polimetacrilato y cetiltrimetilamonio [136], ya sea como sal o en forma ácida. Por otro lado, la detección de los nitratos y nitritos se logra por detección electroquímica, potenciométrica, conductimétrica, espectrofotométrica UV/VIS y derivatización post-columna [117-119].

1.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN AGUAS

Debido a las múltiples aplicaciones de los compuestos fenólicos y por su gran importancia nutricional en unos casos y toxica en otros, es necesario disponer de métodos analíticos que permitan la identificación y cuantificación de estos compuestos en muestras clínicas, medioambientales y alimentarias [137]. Con el fin de alcanzar este propósito, se han desarrollado una extensa variedad de métodos analíticos. Los más importantes están relacionados con la espectrofotometría UV/VIS, FIA, la cromatografía de gases (GC), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la electroforesis capilar (EC) [138-139].

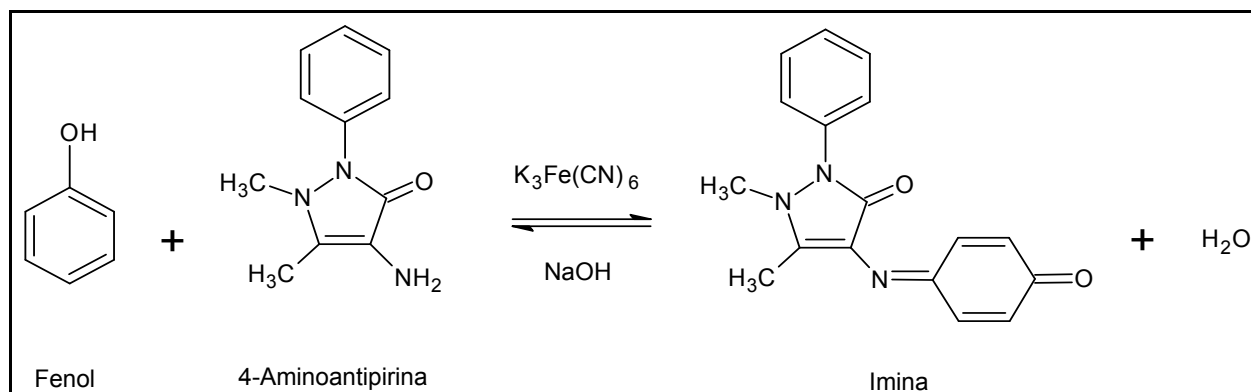
Tradicionalmente los compuestos fenólicos se han determinado por métodos espectrofotométricos UV/VIS, puesto que, estos contaminantes son capaces de sufrir una gran variedad de reacciones de diazocoplación, generando especies intensamente coloreadas que son fácilmente cuantificables por espectrofotometría UV/VIS [140]. Para lo cual se han empleado diferentes reactivos, tales como: 2,4,6-Trimetilnilina, 0-Toluidina, Bendicina, Sales de amonio cuaternario, Monobromuro de yodo, MBTH y Nitroprusiato de sodio, entre otros. Además, los métodos empleados en la cuantificación de fenoles presentan ventajas en cuanto a su relativa simplicidad, facilidad de aplicación en cualquier laboratorio, confiabilidad, rapidez, sencillez, reproducibilidad y bajo costo [141-142].

Sin embargo, la determinación compuestos fenólicos por métodos espectrofotométricos UV/VIS tiene desventajas como la baja especificidad, ya que se determina la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en la muestra, sin hacer distinción entre los diferentes tipos de fenoles. Adicionalmente, los compuestos fenólicos que presentan sustituyentes arilo, alquilo, nitro, benzoilo o

carbonilo en la posición *para* del anillo aromático no pueden ser detectados por estos métodos, ya que tienen bloqueada la posición más activa para las reacciones de condensación y de copulación [143].

La estandarización de los compuestos fenólicos en aguas residuales fue uno de los objetivos del presente trabajo, lográndose a partir del desarrollo del método estándar de la 4-aminoantipirina (4-AATP). Dicho método fue propuesto por Emerson y Kelly en 1948 [144-145] e implica la separación de los compuestos fenólicos respecto de la matriz de fondo mediante destilación con arrastre de vapor, con el fin de eliminar las impurezas no volátiles e incrementar la selectividad del método [146-148]. Posteriormente, ocurre la oxidación del fenol en medio alcalino con el ferrocianuro de potasio $[K_3Fe(CN)_6]$ y la posterior condensación con la 4-AATP para formar una imina coloreada (1,2- dihidro- 1,5- dimetil- 4- [(4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-iliden) amino]- 2-fenil) que puede ser detectada por espectrofotometría UV/VIS a una λ de 500 nm. La reacción que tiene lugar se detalla a continuación en la **Figura 7** [144, 149].

Figura 7. Reacción de derivatización para la determinación espectrofotométrica de los compuestos fenólicos.



Un trabajo interlaboratorio fue desarrollado con base en el método espectrofotométrico de la 4-AATP establecido en la norma D 2777 y dirigido a la determinación de compuestos fenólicos en diferentes matrices acuosas. Estableciéndose un límite de detección del método de 0,1 mg/L, mientras la precisión y sesgo del método proporcionaron los resultados que se muestran en la **Tabla 5** y **6**, respectivamente.

Tabla 5. Resultados de la precisión del estudio interlaboratorio.

Nivel	Matriz de agua reactiva mg/L			Matriz de agua opcional mg/L		
	6,930	34,430	68,780	6,960	34,240	68,940
n	27	27	26	26	26	26
S _T	0,228	1,274	2,653	0,400	1,113	3,152
S _o	0,226	1,035	2,460	0,337	1,080	2,460
S _o : C. V. (%)	3,3	3,0	3,5	4,7	3,1	3,5

Donde:

S_T = Desviación estándar entre laboratorios;

S_o = Desviación estándar dentro del laboratorio (a partir del promedio geométrico de varianzas ponderadas de los laboratorios individuales);

C.V. = Coeficiente de variación.

Tabla 6. Resultados de la exactitud del estudio interlaboratorio.

Matriz de agua reactiva			
Cantidad adicionada mg/L	Cantidad encontrada mg/L	± Sesgo mg/L	± Sesgo %
7,154	6,930	-0,224	-3,1
35,768	34,430	-1,338	-3,7
71,535	68,777	-2,758	-3,9
Matriz de agua reactiva			
Cantidad adicionada mg/L	Cantidad encontrada mg/L	± Sesgo mg/L	± Sesgo %

7,154	6,958	-0,196	-2,7
35,768	34,242	-1,526	-4,3
71,535	68,942	-2,593	-3,6

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que el método evaluado presenta una buena precisión y exactitud. Puesto que, se obtuvieron para la precisión a nivel intralaboratorio e interlaboratorio C.V. inferiores a 5% y S_0 cercanas o menores a ± 2 , respectivamente. En relación a la exactitud, la prueba de adición proporcionó sesgos inferiores a 9%. Adicionalmente, se puede inferir que ninguna de las matrices usadas mostró tener un mayor efecto sobre la precisión o el sesgo de los resultados que cualquier otra [150].

Con el fin de proporcionar una mayor reproducibilidad, incrementar la velocidad de los análisis y reducir el consumo de reactivos, el método de la 4-AATP fue adaptado a FIA con el consiguiente beneficio medioambiental y económico [138, 146]. En la actualidad la determinación de compuestos fenólicos se ha desarrollado a partir de un número significativo de métodos automatizados, los cuales suelen incluir una etapa de preconcentración en línea acoplada al sistema de análisis en flujo, incrementándose la sensibilidad del método de la 4-ATTP [151] y obteniéndose LDM del orden de partes por billón (ppb) [148]. Los métodos de preconcentración más utilizados son: extracción líquido-líquido (LLE) [152], extracción en fase sólida (SPE) [153], extracción por fluidos supercríticos (SFE) [154] y extracción con membrana [155].

Hoy en día ha surgido la necesidad de la identificación individual de compuestos fenólicos, para lo cual se han empleado técnicas tradicionales de separación, como cromatografía de gases (CG), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y electroforesis capilar (EC), acopladas a diferentes sistemas de detección [156-159].

Siendo GC la técnica usada con más frecuencia en el análisis de compuestos fenólicos, puesto que, posee una buena eficacia en la separación, una alta velocidad y sensibilidad de detección [160]. Sin embargo, el análisis de dichos analitos presenta ciertas dificultades, debido en gran parte a ciertas propiedades inherentes de los compuestos fenólicos como la alta polaridad y baja presión [158-164].

Los fenoles más volátiles y de bajo peso molecular pueden ser separados directamente, aunque en algunos casos, especialmente polifenoles se requiere la derivatización química con el fin de aumentar su volatilidad y mejorar sus propiedades químicas [165-168]. Por medio de GC se han obtenido recuperaciones superiores al 70% para distintos compuestos fenólicos estrogénicos tales como el 4-nonilfenol, el 4-t-octilfenol, el bisfenol A, el 2-t-butil-4-metil, el 4-hidroxibifenilo, el 2-hidroxibifenilo, el 4-cloro-3-metil y el 4-cloro-2-metil [159].

Una buena alternativa a GC resulta ser la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), siendo empleada rutinariamente para la cuantificación de mezclas complejas de fenoles [169-176]. La principal ventaja de esta técnica es que puede ser usada sin derivatización, lo cual es estrictamente necesario en la aplicación de GC [166]. Aunque en algunos casos se hace necesario realizar tratamientos de pre-concentración y derivatización [155]. En el análisis de compuestos fenólicos por HPLC se han empleado comúnmente columnas de C₁₈ o C₈ y sistemas de detección basados en espectrofotometría UV/VIS, MS y electroquímica [169, 177]. HPLC acoplado con detección espectrofotométrica UV/VIS de fotodiodos integrados ha sido aplicado a pesticidas fenólicos, proporcionado límites de

detección comprendidos entre 0.05-0.16 $\mu\text{g/L}$ para el pentaclorofenol, el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol, el 2- nitrofenol y el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol) [168].

La electroforesis capilar (CE) ha llegado a constituirse en una alternativa y/o complemento de las separaciones cromatográficas para el análisis de compuestos fenólicos. Debido principalmente a que es una técnica de alta resolución, no requiere proceso de derivatización y los análisis se efectúan en corto tiempo [178]. La separación de los analitos de interés pueden verse influenciados por la composición, el voltaje aplicado, la concentración y el pH del electrolito [179-180]. Mientras los sistemas de detección usados con mayor frecuencia son los basados en la espectrofotometría UV/VIS, amperometría y fluorescencia [181].

1.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ACEITES Y GRASAS EN AGUAS

La determinación de aceites y grasas en muestras de aguas se desarrolla a través de dos etapas: una, de extracción de los analitos y, otra de análisis. Se han implementado diversas técnicas para cada una de estas etapas teniendo en cuenta factores como costo, tiempo, propiedades de los analitos (composición compleja y heterogénea) y sensibilidad requerida [40].

Las técnicas de extracción sólido-líquido (soxhlet) y LLE son las más utilizadas para la extracción de aceites y grasas en agua, puesto que, muchos métodos de la EPA y de la FDA (Food and Drugs Administration) utilizan estas técnicas tradicionales como métodos oficiales y no requieren una instrumentación costosa [13,182]. Sin embargo, en los últimos años se han implementado nuevas técnicas como SPE, extracción por agitación con ultrasonidos (sonicación), extracción asistida por microondas (MAE), SFE y extracción con disolventes acelerada

(ASE). A continuación, en la **Tabla 7** se reseñan las principales técnicas para la extracción de aceites y grasas en aguas [41-42, 183-187].

Con el fin de alcanzar la mejor eficiencia en las técnicas de extracción anteriormente mencionadas, se ha realizado una buena elección de los solventes, la cual a su vez esta determinada por diversos factores como: costo, calidad espectral, regulaciones del método, toxicidad y disponibilidad [185]. De esta manera se han propuesto una amplia variedad de solventes entre los cuales figuran: cloruro de metileno, tetracloroetano, tetracloroetileno (C_2Cl_4), hexano, hexano-dietil éter, hexano-metil tert-butil éter (80 + 20 v/v), cloruro de metileno y pentacloroetileno, entre otros. Siendo los solventes clorofluorocarbonos (1, 1, 2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano o Freón 113) relegados, ya que contribuyen a la disminución del ozono estratosférico (según el protocolo de Montreal de 1999) [41-42, 187-189].

Tabla 7. Comparación de las diferentes técnicas para la extracción de aceites y grasas.

Técnica	Principio	Ventajas	Desventajas
Soxhlet [182]	El disolvente pasa continuamente por la muestra extrayendo el analito que se recoge en otro recipiente.	Favorece la solubilidad del analito. Instrumentación simple.	Requiere largos tiempos de análisis y grandes cantidades de solvente.
Sonicación [185]	La muestra y el disolvente se someten a la acción de ondas de ultrasonido para promover la transferencia del analito de la muestra al solvente.	Técnica mas rápida que la extracción Soxhlet, y también puede requerir menos solvente.	La efectividad puede ser menor a la obtenida por la extracción Soxhlet.
LLL [187]	La muestra se distribuye entre dos fases inmiscibles elegidas para maximizar las diferencias de solubilidad.	Técnica sencilla y barata. Alta efectividad para extraer compuestos polares o apolares.	Proceso lento y laborioso. Genera emulsiones. Requiere volúmenes grandes de solventes orgánicos.
SPE [183, 189-190]	El líquido se pasa a través de una fase sólida que selectivamente retiene el analito o la matriz, y son posteriormente eluidos con un disolvente.	Manipulación mínima de muestra. Reducción del tiempo de análisis.	Se extraen solo los componentes disueltos. Presenta problemas de obstrucción en líquidos viscosos.
MAE [186]	Absorción de la energía de microondas por parte de la muestra, permitiendo la difusión de los componentes desde la matriz hasta el disolvente que la rodea.	Análisis rápidos (30s-15min). Bajo consumo de disolventes (1-15 mL). Técnica robusta y fácil de usar.	Depende de la matriz y limita los disolventes que se pueden utilizar. Elevado costo del equipo. Poca selectividad.
SFE [41-42]	Se pasa un fluido supercrítico a través de la muestra, después de la despresurización, los analitos extraídos se recogen en un disolvente o en un adsorbente del que se desorben posteriormente.	Análisis rápidos (<10-60min). Alta selectividad. Los fluidos supercríticos son baratos y no tóxicos.	Requiere de una etapa de purificación. No es muy efectiva para extraer compuestos polares y requiere adición de modificadores.
	La muestra se calienta por encima de su	Análisis rápidos (< 15min). Alta	Baja selectividad. Requiere

ASE [185]	punto de ebullición en un recipiente cerrado, originándose aumento de presión, la muestra extraída es automáticamente separada y transferida a un vial.	eficiencia independiente de la matriz. Es automatizable y extrae muestras secuencialmente.	empleo de temperaturas mas altas que en SFE. Instrumentación costosa.
---------------------	---	--	--

Se han desarrollado numerosos métodos analíticos que permiten el análisis de aceites y grasas en muestras medioambientales, alimenticias e industriales. Estos métodos se fundamentan en técnicas tales como: gravimetría, GC, espectrofotometría infrarroja (IR) y UV/VIS [191-192].

La American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) y Water Pollution Control Federation (WPCF) han propuesto para el análisis de aguas y aguas residuales los métodos estándares de partición gravimétrica (5520 B), de partición infrarrojo (5520 C) y extracción soxhlet-gravimétrico (5520 D) [13]. Los métodos gravimétricos son los que presentan la menor sensibilidad ya que por lo general suele ser mayor que 10 mg/L, mientras los métodos basados en la espectrofotometría IR son altamente sensibles proporcionando en la mayoría de casos LDM cercanos o menores de 0,2 mg/L [192].

Siendo el método de extracción soxhlet-gravimétrico el de mayor difusión en los laboratorios ambientales, debido a su sencilla aplicación y bajo costo. Por lo tanto, fue usado en el presente trabajo para la determinación de aceites y grasas en aguas, este método resulta ser adecuado cuando las muestras contienen fracciones relativamente polares, de petróleo pesado o cuando los niveles de grasas no volátiles pueden amenazar el límite de solubilidad del disolvente [13, 192-193]. El método consiste en la adsorción de aceites y grasas en tierras de diatomáceas, que son extraídas en soxhlet usando n-hexano como disolvente. Una vez terminado el proceso de extracción se evapora el disolvente y finalmente se pesa el residuo que ha quedado en el recipiente, siendo este valor el contenido de aceites y grasas [194]. Sin embargo, el método de extracción soxhlet-gravimétrico presenta desventajas significativas como la baja sensibilidad (usualmente LDM entre 5-10 mg/L), pérdidas de constituyentes que se volatilizan a

temperaturas por encima de las usadas para la evaporación del solvente e incluso compuestos que no se catalogan como aceites y grasas pero son extraíbles por el solvente y por lo tanto contribuyen al peso final [13, 192].

En 2000, en el Conrad Blucher Institute – Texas A & M de la Universidad de Corpus Christi, Louchouart y colaboradores [185], desarrollaron dos métodos para determinar aceites y grasas en aguas. Empleándose la sonicación y ASE como técnicas de extracción, el solvente usado fue diclorometano. Los métodos exhibieron altas recuperaciones de $95\pm 6\%$ y $98\pm 14\%$, respectivamente, lo cual demuestra que no existen diferencias significativas en los dos procesos de extracción. Además la eficiencia de los métodos fue altamente lineal sobre el rango evaluado y la variabilidad fue cercana al 10% en ambos casos.

Actualmente la espectrofotometría IR tiene una gran importancia en la cuantificación de aceites y grasas en aguas [195], debido a que los métodos basados en dicha técnica son precisos, robustos y exactos (porcentajes de recuperación como del 91.86, 90.82, 94.11, 93.44, 96,10 y 96.06%) [196]. La medición cuantitativa de estos contaminantes se efectúa con base en el espectro del extracto obtenido, puesto que, los espectros IR de los aceites y grasas presentan una serie de bandas características con ciertas variaciones en los distintos tipos de muestras [197].

Un trabajo reciente, liderado por Farmaki y colaboradores [40], dirigido a la determinación de aceites y grasas en aguas potables y superficiales por espectrofotometría de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), propone el uso de una solución de iso-octano y n-hexadecano como estándar interno para su cuantificación y como solvente el C_2Cl_4 . Esta propuesta fue hecha ya que se

obtuvo una alta linealidad ($r^2=0.9901$) en el rango de concentración comprendido entre 1.6 a 50 mg/L, un LDM de 0,1 mg/L, una buena robustez y alta precisión.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

2.1.1 Equipos y material de laboratorio. Los materiales y equipos de laboratorio utilizados en la determinación de nitratos, nitritos, compuestos fenólicos y, aceites y grasas en aguas fueron: Material de vidrio volumétrico y aforado clase A, Espectrofotómetro de absorción molecular UV-visible Spectronic modelo 601 marca Milton Roy, Equipo de extracción Soxhlet B-811 marca Buchi, Medidor multiparámetro docking station sension 156 5187560 marca Hach, Equipo de destilación 3300 marca Vilab, Balanza analítica 770-14 marca Kern, Estufa 3510 L-C-OVEN marca Lab-Line, Plancha de calentamiento PCV/A-1 marca E&Q, Bomba de vacío, pH metro Hanna modelo HI 8314 con electrodo HI 1230B, Baño ultrasónico LC-30H marca Ultrasonic, Cabina de extracción, desecador, Embudo Büchner, Tubo nessler, Filtro de membrana de 0,45 μm de diámetro de poro, Papel filtro con tamaño de poro fino de 11 cm de diámetro y Discos de muselina.

2.1.2 Verificación de Equipos. Se realizó una lista de todos los equipos que se emplearon en la estandarización de los diferentes métodos y se ratificó que tuvieran un plan de mantenimiento preventivo, verificación y calibración. Las entidades de índole externo que estuvieron involucradas en este proceso fueron empresa Andia LTDA (espectrofotómetro SPECTRONIC modelo 601 y marca Milton Roy), empresa CM y Cia LTDA (Equipo de extracción Soxhlet B-811 marca Buchi) y la división de mantenimiento tecnológico de la Universidad Industrial de Santander (UIS) (balanza analítica 770-14 marca Kern, un baño ultrasónico LC-

30H marca Ultrasonic, una bomba de vacío, una estufa 3510 L-C-OVEN marca Lab-Line y una plancha de calentamiento PCV/A-1 marca E&Q).

2.1.3 Material de vidrio volumétrico. En el manejo del material volumétrico (matraces, pipetas, probetas, vasos de precipitado, entre otros) se tuvieron en cuenta: especificaciones, limpieza y calibración. El lavado del material de vidrio u otros se realizó siguiendo los procedimientos descritos en el **Anexo 1**. La verificación de calibración del Material volumétrico aforado clase A tipo IN y EX, se realizó de manera interna en el laboratorio. Este proceso se llevo a cabo bajo condiciones ambientales controladas y por medio del procedimiento establecido en el **Anexo 2**.

2.1.4 Reactivos. Para la determinación de nitratos en aguas naturales por el método del salicilato sódico, se emplearon: solución stock de KNO_3 de 1000 mg/L, salicilato de sodio, tartrato de sodio y potasio anhidro, hidróxido de sodio, ácido sulfúrico y soluciones de referencia de pH certificadas de pH 4.00, 7.00 y 10.00. Para la determinación de nitritos en aguas naturales por el método colorimétrico, se emplearon: solución stock de NaNO_2 de 1000 mg/L, sulfanilamida, N-(1-naftil)-etilendiamina de diclorhidrato, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio y soluciones de referencia de pH certificadas de pH 4.00, 7.00 y 10.00. Para la determinación de en aguas residuales industriales por el método de la 4-AATP; se emplearon: solución stock de fenol de 1000 mg/L, fosfato monoácido de potasio, fosfato diácido de potasio, 4-aminoantipirina, ferricianuro de potasio, hidróxido de amonio, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico 85%, hidróxido de sodio y soluciones de referencia de pH certificadas de pH 4.00, 7.00 y 10.00. Para la determinación de aceites y grasas en aguas por el método soxhlet-gravimétrico, se emplearon: ácido esteárico, tierras de diatomácea, n-Hexano y soluciones de referencia de pH certificadas de pH 4.00, 7.00 y 10.00. Todos los reactivos grado analítico.

2.1.5 Soluciones preparadas en el laboratorio. Para llevar a cabo el presente proyecto se requirió la preparación de soluciones en conformidad a procedimientos establecidos en la literatura, ver **Anexo 3** [13-14].

2.1.6 Manejo y disponibilidad de residuos. Debido a que en el presente proyecto se manejó una cantidad importante de productos y se efectuaron diversos procesos que conllevaron a la generación de residuos, en algunos casos peligrosos para la salud humana y el medio ambiente. Fue necesario establecer unas condiciones adecuadas de trabajo que incluyeron el control, el tratamiento y la eliminación de los residuos generados de acuerdo con el plan de gestión integral de residuos de la UIS.

2.2 MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El muestreo se realizó siguiendo los lineamientos establecidos por el IDEAM, se tomaron muestras puntuales. Las muestras para nitratos y nitritos se colectaron y preservaron en frascos de polietileno a 4°C y, las de fenol en frascos de vidrio y se acidularon a pH 2,0 con H₂SO₄. Una vez colectadas y preservadas las muestras se almacenaron a 4°C ± 2°C hasta los respectivos análisis. Los análisis para nitratos y nitritos se llevaron a cabo dentro de las 24 horas después de la recolección de las muestras y para compuestos fenólicos al cabo de una semana de obtenidas [199-200]. El volumen de muestra en todos los casos fue de 2 litros.

2.3 PRE-TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

- Las muestras de aguas naturales recolectadas y preservadas para la determinación de los nitratos y nitritos, deben estar libres de color y turbiedad. Para lo cual se filtraron al vacío a través de membranas de 0,45 μm de poro [13-14].

- Para el caso de los compuestos fenólicos, a los blancos de reactivos, estándares y muestras de aguas residuales industriales, recolectadas y preservadas, se les aplicó como pre-tratamiento un procedimiento de destilación (Método espectrofotométrico directo SM 5530 B) con el fin de eliminar impurezas no volátiles.

Es así como se tomó 500 mL de la muestra a analizar y se ajustó el pH por adición de hidróxido de sodio 2,5N, para obtener un pH \sim 4. Se destilaron aproximadamente 450 mL y se detuvo el proceso de destilación hasta que se observó que la ebullición cesó, inmediatamente se añadieron 50 mL de agua caliente al balón de destilación y se continuó el proceso de destilación hasta obtener un volumen aproximado a 500 mL [13].

2.4 VERIFICACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS PARA LOS DIFERENTES PROCESOS DE ESTANDARIZACIÓN

Los procedimientos de los métodos a estandarizar para nitratos (Salicilato-Rodier 1989), nitritos (Espectrofotométrico, SM 4500- NO_2^-), fenoles (Espectrofotométrico directo, SM 5530 B y D) y, aceites y grasas (Extracción Soxhlet, SM 5520 D) fueron revisados y verificados. Los métodos relacionados anteriormente tienen como referencia Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA-AWWA-WPCF, 20th edition 1999 [13], excepto la determinación de nitratos, fue realizada por el método contemplado en Rodier de 1989 [14] Todas las muestras (ya sea un blanco de reactivo, un estándar, una muestra adicionada o

una muestra real propiamente dicha se analizaron a partir de los siguientes procedimientos establecidos por la literatura.

2.4.1 Determinación de nitratos por el método del salicilato sódico. Se introdujeron sucesivamente 10 mL de muestra y 1 mL de salicilato sódico al 5% en un vaso de precipitado de 50 mL. Se evaporó a baño maría hasta sequedad total (temperatura ~75-80 °C) y se dejó enfriar. Se procedió a tratar el residuo con 2 mL de ácido sulfúrico y se dejó en reposo 10 minutos. Se añadió 15 mL de agua destilada y 15 mL de solución de hidróxido de sodio y tartrato doble de sodio y potasio. Seguidamente se leyó la absorbancia de las muestras a 415 nm en el espectrofotómetro, usando como blanco una mezcla de los reactivos y agua destilada.

Nota: Después de la adición de cada reactivo se debe mezclar para que haya homogenización.

2.4.2 Determinación de nitritos por el método espectrofotométrico, SM 4500-NO₂-. Se vertió un volumen de 50 mL de muestra en matraces aforados del mismo volumen, posteriormente se adicionó 2 mL del reactivo de combinación y se agitó. Se efectuaron las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 543 nm, entre 10 minutos y 2 horas después de la adición del reactivo de combinación a las muestras. Se usó como blanco una mezcla de agua destilada y reactivo de combinación.

2.4.3 Determinación de compuestos fenólicos por el método espectrofotométrico directo, SM 5530 D. Se tomó 100 mL del destilado en un vaso de precipitado de 100 mL y se agregó 2,5 mL de solución de amoníaco 0,5 N. Se agitó e inmediatamente se ajustó el pH a $7,9 \pm 0,1$ con solución tampón de fosfato. Una vez el pH ajustado se añadió 1 mL de la solución de 4-aminoantipiridina, se mezcló e inmediatamente se adicionó 1 de la solución de ferricianuro de potasio y se volvió a agitar. Después de 15 min se transfirió un pequeño volumen a la celda y se efectuaron las lecturas a una longitud de onda de

510 nm en el espectrofotómetro. Se uso como blanco una mezcla de los reactivos y agua destilada.

Nota: Después de la adición de cada reactivo se debe mezclar para que haya homogenización.

2.4.4 Determinación de aceites y grasas por el método extracción soxhlet, SM 5520 D. Se marcó el nivel de la muestra en el frasco para la determinación posterior del volumen de la muestra y se verificó que el pH de la muestra fuera menor a 2. Por otra parte, se introdujeron en la estufa los vasos de extracción a una temperatura de 105 °C por una hora, se enfriaron en un desecador durante otra hora y se pesaron. Luego se realizó el montaje del sistema de filtración al vacío para lo cual se preparó el lecho filtrante con un disco de muselina sobreponiéndole el papel filtro. El anterior se colocó en el embudo Buchner e inmediatamente se humedeció con agua destilada y luego con ayuda del vacío se paso aproximadamente 100 mL de la suspensión de tierras de diatomáceas. Seguidamente se lavó con un 1 L de agua destilada y se volvió a aplicar el vacío hasta que todo el líquido se filtro.

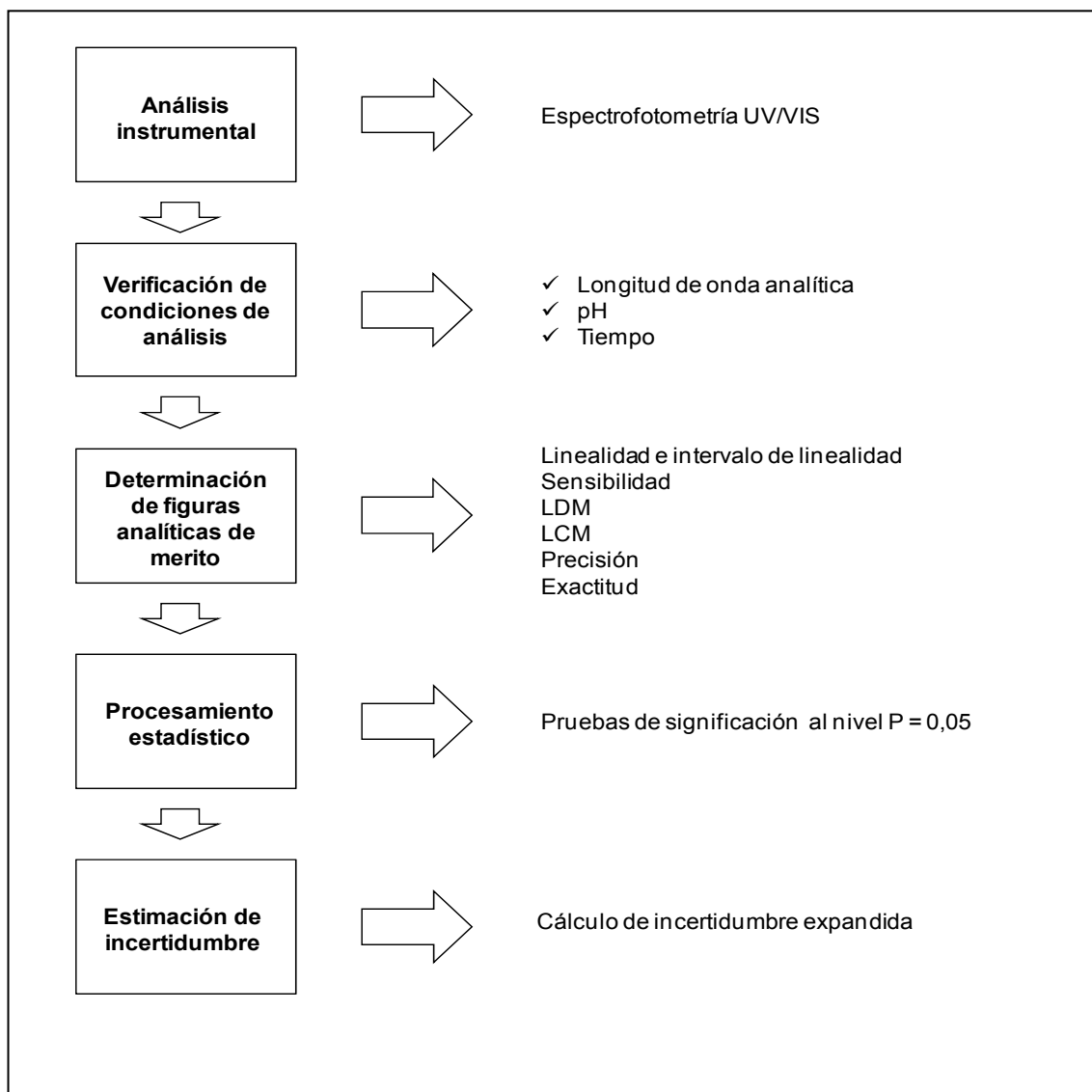
Se transfirió el volumen total de la muestra acidificada a través del embudo Buchner y se filtro. Con ayuda de una pinza se transfirió el lecho filtrante a un cartucho de extracción previamente limpio y seco. Posteriormente se limpiaron las caras y el fondo del recipiente colector, la tapa, y el embudo Buchner con pedazos de papel filtro remojado en hexano. Igualmente se agregaron los pedazos de papel filtro dentro del cartucho de extracción y se secó en una estufa durante 30 min a 103°C. Seguidamente se colocó el cartucho en el equipo de extracción Soxhlet y se adicionó un volumen de 100 ml de hexano en el vaso de extracción. Inmediatamente se adecuaron las condiciones del equipo con el fin de alcanzar un reflujo de 20 ciclos por hora durante un periodo de 4 horas a partir del primer sifón que realizó el equipo. Una vez terminado el proceso de extracción de aceites y grasas los vasos se retiraron y se llevaron a la estufa a 103 °C con el fin de

eliminar el solvente residual. Por último se colocaron en un desecador durante una hora y se volvió a pesar para determinar el peso final.

2.5 DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS PARA LA CUANTIFICACION DE NO₃⁻, NO₂⁻ EN AGUAS NATURALES Y CF EN AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES

En la **Figura 8** se muestra la metodología que se empleó en el estudio de los métodos espectrofotométricos del presente trabajo. Todas las muestras (ya sea un blanco, un estándar, una muestra adicionada o una muestra real propiamente dicha) se prepararon a partir de la solución stock correspondiente, mediante la dilución adecuada y a una temperatura de 20 °C. Posteriormente se analizaron a partir del procedimiento respectivo y establecido en las **Secciones 2.4.1, 2.4.2 y 2.4.3**, cada muestra se preparó y analizó por triplicado.

Figura 8. Diagrama general de la metodología empleada en el desarrollo y validación de los métodos espectrofotométricos.



2.5.1 Análisis instrumental

El desarrollo de los métodos para la determinación de nitratos y nitritos en aguas naturales, y de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales, se llevó a cabo por espectrofotometría UV/VIS. Para lo cual se empleó un espectrofotómetro

de absorción molecular UV/VIS Spectronic de un haz de luz marca Milton Roy modelo 601, con un rango de longitud de onda de trabajo comprendido entre 195 y 999 nm.

Figura 9. Espectrofotómetro UV/VIS de un haz de luz marca Milton Roy modelo 601.



2.5.2 Verificación de las condiciones de análisis establecidas en la literatura

Se hizo necesario verificar las variables que tienen efecto sobre la formación de los complejos p-nitrosalicilato de sodio, bencenosulfonamida y 1, 2- dihidro- 1, 5- dimetil- 4- [(4-oxo- 2,5- ciclohexadien- 1- iliden) amino]- 2- fenil. Para lo cual se determinó experimentalmente la longitud de onda a la cual los complejos proporcionaron la máxima absorción (longitud de onda analítica), se estudió la estabilidad de los complejos con respecto al tiempo y la influencia del pH de la muestra sobre la formación de los complejos.

2.5.2.1 Medidas espectrofotométricas. Para establecer la selectividad de la longitud de onda a la que se determina el contenido de analito presente en forma de complejo. Se prepararon y analizaron por separado soluciones estándar de

concentraciones de 5 mg NO_3^-/L , 0,5 mg NO_2^-/L y 0,5 mg/L de fenol, posteriormente a cada uno de estos se les realizó un barrido espectral en el rango de longitud de onda comprendido entre 350 y 600 nm. Por último se construyeron los espectros de absorción para cada complejo, de esta manera todos los blancos de reactivos, estándares, muestras adicionadas y muestras reales empleadas en los estudios se determinaron a la longitud de onda analítica respectiva.

2.5.2.2 Estabilidad del complejo en disolución e influencia del pH. Se prepararon por separado estándares de concentraciones de 5 mg NO_3^-/L , 0,5 mg NO_2^-/L y 0,5 mg/L de fenol. Inmediatamente se procedió a ajustar el pH de cada solución estándar a valores comprendidos en un cierto intervalo dado por la literatura (7-9 pH para NO_3^- , 5-9 pH para NO_2^- y 3-5 pH para fenoles) con soluciones diluidas de ácido sulfúrico y/o hidróxido de sodio, según sea el caso, excepto para NO_2^- que se utilizó ácido clorhídrico. Registrándose las señales en diferentes intervalos de tiempo a la λ determinada con anterioridad y eligiéndose el valor o zona de pH óptima de ser medida.

2.5.3 Determinación de las figuras analíticas de merito

La demostración objetiva del cumplimiento de los requisitos exigidos para el desarrollo de cada uno de los métodos, se realizó mediante la determinación estadística de figuras analíticas de merito, tales como: Intervalo de respuesta lineal, linealidad, sensibilidad, LDM, LCM, precisión (expresada como repetibilidad y precisión intermedia) y exactitud (reportada como porcentaje de recuperación y error relativo) [7, 55, 201-209].

2.5.3.1 Intervalo de respuesta lineal, de la linealidad y de la sensibilidad de los métodos espectrofotométricos. Inicialmente se prepararon y analizaron una

serie de estándares de valores de concentraciones igualmente espaciados, en un rango de concentración establecido para cada método. De esta manera se trabajó para la determinación de nitratos concentraciones de 1 a 10 mg NO₃/L, para nitritos concentraciones de 0,1 a 0,9 mg NO₂⁻/L y para compuestos fenólicos concentraciones de a 0,2 a 1 mg/L. Cada punto de la curva patrón se preparó, analizó y leyó por triplicado a la longitud de onda de máxima absorción del complejo formado. Finalmente, se realizaron cinco réplicas de curvas de calibración y con los datos obtenidos se construyó la curva de calibración promedio, esto se hizo para cada uno de los métodos bajo estudio. El intervalo de respuesta lineal, la linealidad y la sensibilidad de los métodos se evaluaron de acuerdo con los procedimientos mostrados en el **Anexo 4**.

2.5.3.2 Determinación de los límites de detección y cuantificación de los métodos espectrofotométricos. Para la estimación de los LDM y LCM de los métodos espectrofotométricos bajo estudio se prepararon y analizaron una serie de blancos de reactivos (n=30), frente a una de las replicas que se utilizó como referencia. También se prepararon las curvas de calibración promedio considerando bajas concentraciones de cada uno de los analitos de interés. Para lo cual se trabajó por separado con una serie de patrones de concentraciones igualmente espaciados en los rangos de concentraciones comprendidos entre 0,05-0,5 mg/L para nitratos, 0,01-0,09 para nitritos y 0,5-1 mg/L para compuestos fenólicos. Este análisis se efectuó tres veces por punto para cada método evaluado a la λ de máxima absorción del correspondiente complejo formado. Las curvas de calibración promedio a bajas concentraciones obtenidas para cada método, se sometieron a las pruebas de linealidad y proporcionalidad (**Anexo 4**) y la evaluación de los LDM y LCM se realizó con base en lo descrito en el **Anexo 5**.

2.5.3.3 Precisión. La determinación de la precisión incluye la precisión del sistema instrumental y del método. Estas a su vez incluyen la repetibilidad y precisión intermedia, La evaluación de la precisión se realizó de acuerdo con lo establecido en el **Anexo 6**.

2.5.3.3.1 Precisión del sistema instrumental. En la evaluación de la repetibilidad y precisión intermedia del sistema instrumental, se prepararon y analizaron para cada analito una serie de patrones de concentraciones consideradas altas (8 mg NO_3^-/L , 0,8 mg NO_2^-/L y 0,8 mg $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-/\text{L}$), medias (5 mg NO_3^-/L , 0,5 mg NO_2^-/L y 0,6 mg $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-/\text{L}$) y bajas (2 mg NO_3^-/L , 0,2 mg NO_2^-/L y 0,4 mg $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-/\text{L}$) las cuales estuvieron dentro de los rangos de linealidad de los métodos desarrollados experimentalmente. El análisis se efectuó 30 veces para cada solución estándar por un mismo analista y las lecturas fueron tomadas del mismo equipo. El estudio de la repetibilidad se realizó bajo las mismas condiciones de ensayo y el mismo día. Respecto a la precisión intermedia, el análisis se efectuó en condiciones diferentes durante 30 días consecutivos.

2.5.3.3.2 Precisión de los métodos espectrofotométricos. Para determinar la repetibilidad y la precisión intermedia de los métodos espectrofotométricos objetos de la estandarización, se prepararon y analizaron por separado 30 muestras de aguas naturales por los métodos de nitratos y nitritos, y 30 muestras de aguas residuales industriales por el método de fenoles. Se determinó el contenido promedio del analito e inmediatamente se procedió a enriquecer las muestras, por triplicado, con el analito de interés (nitratos, nitritos y compuestos fenólicos) a diversas concentraciones. Para preparar las soluciones en este caso se mantuvo constante la cantidad de muestra y se agregaron cantidades variables de la solución estándar, alcanzándose para cada método los tres niveles de concentraciones analizados en la **Sección 2.5.3.3.1**. El estudio se llevo a cabo por

un mismo analista y las señales de absorbancia registradas en un mismo equipo, la repetibilidad se hizo en un mismo día, mientras la precisión intermedia se realizó en condiciones diferentes durante 30 días consecutivos.

2.5.3.3.3 Gráficos de control de los métodos espectrofotométricos. Con el objetivo de realizar un control interno de los métodos espectrofotométricos estudiados, se procedió a la construcción de gráficos de control. Para lo cual se emplearon los datos obtenidos para cada uno de los métodos en la precisión intermedia al nivel de concentración medio. De esta manera se trabajó con estándares y muestras reales adicionadas de concentraciones de 5 mg NO_3^-/L , 0,5 mg NO_2^-/L y 0,6 mg $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-/\text{L}$.

2.5.3.4 Exactitud de los métodos espectrofotométricos. La exactitud describe el grado de dispersión del valor obtenido respecto del valor nominal o conocido bajo las condiciones establecidas de análisis. Este parámetro se evaluó a partir del método de recuperación y se realizó implícitamente en la **Sección 2.5.3.3.2** para cada uno de los métodos espectrofotométricos bajo estudio. De esta manera una vez obtenidos los datos se evaluaron de acuerdo con el **Anexo 7**.

2.5.4 Evaluación del desempeño inter-laboratorios. Los programas de intercalibración están diseñados para determinar el grado de comparabilidad de los datos generados por los laboratorios participantes y contribuir a la estandarización de técnicas analíticas. De esta manera la evaluación del desempeño del laboratorio CEIAM en la determinación de nitratos, nitritos y compuestos fenólicos se efectuó a partir del análisis por duplicado de dos materiales de referencias certificados (MCR), suministrados por el IDEAM para cada uno de los métodos anteriormente mencionados y se expresó como el parámetro “Z”. Los ensayos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de trabajo empleadas en el desarrollo de los procesos de estandarización y durante

las pruebas de intercalibración presentadas ante el IDEAM en diciembre de 2009. Una vez obtenidos los resultados experimentales para cada analito, se procedió al cálculo e interpretación de la puntuación Z definido de la siguiente manera [210]:

$$Z = \frac{C_p - C_v}{s_L}$$

Donde:

C_p = Concentración experimental promedio de analito (reportada);

C_v = Concentración de analito suministrada por el IDEAM (referencia);

s_L = Desviación estándar (estimador de la reproducibilidad o variancia entre laboratorios).

Es claro que a menor valor de Z mejor resultará el desempeño del laboratorio, la interpretación de la puntuación Z, es la siguiente:

Satisfactorio $|Z| \leq 2$

Cuestionable $2 < |Z| < 3$

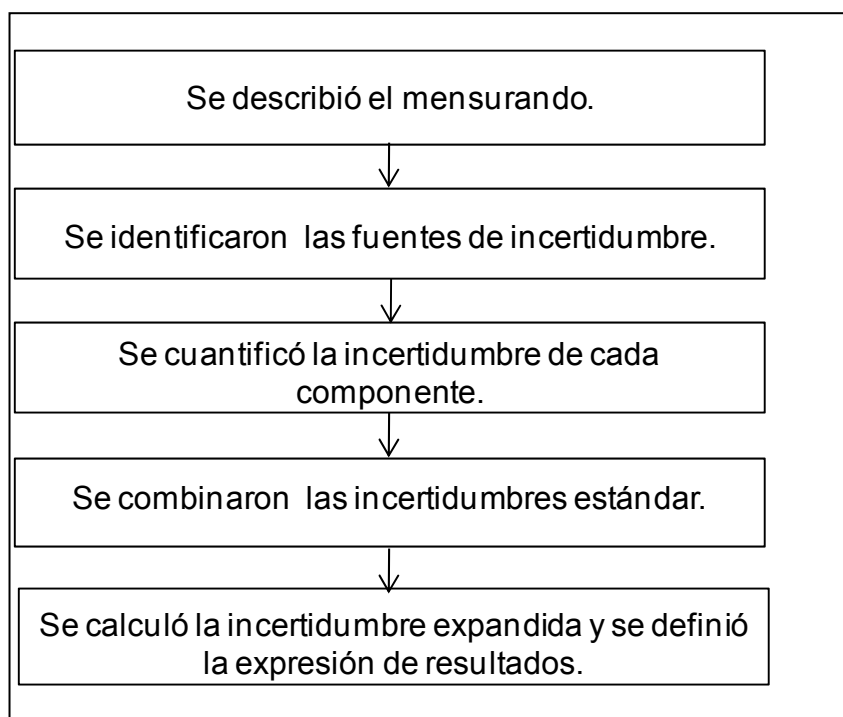
No satisfactorio $|Z| \geq 3$

2.5.5 Estimación de la incertidumbre en los métodos espectrofotométricos

La estimación de la incertidumbre de las mediciones analíticas es un requisito de la norma ISO/NTC 17025 ya que es indispensable en la expresión de un resultado analítico. A continuación se describe la metodología (**Figura 10**) que se uso para calcular la incertidumbre en la determinación de nitratos, nitritos en muestras de

aguas naturales y de compuestos fenólicos en muestras de aguas residuales industriales [211-213]. Ver **Anexo 8**.

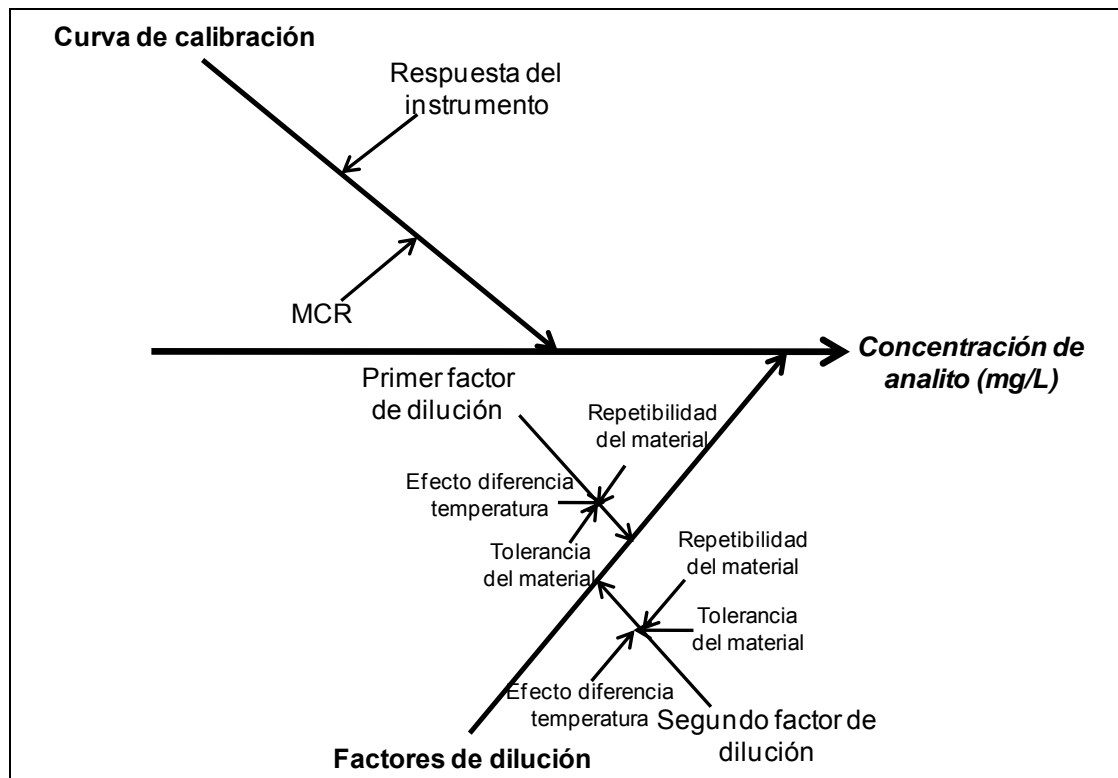
Figura 10. Metodología para calcular la incertidumbre de la determinación de nitratos, nitritos y compuestos fenólicos.



2.5.5.1 Descripción del mensurando. En esta etapa se estableció la relación existente entre los resultados analíticos obtenidos en cada uno los métodos espectrofotométricos y los parámetros de los que dependen. Los cálculos involucrados en la medición de la concentración de nitratos y nitritos en aguas naturales y de compuestos fenólicos en aguas residuales se establecen en el **Anexo 8**.

2.5.5.2 Identificación y cuantificación de las fuentes de incertidumbre. Las fuentes de incertidumbre que están presentes en cada uno de los métodos espectrofotométricos desarrollados y que tienen alguna importancia en la incertidumbre final de los resultados, se describen de manera general en la **Figura 11**.

Figura 11. Diagrama causa-efecto para la medición de nitratos, nitritos y compuestos fenólicos, empleando espectrofotometría UV/VIS.



Posteriormente, se cuantificaron las incertidumbres que provienen de cada una de las fuentes identificadas y se expresaron como desviaciones estándar. Se aplicaron dos tipos de evaluación: tipo A y tipo B, las cuales fueron estimadas a

partir de una serie de observaciones repetidas y de datos de otras fuentes, respectivamente.

De esta manera en cada uno de los métodos espectrofotométricos desarrollados se emplearon los resultados obtenidos de: las curvas de calibración, los factores de dilución (primer y segundo factor de dilución) y del proceso de calibración del material volumétrico clase A. También se usó la información contenida en los certificados suministrados por los proveedores, tales como: calibración de la balanza, calibración del material volumétrico y MCR.

2.5.5.3 Cálculo de la incertidumbre combinada. Una vez calculadas las incertidumbres estándar, se determinó la incertidumbre combinada (esto se realizó de manera independiente para cada método espectrofotométrico), de acuerdo a la ley de propagación de la incertidumbre descrita a continuación, obteniéndose la incertidumbre total estándar $u(c)$. La cual caracterizó la dispersión de los valores que son razonablemente atribuidos al mensurando (γ).

$$u(c) = \sqrt{u_{\text{calibración}}^2 + u_{\text{dil. estándares}}^2}$$

Donde:

$u_{\text{calibración}}^2$ = Incertidumbre asociada a la curva de calibración;

$u_{\text{dil. estándares}}^2$ = Incertidumbre asociada a la repetibilidad del método.

2.5.5.4 Cálculo de la incertidumbre expandida y expresión del resultado de la incertidumbre. El cálculo de la incertidumbre expandida (U) proporcionó un intervalo de confianza donde se encontró el valor considerado como verdadero con una determinada probabilidad y se obtuvo a partir de la siguiente expresión:

$$U(c) = k \cdot u(c)$$



Donde:

k = Factor de cobertura (generalmente igual a 2);

u(c) = Incertidumbre estándar

La expresión del resultado de la medición y de su incertidumbre para cada uno de los métodos espectrofotométricos desarrollados, se dio a partir de la incertidumbre expandida expresada con dos cifras significativas.

2.6 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN-SOXHLET PARA LA CUANTIFICACION DE ACEITES Y GRASAS EN AGUAS

La metodología en general usada en el estudio de aceites y grasas en aguas, fue similar a la desarrollada en los métodos espectrofotométricos, aunque con algunas variantes ya que se trata de una técnica de extracción/gravimetría. La preparación de los blancos de reactivos se realizó a partir de la acidificación de 1 L de agua destilada con HCl a pH<2 (~2 mL). Mientras cada uno de los estándares trabajados durante este estudio, se prepararon a partir del peso correspondiente de ácido esteárico disuelto en alcohol isopropílico con posterior acidificación (HCl a pH<2) y dilución a 1 L con agua destilada. Las muestras (blancos de reactivos y estándares) se prepararon y analizaron por triplicado, la determinación del

contenido aceites y grasas recuperables se efectuó a través de la siguiente expresión:

$$A y G = \frac{(P_f - P_i)}{V} \times 10^6 \left[\frac{mg}{L} \right]$$

Donde:

P_f = Peso final del vaso de extracción (g);

P_i = Peso inicial del vaso de extracción (g);

V = Volumen de la muestra (mL).

2.6.1 Análisis instrumental

El desarrollo del método para la determinación de aceites y grasas en aguas se llevó a cabo por extracción Soxhlet. Para lo cual se empleó un sistema de extracción B-811 marca Buchi, a través de los pasos de extracción, aclarado y secado. La velocidad y el tiempo de extracción en el aparato Soxhlet, fueron exactamente los especificados en la literatura debido a la solubilidad variable de las diferentes grasas.

Figura 12. Sistema de extracción B-811 marca Buchi.



2.6.2 Determinación de las figuras analíticas de merito

El proceso de validación del método de extracción-Soxhlet se efectuó a partir de la evaluación de las siguientes figuras analíticas de merito: intervalo y rango máximo de trabajo, límites de detección y cuantificación instrumental, límite de cuantificación del método, precisión intermedia y exactitud (reportada como error relativo) [62-63, 214-217].

2.6.2.1 Intervalo y rango máximo de trabajo. La evaluación del intervalo de trabajo del método contempló la preparación y análisis por triplicado de cinco estándares de ácido esteárico, en un rango comprendido entre 100-500 mg/L. La determinación del rango máximo de trabajo se efectuó a partir de la preparación y análisis de estándares de concentraciones de 750, 1000, 1500 y 2000 mg/L, teniendo en cuenta los porcentajes de recuperación promedio y la facilidad de manipulación del extracto en el lecho filtrante.

2.6.2.2 Límites de detección y cuantificación instrumental. La determinación de los límites de detección instrumental (LDI) y cuantificación instrumental (LCI) para aceites y grasas, surge de la necesidad de diferenciar la señal más pequeña de analito medido por el equipo de extracción soxhlet, del ruido de fondo generado por el mismo. De esta manera se prepararon y analizaron 21 blancos de reactivos, finalmente se calcularon los LDI y LCI a través del uso de las siguientes ecuaciones:

$$\text{LDI} = 1.645 S_B \quad \text{LCI} = 3.3 \text{ LDI}$$

Donde:

S_B = Desviación estándar de los blancos de reactivos;

2.6.2.3 Límite de cuantificación del método. La determinación del LCM comprendió la preparación y análisis de estándares de concentraciones mayores a los LDI y LCI hallados anteriormente. Las soluciones de trabajo fueron 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L y se tomó como criterio para su elección la menor concentración que se cuantificó con alta precisión y exactitud.

2.6.2.4 Precisión intermedia del método. Su estudio contempló el análisis de la precisión intermedia de estándares de concentraciones a nivel alto (450 mg/L), medio (300 mg/L) y bajo (150 mg/L) comprendidos en el intervalo de trabajo del método (hallado en la **Sección 2.6.2.1**). Las determinaciones fueron realizadas por el mismo analista e instrumento durante 21 días consecutivos, para cada estándar y a su vez cada uno por triplicado. Su cálculo involucró los coeficientes de variación en estos 3 niveles de concentración.

2.6.2.4.1 Gráfico de control del método. Para verificar que el método para determinar aceites y grasas en aguas cumple con los requisitos establecidos, se procedió a la construcción de un gráfico de control. Empleándose los datos obtenidos en la precisión intermedia del método para la concentración de 300 mg/L.

2.6.2.5 Exactitud del método. La determinación de la exactitud del método de cuantificación de aceites y grasas en aguas, se efectuó a partir del análisis por duplicado de dos MCR proporcionados por el IDEAM, durante las pruebas de intercalibración presentadas ante dicho organismo en diciembre de 2009. El estudio se realizó de acuerdo al procedimiento establecido en la **Sección 2.4.4** y bajo las condiciones experimentales de la estandarización del método. Posteriormente, se calculó el error relativo del método a partir de la siguiente ecuación, utilizándose los valores obtenidos en la experiencia y el valor de referencia certificado (considerado como el “correcto”), de esta manera se proporcionó un índice acerca la exactitud del método.

$$ER (\%) = \frac{C_p - C_v}{C_v} \times 100\%$$

Donde:

C_p = Concentración experimental promedio de aceites y grasas;

C_v = Concentración de aceites y grasas suministrada por el IDEAM.

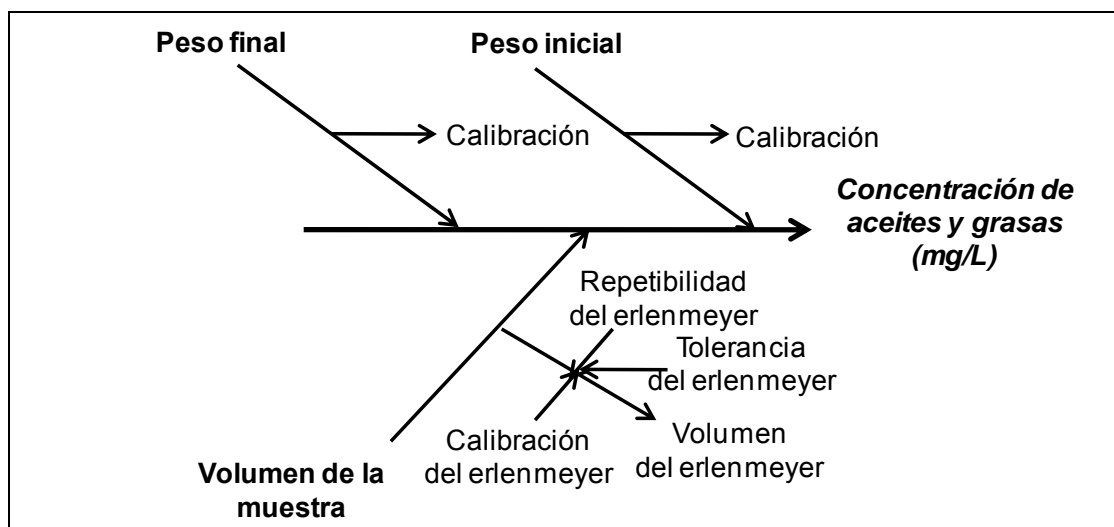
2.6.3 Estimación de la incertidumbre en el método extracción-soxhlet

Teniendo en cuenta que las mediciones analíticas tienen una incertidumbre asociada que debe estimarse para proporcionarle al resultado de la medición un carácter de alta confiabilidad. La estimación de la incertidumbre del método para determinar aceites y grasas en aguas se realizó de manera similar a la desarrollada en los métodos espectrofotométricos e implicó trabajar con un método bien definido en donde se expresó el modelo del mesurando, se identificaron y cuantificaron todas las posibles fuentes de incertidumbres, se combinaron las incertidumbres estándares, se calculó la incertidumbre expandida y se reportaron los resultados de las mediciones y de su incertidumbre con el número de cifras significativas correcto [15, 218].

2.6.3.1 Descripción del mesurando. El modelo matemático del método para determinar aceites y grasas en aguas se da partir de la expresión dada en la **Sección 2.6**.

2.6.3.2 Identificación y cuantificación de fuentes de incertidumbre. Las principales fuentes de incertidumbre en la determinación de aceites y grasas en aguas por extracción-Soxhlet, se observan en la **Figura 13**.

Figura 13. Diagrama causa-efecto para la medición de aceites y grasas, empleando extracción Soxhlet.



Seguidamente, se cuantificaron las componentes de la incertidumbre asociadas con cada fuente potencial de incertidumbre identificada y expresaron como desviaciones estándar. Se aplicaron dos tipos de evaluación: tipo A y tipo B, las cuales fueron estimadas a partir de una serie de observaciones repetidas y de datos de otras fuentes, respectivamente.

Para lo cual se utilizaron los datos obtenidos en el análisis de la calibración del material volumétrico clase A usado en el desarrollo del método y en los certificados: de calibración de la balanza y de calibración del material volumétrico empleado (erlenmeyeres).

2.6.3.3 Combinación de las incertidumbres estándares. Una vez identificadas y expresadas como incertidumbres estándar todas las fuentes de incertidumbre, se

combinaron adecuadamente a través de la ley de la propagación de la incertidumbre mediante la siguiente expresión:

$$u(c) = \sqrt{u_{D.masa}^2 + u_{V.muestra}^2}$$

Donde:

$u_{m.vasoextraccion}^2$ = Incertidumbre asociada a la diferencia de masa;

$u_{V.muestra}^2$ = Incertidumbre asociada al volumen de la muestra.

2.6.3.4 Cálculo de la incertidumbre expandida y expresión del resultado de la incertidumbre. El último paso fue calcular la incertidumbre expandida (U), que se obtuvo multiplicando la incertidumbre combinada final (u) por un factor de cobertura (k), a partir de la ecuación descrita en la **Sección 2.5.5.4**, de modo que el resultado se encontró dentro del intervalo establecido con una probabilidad del 95%. Finalmente se reportaron los resultados con el correcto número de cifras significativas.

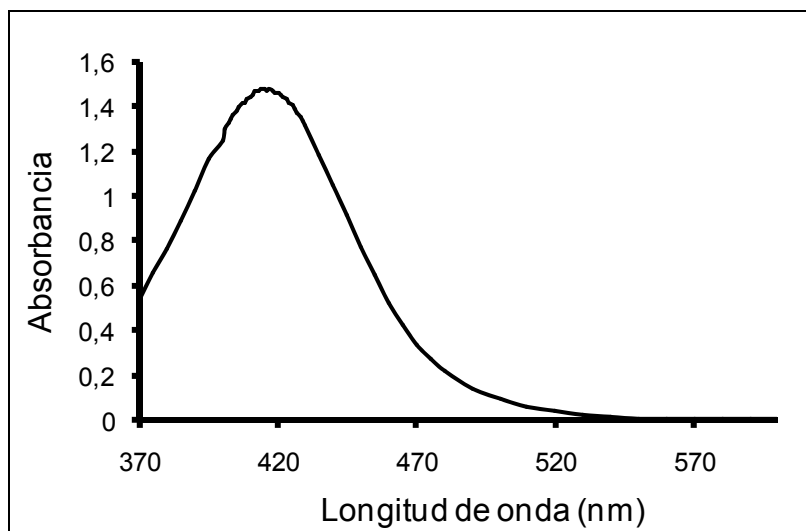
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE NITRATOS EN AGUAS NATURALES

3.1 VERIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS ESTABLECIDAS EN LA LITERATURA

Previo a la determinación de las figuras analíticas de merito y a la estimación de la incertidumbre del método de cuantificación de nitratos en muestras de aguas naturales, se verificaron las condiciones de análisis establecidas en la literatura para la puesta a punto del método. De esta manera las variables estudiadas fueron: Longitud de onda analítica, estabilidad de la señal con respecto al tiempo y efecto del pH de la muestra.

El método de determinación de nitratos en aguas naturales se realizó en la longitud de onda de máxima absorción del p-nitrosalicilato de sodio. El espectro de absorción del ion nitrato (**Figura 14**) exhibe un máximo de absorción a 415 nm, valor que coincidió con el reportado por la literatura.

Figura 14. Espectro de absorción del ion NO_3^- en la región UV/VIS.



48

Los resultados obtenidos sobre la influencia del tiempo de lectura sobre la estabilidad del p-nitrosalicilato de sodio 5 mg NO_3^-/L en disoluciones a diferentes pHs, se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Verificación de las condiciones de análisis para la determinación de nitratos en aguas naturales.

Tiempo (min)	Absorbancia		
	pH 7	pH 8	pH 9
0	1,402	1,439	1,420
5	1,413	1,446	1,432
10	1,419	1,455	1,443
15	1,424	1,462	1,449
20	1,424	1,462	1,448
25	1,423	1,461	1,448
30	1,423	1,462	1,449
35	1,425	1,462	1,449
40	1,424	1,461	1,447
45	1,426	1,462	1,448
50	1,424	1,462	1,449
55	1,423	1,462	1,449

60	1,424	1,462	1,449
65	1,423	1,459	1,444
70	1,422	1,457	1,447
75	1,420	1,448	1,448
80	1,425	1,457	1,445
85	1,423	1,459	1,446
90	1,423	1,457	1,442

Se determinó que el intervalo de tiempo óptimo para medir espectrofotométricamente el contenido de nitratos en muestras de aguas naturales, está comprendido entre 15 y 60 minutos. En este período de tiempo las señales de absorbancia permanecen prácticamente constantes, este comportamiento se observó para los tres valores de pHs analizados.

El pH 8 proporcionó los valores de concentración más cercanos al valor real, por lo que se considera como el valor óptimo de ser medido por el método de determinación de nitratos en aguas residuales naturales.

3.2 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MERITO

Una vez fueron verificadas las condiciones de análisis establecidas en la literatura, se procedió a la determinación de las figuras analíticas de merito del método tal como se describen en los **Anexos 4-7**.

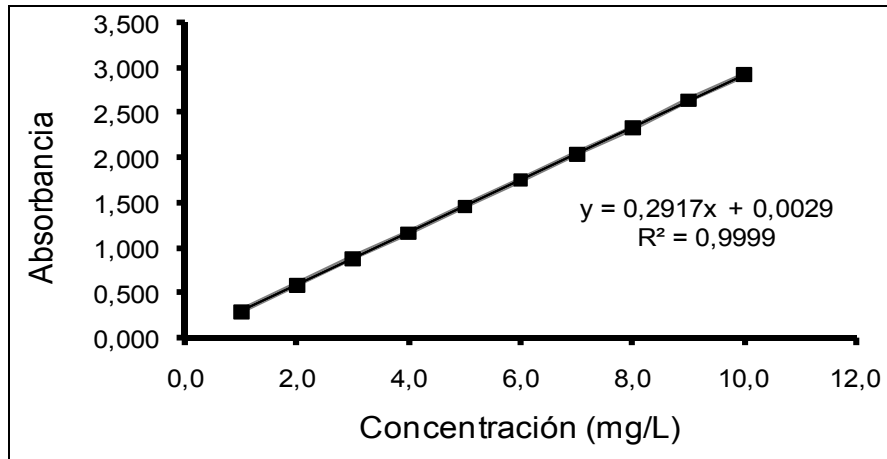
3.2.1 Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método. Se observó que el método obedeció la ley de Beer en el intervalo de concentraciones comprendido entre 1 a 10 mg NO₃/L, (**Anexo 9**). Con el promedio de las absorbancias obtenidas y a través de un análisis de regresión por mínimos cuadrados, se construyó la curva de calibración del método (**Figura 15**). Se obtuvieron valores considerablemente bajos de las desviaciones estándar ($3,29 \times 10^{-3}$ a $9,27 \times 10^{-3}$), de los coeficientes de variación (0,13% a 1,68%) y de los

factores de respuesta (0,2917 a 0,2940) para cada nivel de concentración (**Tabla 9**). La curva de calibración $y=0,2917x+0,0029$ resultó ser lineal en el rango de concentraciones mencionado anteriormente, por lo que se puede inferir que existe una relación directa entre la concentración y la absorbancia.

Tabla 9. Evaluación del intervalo de respuesta lineal del método.

Concentración (mg/L)	Absorbancia Promedio	Desviación Estándar (10^{-3})	Coefficiente variación(%)	Factores repuesta (y/x)
1,0	0,294	4,93	1,68	0,2940
2,0	0,588	3,29	0,56	0,2940
3,0	0,881	6,26	0,71	0,2937
4,0	1,168	6,06	0,52	0,2920
5,0	1,460	7,35	0,50	0,2920
6,0	1,752	6,76	0,39	0,2920
7,0	2,042	4,32	0,21	0,2917
8,0	2,336	4,32	0,19	0,2920
9,0	2,634	9,27	0,35	0,2927
10,0	2,919	3,74	0,13	0,2919

Figura 15. Curva de calibración para el método de determinación de nitratos en aguas naturales.



Los resultados de las características de linealidad y sensibilidad del método se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método.

Parámetro	Valor experimental	Criterio de aceptación
Ecuación de la recta	$y=0,2917x+0,0029$	$y = bx + a$
Coefficiente de correlación (r)	0,9999	$\geq 0,990$
Coefficiente de determinación (r^2)	0,9999	$\geq 0,980$
Prueba estadística para r	199,98	$t_{exp} > t(p:0,05; 8) = 2,31$
Promedio de los factores respuesta	0,2926	-
DESVEST de los factores respuesta	$9,30 \times 10^{-4}$	-
CVf (%)	0,29%	$CVf \leq 5\%$
Pendiente (b)	0,2917	-
Desviación estándar de b	$3,03 \times 10^{-4}$	-
Desviación estándar relativa de b (Sbrel (%))	0,10 %	$Sbrel \leq 2\%$
Intervalo de confianza de b	0,2910 a 0,2924	Excluye el valor de cero
Prueba estadística t para b	963,30	$t_{exp} > t(p:0,05; 8) = 2,31$
Intercepto (a)	0,0029	-
Desviación estándar de a	$1,88 \times 10^{-3}$	-
Desviación estándar relativa de a (Sarel (%))	65,52 %	-

Intervalo de confianza de a	-0,0015 a 0,0072	Debe incluir el cero
Prueba estadística para a	1,53	$t_{exp} < t(p:0,05; 8) = 2,31$

Se presentó un coeficiente de determinación lineal (0,9999) mayor que 0,990, un coeficiente de determinación (0,9999) mayor de 0,980 y una prueba t de Student para el coeficiente de correlación $t_c=399,94$ mayor al $t_{tab}=2,31$ (p: 0,05; 8). Por lo tanto se demostró que existe una alta correlación entre la concentración y la absorbancia, de esta manera la ecuación de la curva de calibración del método fue capaz de explicar la respuesta instrumental a partir del uso de la concentración.

Por otra parte, se comprobó que el método presentó una aceptable sensibilidad en el intervalo de trabajo estudiado, ya que la pendiente 0,2917 fue significativamente diferente de cero. Lo anterior debido a que el factor de respuesta promedio (0,2926) fue similar al valor de la pendiente de la recta de regresión (0,2917) y a que se cumplieron los criterios establecidos por la literatura, para un coeficiente de variación de los factores respuesta (0,2926%) menor que 5 %, una desviación estándar relativa de la pendiente (S_{brel} 0,10%) menor de 2 % y un test estadístico de la pendiente $t_c = 963,30$ mayor al $t_{tab} = 2,31$ (p: 0,05; 8).

La proporcionalidad del método quedó completamente demostrada, puesto que al aplicarse el test de significación del intercepto a través de la prueba t de Student este resultó ser no significativo ($t_c = 1,53 < t_{tab} = 2,31$) para un nivel de confianza del 95 % y 8 grados de libertad, indicando que la recta presentó un intercepto cercano a cero. Adicionalmente, el intervalo de confianza del intercepto (-0,0015 a 0,0072) incluyó el valor cero, confirmándose así la existencia de convergencia al origen y la ausencia de errores sistemáticos en el método estandarizado.

Con base en el cumplimiento de los requisitos de linealidad y sensibilidad dados por la literatura, se estableció que el método de cuantificación de nitratos en aguas

naturales es altamente lineal y presentó una aceptable sensibilidad, en el intervalo de concentraciones de 1 - 10 mg NO₃/L.

3.2.2 Determinación de los límites de detección y cuantificación del método.

Los criterios utilizados para la determinación del LDM y del LCM se describieron en la **Sección 2.5.3.2** de la Parte Experimental. En el **Anexo 10** y en la **Tabla 11** se muestran los datos y los resultados de los análisis efectuados a los blancos de reactivos, los cuales proporcionaron una desviación estándar de $1,49 \times 10^{-3}$. Por otro lado, en los **Anexos 11 al 13** se detalla toda la información acerca del estudio del intervalo de respuesta lineal, de la linealidad y de la sensibilidad del método en el intervalo de concentración comprendido entre 0,05 a 0,5 mg NO₃⁻/L, a partir de la cual se obtuvo una pendiente de calibración de 0,2970. Además se comprobó una alta linealidad y una aceptable sensibilidad del método a bajas concentraciones, ya que se cumplen con los criterios estipulados por la literatura.

Entonces con los valores obtenidos y con las ecuaciones descritas en el **Anexo 5** se calcularon los LDM y LCM. Siendo los valores del LDM = 0,0147 mg NO₃⁻/L y del LCM = 0,0492 mg NO₃⁻/L aceptables para la determinación de nitratos en aguas naturales por espectrofotometría UV/VIS.

Tabla 11. Determinación de los límites de detección y cuantificación del método.

Parámetros	Resultados
Concentración Promedio de los blancos de reactivos (mg/L)	0,022
Desviación estándar	$1,46 \times 10^{-3}$
Coefficiente de variación (%)	6,48
LDM (mg/L)	0,0147

LCD (mg/L)	0,0492
$t_n = 30(p=0,05) = 2,74$	No se descarto ningún dato

3.2.3 Evaluación de la precisión del sistema y del método. Los datos y resultados obtenidos para la evaluación de la precisión del sistema y del método, se detallan en los **Anexos 14 a 16** y en la **Tabla 12**, respectivamente.

Tabla 12. Evaluación de la precisión del sistema y del método.

Precisión del sistema						
Parámetros	Repetibilidad			Precisión intermedia		
	Niveles de concentración			Niveles de concentración		
	2 mg/L	5 mg/L	8 mg/L	2 mg/L	5 mg/L	8 mg/L
Promedio	1,991	4,993	7,992	1,988	4,992	7,991
DESVEST	0,00775	0,00696	0,00754	0,0106	0,00772	0,00846
CV%	0,39	0,14	0,09	0,53	0,15	0,11
CV_H%	14,41	12,56	11,7	14,41	12,56	11,7
I. de C.	1,989-	4,990-	7,990-	1,985-	4,989-	7,988-
media	1,993	4,995	7,994	1,992	4,994	7,993

Precisión del método						
Parámetros	Repetibilidad			Precisión intermedia		
	Niveles de concentración			Niveles de concentración		
	2 mg/L	5 mg/L	8 mg/L	2 mg/L	5 mg/L	8 mg/L
Promedio	1,972	4,994	7,988	1,965	4,995	7,990
DESVEST	0,0143	0,0151	0,0157	0,027	0,032	0,049
CV%	0,72	0,30	0,19	1,36	0,63	0,62
CV_H%	14,41	12,56	11,7	14,41	12,56	11,7
I. de C.	1,967-	4,989-	7,984-	1,957-	4,985-	7,974-
media	1,976	4,998	7,993	1,974	5,005	8,005

Se demostró que el sistema y el método presentaron una buena precisión expresada en sus formas: repetibilidad (Sistema: 0,39; 0,14 y 0,09%; Método: 0,72; 0,30 y 0,19%) y precisión intermedia (Sistema: 0,53; 0,15 y 0,11; Método: 1,36; 0,63 y 0,62%). En todos los casos se obtuvieron coeficientes de variación (CV %) menores a los establecidos por la literatura, como son los criterios de aceptación para los métodos espectrofotométricos (repetibilidad < 1,5 % y precisión intermedia < 3 %) y los evaluados con la relación empírica de Horwitz (2mg/L: 14,41%; 5 mg/L: 12,56% y 8 mg/L: 11,7%).

La precisión del sistema y del método fue mayor a medida que se incremento la concentración (2 > 5 > 8 mg NO₃⁻/L), puesto que los coeficientes de variación en

general disminuyeron al aumentar la concentración de nitratos. Los intervalos de confianza de la media indicaron el rango de concentración en el que se encontraron los valores considerados como verdaderos para los estándares y las muestras que se analizaron.

En las **Figuras 16** y **17** se muestran los gráficos de control de la precisión intermedia del sistema (a partir de un estándar de 5 mg NO₃/L) y del método (a partir de una muestra de agua natural enriquecida), respectivamente.

Figura 16. Gráfico de control de la precisión intermedia del sistema para un estándar de 5 mg NO₃/L.

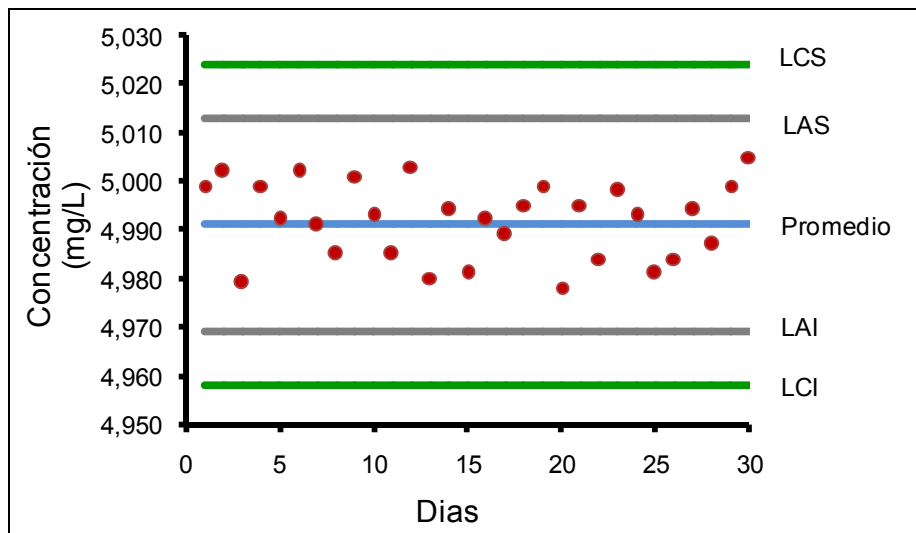
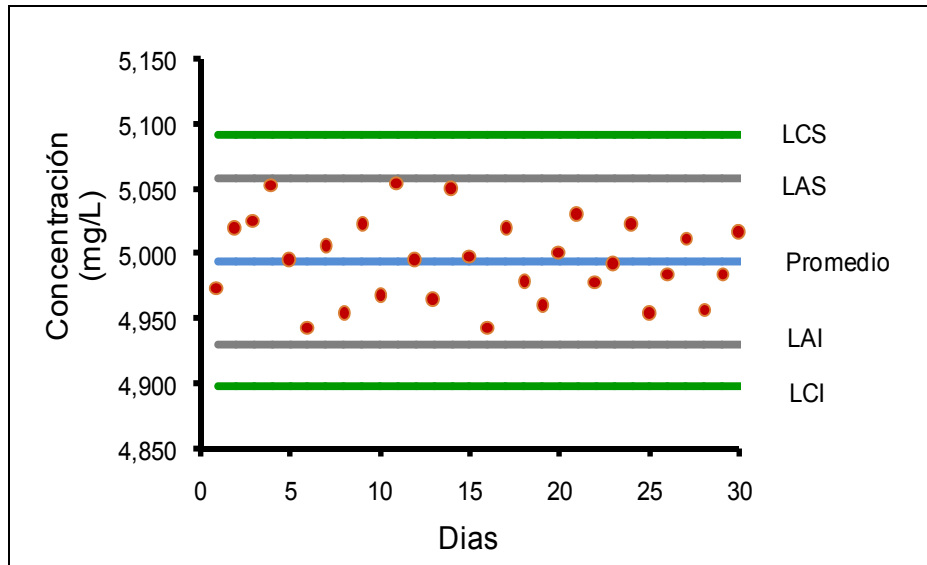


Figura 17. Gráfico de control de la precisión intermedia del método para una muestra de agua natural reforzada de 5 mg NO₃⁻/L.



Se observó que los resultados obtenidos en ambos análisis, a lo largo del tiempo varían aleatoriamente y se encuentran dentro de los límites aceptados, por lo tanto el sistema y el método se encuentran bajo control estadístico. De esta manera se corroboró que tanto el sistema como el método cumplen con las especificaciones de precisión y pueden ser aplicados con seguridad y eficiencia.

3.2.4 Evaluación de la exactitud del método a través del porcentaje de recuperación. Las concentraciones experimentales y los porcentajes de recuperación obtenidos en cada uno de los ensayos realizados, se muestran en el **Anexo 16**. Mientras los resultados de la evaluación de la exactitud del método y expresados como porcentajes de recuperación, aparecen en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Evaluación de la exactitud del método.

Parámetros	Niveles de concentración			
	2 mg/L	5 mg/L	8 mg/L	Criterio de aceptación
Recuperación promedio (%)	99,85	99,87	99,84	97-103 %
Desviación estándar	1,289	0,715	0,664	-
Coefficiente de variación (%)	1,30	0,72	0,67	≤ 3 %
Prueba estadística para %R	0,65	1,03	1,33	$t_{exp} \leq t(p:0,05; 29) = 1,699$

La evaluación de la exactitud del método en cada uno de los niveles de concentración estudiados presentó bajos coeficientes de variación (1,30; 0,72 y 0,67 %) y elevados porcentajes de recuperación (99,85; 99,87 y 99,84 %), indicando una alta exactitud del método en todo el rango de linealidad. Los cuales estuvieron comprendidos dentro de los límites establecidos por la literatura para los métodos espectrofotométricos (%CV < 3% y porcentajes de recuperación (%R) = 97-103%) [219].

Se demostró a través de una prueba t de student ($t_c = 0,65; 1,03; y 1,33 > t_{tab} = 1,699$) con una confiabilidad del 95 % y 29 grados de libertad, que no existen diferencias significativas entre la recuperación media para cada nivel de concentración bajo estudio y el 100%. Confirmándose de esta manera la exactitud del método en los tres niveles de concentración y en todo el intervalo de linealidad.

3.3 EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO EN EL ENSAYO DE APTITUD INTERLABORATORIOS. Los resultados obtenidos del análisis estadístico se observan en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Evaluación del desempeño del laboratorio en la determinación de nitratos.

Concentración reportada (mg/L)	Concentración de referencia (mg/L)	Desviación estándar (mg/L)	Z
0,37	0,35	0,04	0,5
2,17	2,29	0,17	-0,71

Obteniéndose valores del parámetro z ($0,5; -0,71$) $\leq a 2$, de esta manera el método del salicilato sódico presenta una distribución normal y se encuentra en condiciones de control estadístico, donde es baja la desviación del resultado obtenido por el laboratorio CEIAM respecto del valor esperado o considerado como verdadero. Por lo tanto se demuestra un alto desempeño del laboratorio en el desarrollo del método del salicilato de sodio para la determinación de nitratos con porcentajes de rendimiento del 100%.

3.4 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

La estimación de la incertidumbre del método del salicilato de sodio se obtuvo a partir de la combinación de las incertidumbres estándar relativas (**Secciones 2.6.3.3 y 2.6.3.4**) presentadas por el MCR, la respuesta del instrumento y la dilución de los estándares de calibración (efecto de la temperatura, repetibilidad y tolerancia) del método en todo el rango de linealidad. Expresándose el resultado final de la medición de nitratos en aguas naturales con el intervalo de incertidumbre para un factor de cobertura k (usualmente = 2 para una probabilidad de cobertura del 95%).

En la **Tabla 15** se muestran los resultados de las contribuciones de cada variable, la incertidumbre combinada e incertidumbre expandida para la determinación de nitratos en aguas naturales.

Tabla 15. Resultados del cálculo de las contribuciones, incertidumbre combinada e incertidumbre expandida, asociada al método del salicilato de sodio para la determinación de nitratos en aguas naturales.

Magnitud	Incertidumbre		
	Estándar	Relativa	Expandida
MCR	1,1547	$1,1547 \times 10^{-3}$	
Respuesta del instrumento			
2 mg/L	$3,2034 \times 10^{-3}$	$1,6017 \times 10^{-3}$	
5 mg/L	$5,2973 \times 10^{-3}$	$1,0595 \times 10^{-3}$	
8 mg/L	$5,2369 \times 10^{-3}$	$6,5462 \times 10^{-4}$	
Dilución de los estándares			
Primer factor de dilución		$1,0945 \times 10^{-3}$	
Segundo factor de dilución		$7,4526 \times 10^{-3}$	
Método			
2 mg/L		$7,7870 \times 10^{-3}$	0,0156
5 mg/L		$7,6938 \times 10^{-3}$	0,0154
8 mg/L		$7,6486 \times 10^{-3}$	0,0153

De esta manera se estableció que las muestras de aguas naturales determinadas por el método del salicilato de sodio, proporcionan una incertidumbre en todo el intervalo de linealidad que va asociada al resultado final de la medición, distribuida de la siguiente manera:

Concentraciones \leq a 2 mg NO_3^-/L :	$\pm 0,016$
Concentraciones $>$ a 2 mg NO_3^-/L y \geq a 8 mg NO_3^-/L :	$\pm 0,015$
Concentraciones $>$ a 8 mg NO_3^-/L :	$\pm 0,015$

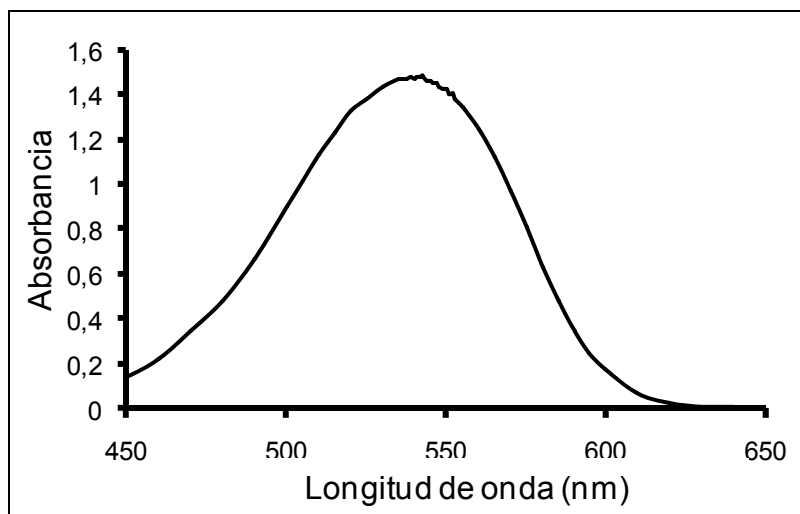
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE NITRITOS EN AGUAS NATURALES

4.1 VERIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS ESTABLECIDAS EN LA LITERATURA

Antes de la determinación de las figuras analíticas de merito y de la estimación de la incertidumbre del método de cuantificación de nitritos en muestras de aguas naturales, se verificaron las condiciones de análisis establecidas en la literatura para la puesta a punto del método. De esta manera las variables estudiadas fueron: Longitud de onda analítica, estabilidad de la señal con respecto al tiempo y efecto del pH de la muestra.

El método de determinación de nitritos en aguas naturales se efectuó a la longitud de onda de la radiación incidente que produjo la absorción máxima del ion nitrito. Esta longitud de onda se determinó a partir del espectro de absorción de la bencenosulfonamida (**Figura 17**), que exhibe un máximo de absorción a 543 nm, valor que coincide con el reportado por la literatura.

Figura 18. Espectro de absorción del ion NO_2^- en la región UV/VIS.



Los resultados obtenidos de los estudios referentes a la estabilidad de la bencenosulfonamida 0,5 mg NO_2^-/L con respecto al tiempo y al efecto que ejerce el pH de la solución sobre la absorción se muestran en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Verificación de las condiciones de análisis para la determinación de nitritos en aguas naturales.

Tiempo	Absorbancia				
	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
0	1,430	1,432	1,432	1,435	1,439
5	1,453	1,453	1,453	1,455	1,455
10	1,458	1,458	1,458	1,461	1,463
15	1,460	1,457	1,459	1,461	1,462
20	1,460	1,457	1,459	1,461	1,461
25	1,458	1,458	1,459	1,460	1,462
30	1,459	1,459	1,458	1,462	1,462
35	1,458	1,459	1,459	1,462	1,461
40	1,458	1,459	1,458	1,462	1,462
45	1,459	1,457	1,458	1,461	1,462
50	1,459	1,457	1,459	1,460	1,461
55	1,458	1,457	1,458	1,461	1,461
60	1,454	1,451	1,448	1,452	1,460
65	1,456	1,448	1,445	1,450	1,447
70	1,454	1,449	1,451	1,451	1,450
75	1,454	1,447	1,448	1,453	1,450
80	1,455	1,442	1,452	1,448	1,449
85	1,453	1,449	1,445	1,443	1,447

90	1,452	1,450	1,446	1,441	1,450
----	-------	-------	-------	-------	-------

A partir de estos datos se determinó que el análisis espectrofotométrico UV/VIS de nitritos en aguas naturales se puede realizar entre 15 y 60 minutos después de preparadas las muestras. En este intervalo las absorbancias registradas permanecen prácticamente constantes en función del tiempo, esto se observó de manera similar para los cinco valores de pHs analizados.

Siendo el intervalo de pHs comprendido entre 5 y 7 el óptimo de ser medido por el método de determinación de nitritos en aguas naturales. Puesto que, suministró las concentraciones más cercanas a las consideradas como los valores reales.

4.2 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MERITO

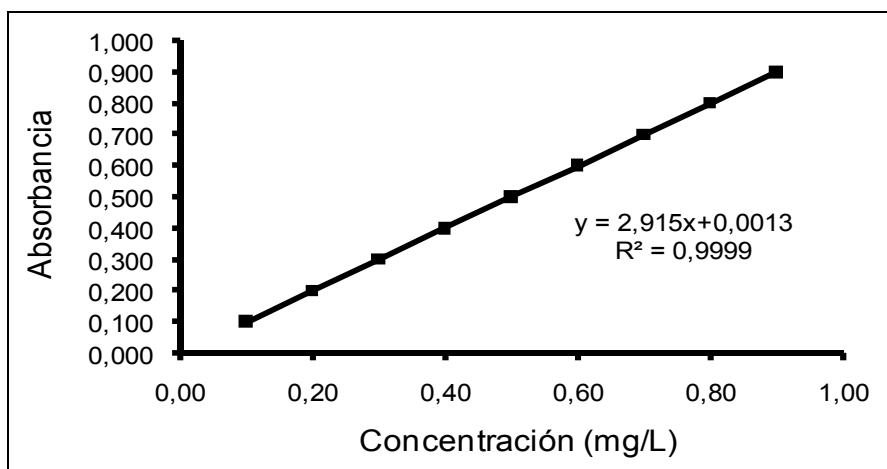
Una vez fueron verificadas las condiciones de análisis establecidas en la literatura, se procedió a la determinación de las figuras analíticas de merito del método tal como se describe en los **Anexos 4-7**.

4.2.1 Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método. La curva de calibración del método (**Figura 19**) $y=2,915x+0,0013$, se obtuvo a partir del ajuste por mínimos cuadrados a los datos promedios presentados en el **Anexo 16**. Se observó una alta linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado (0,10-0,90 mg NO₂⁻/L), representada en valores considerablemente bajos de las desviaciones estándar (0,71-0,78), de los coeficientes de variación (0,12-0,30) y de los factores de respuesta (2,914-2,928) para cada nivel de concentración evaluado (**Tabla 17**). Por lo que se llegó a deducir que existe una relación directa entre la señal instrumental y la concentración de nitritos, en el rango comprendido entre 0,1 a 0,9 mg NO₂⁻/L.

Tabla 17. Evaluación del intervalo de respuesta lineal del método.

Concentración (mg/L)	Absorbancia Promedio	Desviación Estándar (10^{-3})	Coefficiente de variación(%)	Factores repuesta (y/x)
0,10	0,293	0,84	0,29	2,928
0,20	0,584	0,71	0,12	2,920
0,30	0,876	1,92	0,22	2,919
0,40	1,168	1,58	0,14	2,920
0,50	1,458	2,28	0,16	2,916
0,60	1,752	3,21	0,18	2,919
0,70	2,042	5,07	0,25	2,917
0,80	2,331	6,50	0,28	2,914
0,90	2,626	7,82	0,30	2,918

Figura 19. Curva de calibración del método de determinación de nitritos en aguas naturales.



Los resultados del análisis estadístico de la linealidad y de la sensibilidad del método de cuantificación de nitritos en aguas naturales se muestran en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método.

Parámetro	Valor experimental	Criterio de aceptación
Ecuación de la recta	$y = 2,915x + 0,0013$	$y = bx + a$
Coefficiente de correlación (r)	0,9999	$\geq 0,990$
Coefficiente de determinación (r^2)	0,9999	$\geq 0,980$
Prueba estadística para r	187,07	$t_{exp} > t$ (p:0,05; n-2)= 2,36
Promedio de los factores respuesta	2,919	-
DESVEST de los factores respuesta	0,0038	-
CVf (%)	0,13%	$CVf \leq 5\%$
Pendiente (b)	0,2915	-
Desviación estándar de b	$1,39 \times 10^{-3}$	-
Desviación estándar relativa de b (Sbrel (%))	0,048 %	$Sbrel \leq 2\%$
Intervalo de confianza de b	2,9120 a 2,9185	Excluye el valor de cero
Prueba estadística t para b	2095,67	$t_{exp} > t$ (p:0,05; n-2) = 2,36
Intercepto (a)	0,0013	-
Desviación estándar de a	$7,93 \times 10^{-4}$	-
Desviación estándar relativa de a (Sarel (%))	62,62 %	-
Intervalo de confianza de a	-0,0006 a 0,0031	Debe incluir el cero
Prueba estadística para a	0,0008	$t_{exp} < t$ (p:0,05; n-2)= 2,36

Se presentaron altos valores del coeficiente de correlación (0,9999) y del coeficiente de determinación (0,9999), los cuales indicaron una fuerte correlación entre las variables (concentración y la absorbancia). Dicha correlación fue corroborada a partir de la prueba t de Student realizada al coeficiente de correlación ($t_c = 187,07 > t_{tab} 2,36$) a un nivel de confianza de $P=0.05$ con 7 grados de libertad.

De otro lado se comprobó que el método presenta una alta sensibilidad ya que la pendiente fue significativamente diferente de cero. Esto fundamentado en los siguientes criterios: una relación promedio y/x (2,919) cercana al valor de la pendiente de la curva de calibración del método (2,915), un coeficiente de variación de los factores de respuesta (0,13 %) menor que el 5 % y una prueba de

proporcionalidad no significativa del coeficiente de variación de la pendiente ($0,048\% < 2.0\%$).

Por otra parte se demostró la existencia de convergencia al origen y la ausencia de errores sistemáticos en el método. Puesto que la prueba de significación del intercepto para una probabilidad del 95% y 7 grados de libertad, resultó ser no significativa ($t_c = 0,0008 > t_{tab} = 2,36$) y a que el intervalo de confianza del intercepto incluyó el valor cero (-0,0006 a 0,0031).

Es así como todos los parámetros evaluados se encontraron dentro de los límites de aceptación estipulados por la literatura, demostrándose que el método es lineal y altamente sensible en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

4.2.2 Determinación de los límites de detección y cuantificación del método.

La evaluación de los LDM y LCM se efectuó con base en los criterios y ecuaciones descritos en la **Sección 2.5.3.2** de la Parte Experimental y en el **Anexo 5**, respectivamente.

Se calculó la desviación estándar ($4,85 \times 10^{-4}$) de una serie de 30 blancos de reactivos (**Anexo 18**) y la pendiente de la curva de calibración del método (2,923) en el rango de concentraciones comprendido entre 0,01 y 0,09 mg NO₂⁻/L (**Anexos 19-20**). Se comprobó una adecuada linealidad y sensibilidad del método considerando bajas concentraciones de nitritos (**Anexo 21**), ya que se cumplieron con los límites establecidos por la literatura. De esta manera los resultados de la determinación de los LDM y LCM se muestran en la **Tabla 19**, indicando que los valores alcanzados son aceptables para la determinación de nitritos en aguas naturales.

Tabla 19. Determinación de los límites de detección y cuantificación del método.

Parámetros	Resultados
Concentración Promedio de los blancos de reactivos (mg/L)	0,001
Desviación estándar	$4,85 \times 10^{-4}$
Coefficiente de variación (%)	51,06
LDM (mg/L)	0,0005
LCD (mg/L)	0,0017
$t_n = 30(p=0,05) = 2,74$	No se descarto ningún dato

4.2.3 Evaluación de la precisión del sistema y del método. Los resultados obtenidos para la evaluación de la precisión del sistema y del método, expresada como repetibilidad y precisión intermedia se muestran en la **Tabla 20**.

La precisión del sistema y del método mostró alta repetibilidad (Sistema: 0,24; 0,36 y 0,38 %; Método: 0,42; 0,44 y 0,49%) y precisión intermedia (Sistema: 0,28; 0,37 y 0,49; Método: 0,51; 0,73 y 0,81%), ya que se alcanzaron coeficientes de variación adecuados en todos los niveles de concentración analizados. Dichos coeficientes de variación fueron menores a los permitidos por la literatura para los métodos espectrofotométricos (repetibilidad < 1,5 % y precisión intermedia < 3 %) y a los evaluados a partir de la relación empírica de Horwitz (0,2 mg/L: 28,83%; 0,5 mg/L: 25,12% y 0,8 mg/L: 23,4%).

Se observó que la precisión del sistema y del método disminuyó a medida que se incremento la concentración de nitritos, esto reflejado en el aumento de los coeficientes de variación con la concentración. Por lo tanto, la precisión del sistema y del método es mayor a altas concentraciones. Los intervalos de

confianza de la media comprendieron el rango de concentración en el cual se ubicaron los valores reales de los estándares y las muestras que se analizaron.

Tabla 20. Evaluación de la precisión del sistema y del método.

Precisión del sistema						
Parámetros	Repetibilidad			Precisión intermedia		
	Niveles de concentración			Niveles de concentración		
	0,2 mg/L	0,5 mg/L	0,8 mg/L	0,2 mg/L	0,5 mg/L	0,8 mg/L
Promedio	0,199	0,494	0,793	0,199	0,495	0,797
DESVEST	0,00048	0,00178	0,00300	0,00057	0,00182	0,00393
CV%	0,24	0,36	0,38	0,28	0,37	0,49
CV_H%	28,83	25,12	23,4	28,83	25,12	23,4
I. de C.	0,199-	0,493-	0,792-	0,199-	0,495-	0,795-
media	0,200	0,494	0,794	0,200	0,496	0,798

Precisión del método						
Parámetros	Repetibilidad			Precisión intermedia		
	Niveles de concentración			Niveles de concentración		
	0,2 mg/L	0,5 mg/L	0,8 mg/L	0,2 mg/L	0,5 mg/L	0,8 mg/L
Promedio	0,199	0,498	0,793	0,200	0,499	0,798
DESVEST	0,00084	0,00221	0,00389	0,00101	0,00363	0,00649
CV%	0,42	0,44	0,49	0,51	0,73	0,81
CV_H%	28,83	25,12	23,4	28,83	25,12	23,4
I. de C.	0,199-	0,499-	0,792-	0,199-	0,498-	0,796-
media	0,200	0,497	0,795	0,200	0,501	0,801

Los datos obtenidos en los ensayos de precisión intermedia del sistema (a partir de un estándar de 0,5 mg NO₂/L) y del método (a partir de una muestra de agua natural enriquecida de 0,5 mg NO₂/L) en función del orden cronológico de los ensayos (**Anexo 22 a 24**), se representaron en las **Figuras 20 y 21**.

Figura 20. Gráfico de control de la precisión intermedia del sistema para un estándar de 0,5 mg NO₂⁻/L.

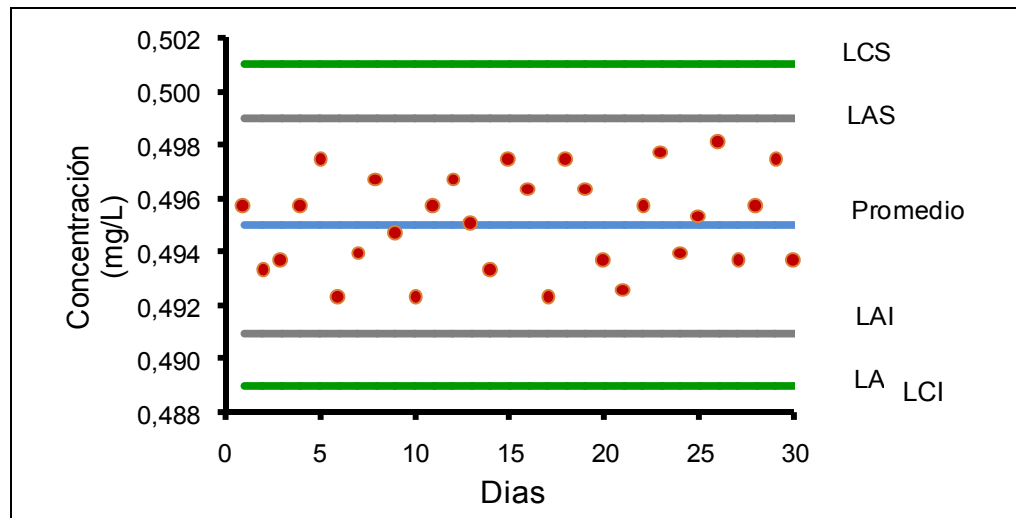
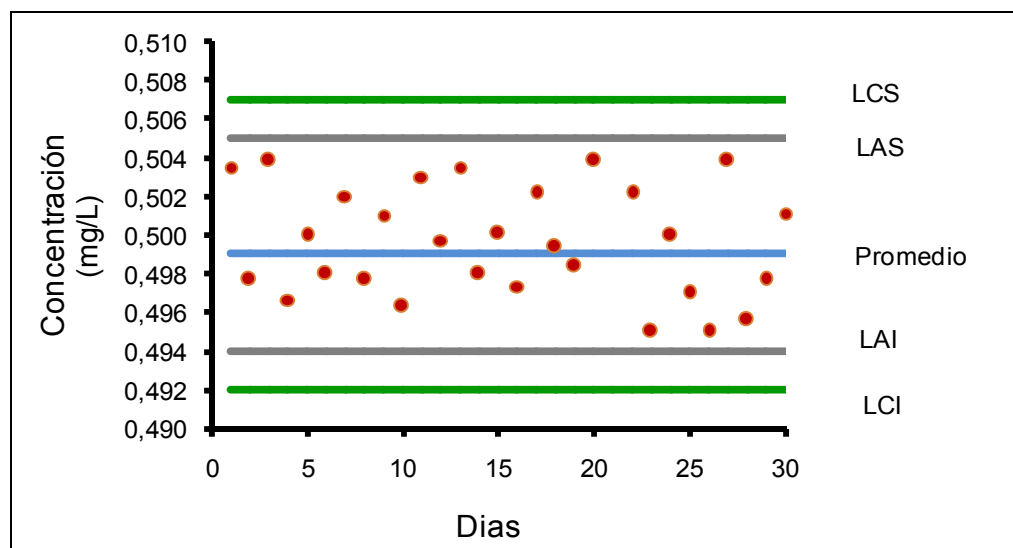


Figura 21. Gráfico de control de la precisión intermedia del método para una muestra de agua natural reforzada de 0,5 mg NO₂⁻/L.



A partir de los cuales se observó que no existe ninguna tendencia que demostrará posibles errores sistemáticos en el proceso de determinación y por lo tanto alteraciones en el contenido de nitritos en los estándares y en las muestras analizadas. Es así, como se comprobó que tanto el sistema como el método son precisos para los diferentes niveles de concentraciones y bajo las condiciones de trabajo establecidas.

4.2.4 Evaluación de la exactitud del método a través del porcentaje de recuperación. Las concentraciones y porcentajes de recuperación de cada ensayo efectuado en el análisis de la exactitud del método, se muestran en el **Anexo 24**. Entretanto los porcentajes de recuperación promedio para cada muestra de acuerdo a los niveles de concentración estudiados, se detallan en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Evaluación de la exactitud del método.

Parámetros	Niveles de concentración			Criterio de aceptación
	0,2 mg/L	0,5 mg/L	0,8 mg/L	
Recuperación promedio (%)	99,87	99,83	99,77	97-103 %
Desviación estándar	0,613	0,776	0,840	-
Coefficiente de variación (%)	0,61	0,78	0,84	≤ 3 %
Prueba estadística media y el 100%	1,19	1,18	1,52	$t_{exp} \leq t(p:0,05; 29) = 1,699$

Se presentaron para los tres niveles de concentración altos porcentajes de recuperación (99,87; 99,83 y 99,77) y coeficientes de variación (0,61; 0,78 y 0,84 %) menores del 3 %, demostrando que el método es exacto. Aunque los recobrados medios de cada uno de los niveles de concentración analizados no excedieron los límites de 97-103 % propuestos por la literatura [219], se observó

una mayor exactitud a concentraciones bajas. Se confirmó que el método es altamente exacto en todo el intervalo de linealidad ya que no se presentaron diferencias significativas entre el recobrado medio y el valor aceptado como referencia (100%), puesto que la prueba t de Student para un nivel de confianza de $P=0.05$ con 29 grados de libertad proporcionó una $t_c = 1,19$; $1,18$ y $1,52 < t_{tab} = 1,699$.

4.3 EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO EN EL ENSAYO DE APTITUD INTERLABORATORIOS. Los resultados obtenidos del análisis estadístico se señalan en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Evaluación del desempeño del laboratorio en la determinación de nitritos.

Concentración reportada (mg/L)	Concentración de referencia (mg/L)	Desviación estándar (mg/L)	Z
0,064	0,05	0,02	0,7
0,42	0,41	0,04	0,25

Los valores del parámetro Z (0,7 y 0,25) obtenidos son satisfactorios ya que estuvieron comprendidos dentro de los límites establecidos por la literatura ($|Z| \leq 2$). Por lo tanto el valor reportado por el laboratorio es estadísticamente comparable con el de referencia, indicando un alto desempeño en el desarrollo del método colorimétrico SM 4500-NO₂⁻ para la determinación de nitritos con un porcentaje de rendimiento del 100%.

4.4 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

Durante la estandarización de nitritos en aguas naturales se estimó la incertidumbre del método espectrofotométrico SM 4500-NO₂⁻ en todo el rango de linealidad. En dicho proceso se aplicaron las fórmulas expuestas en las **Secciones 2.6.3.3 y 2.6.3.4** a las contribuciones asociadas a la preparación de la curva de calibración. Entre las cuales se encuentran el MCR, la respuesta del instrumento y la dilución de los estándares de calibración (efecto de la temperatura, repetibilidad y tolerancia) del método. Finalmente, se expresó el resultado obtenido de la medición de nitritos en aguas naturales con el intervalo de incertidumbre para un factor de cobertura k (usualmente = 2 para una probabilidad de cobertura del 95%). Los resultados de las contribuciones de cada variable, la incertidumbre combinada e incertidumbre expandida para la determinación de nitritos en aguas naturales se pueden apreciar en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Resultados del cálculo de las contribuciones, incertidumbre combinada e incertidumbre expandida, asociada al método espectrofotométrico SM 4500-NO₂⁻ para la determinación de nitritos en aguas naturales.

Magnitud	Incertidumbre		
	Estándar	Relativa	Expandida
MCR	1,1547	1,1547 x 10 ⁻³	
Respuesta del instrumento			
0,2 mg/L	4,7545 x 10 ⁻⁵	4,9410 x 10 ⁻⁵	
0,5 mg/L	1,5444 x 10 ⁻⁴	1,6050 x 10 ⁻⁴	
0,8 mg/L	8,4342 x 10 ⁻⁵	4,8933 x 10 ⁻⁴	
Dilución de los estándares			
Primer factor de dilución		1,6986 x 10 ⁻³	
Segundo factor de dilución		1,3064 x 10 ⁻³	
Método			
0,2 mg/L		2,4347 x 10 ⁻³	4,8694 x 10 ⁻³
0,5 mg/L		2,4395 x 10 ⁻³	4,8790 x 10 ⁻³
0,8 mg/L		2,4829 x 10 ⁻³	4,9658 x 10 ⁻³

Por lo tanto, se estipuló que los resultados finales de las mediciones de nitritos en muestras de aguas naturales determinadas por el método espectrofotométrico SM 4500-NO₂⁻, están asociados a una incertidumbre en todo el rango de linealidad. La incertidumbre expandida se encuentra distribuida de la siguiente manera:

Concentraciones ≤ a 0,2 mg NO ₂ ⁻ /L:	± 0,0049
Concentraciones > a 0,2 mg NO ₂ ⁻ /L y ≥ a 0,8 mg NO ₂ ⁻ /L:	± 0,0049
Concentraciones > a 0,8 mg NO ₂ ⁻ /L:	± 0,0050

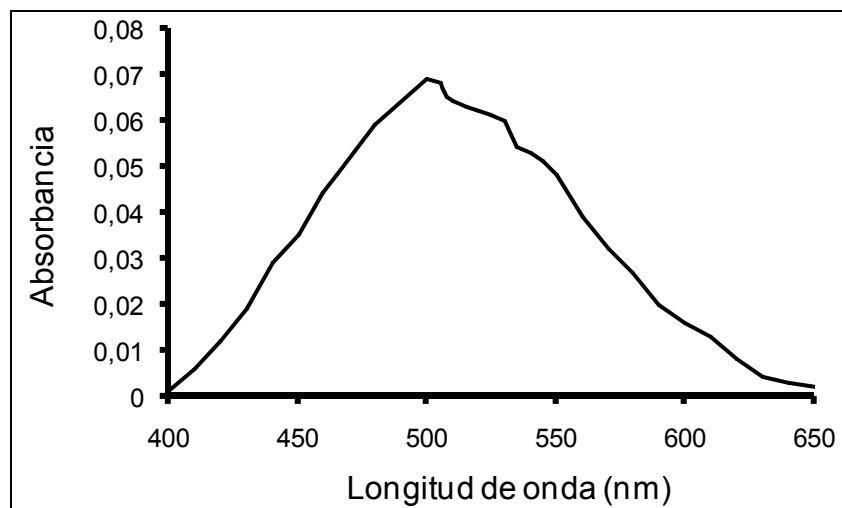
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN AGUAS RESIDUALES

5.1 VERIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS ESTABLECIDAS EN LA LITERATURA

Previo a la determinación de las figuras analíticas de merito y a la estimación de la incertidumbre del método de cuantificación de compuestos fenólicos en muestras de aguas residuales industriales, se verificaron las condiciones de análisis establecidas en la literatura para la puesta a punto del método. De esta manera las variables que se estudiaron fueron: Longitud de onda analítica, estabilidad de la señal con respecto al tiempo y efecto del pH de la muestra.

La determinación de los compuestos fenólicos en aguas residuales industriales, se efectuó en la longitud de onda analítica de mayor absorción del ion fenóxido. El espectro de absorción mostrado en la (**Figura 22**) proporcionó un máximo de absorción a 500 nm, valor que coincidió con el reportado por la literatura.

Figura 22. Espectro de absorción del ion $C_6H_5O^-$ en la región UV/VIS.



Los resultados obtenidos del estudio de la estabilidad del complejo 0,5 mg $C_6H_5O^-$ /L con respecto al tiempo y de la influencia del pH en la formación de este, se muestran en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Verificación de las condiciones de análisis para la determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales.

Tiempo	Absorbancia		
	pH 3	pH 4	pH 5
0	0,047	0,048	0,048
5	0,053	0,059	0,058
10	0,053	0,061	0,059
15	0,054	0,066	0,060
20	0,055	0,067	0,060
25	0,055	0,067	0,060
30	0,054	0,066	0,060
35	0,055	0,067	0,059
40	0,054	0,067	0,059
45	0,054	0,066	0,060
50	0,054	0,067	0,061
55	0,052	0,065	0,061
60	0,050	0,063	0,059
65	0,050	0,065	0,057

70	0,048	0,066	0,058
75	0,048	0,064	0,055
80	0,047	0,063	0,056
85	0,047	0,063	0,055
90	0,045	0,060	0,053

Se observó que la estabilización de la señal analítica en la determinación de compuestos fenólicos, se alcanzó en el intervalo de tiempo comprendido entre 15 y 50 minutos, de igual manera para los tres valores de pHs analizados. De esta manera se recomienda realizar las mediciones de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales en el rango de tiempo establecido anteriormente.

El pH 4 suministró los valores de concentración más cercanos al valor real, por lo que constituye el valor óptimo de ser medido por el método de determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales.

5.2 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MERITO

Una vez confirmadas las condiciones de análisis estipuladas por la literatura, se procedió a la determinación de las figuras analíticas de merito del método, para lo cual se siguió el procedimiento descrito en el **Anexo 4-7**.

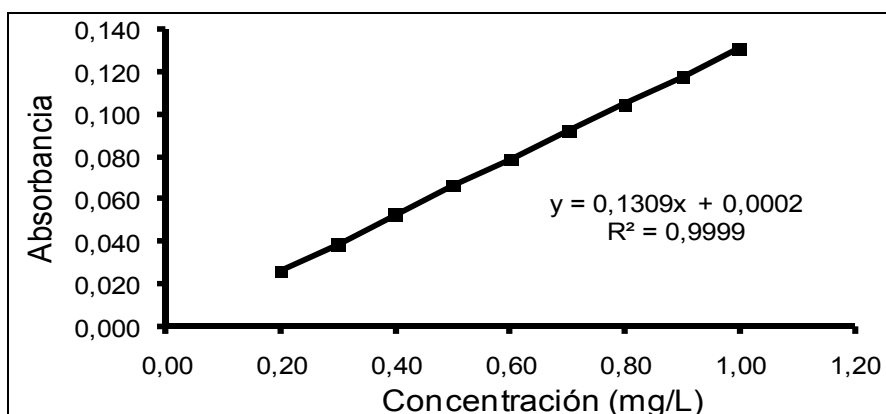
5.2.1 Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método. La curva de calibración del método $y=0,1309x+0,0002$ (**Figura 23**), fue obtenida a partir de los datos presentados en el **Anexo 25** y del ajuste por mínimos cuadrados. Observándose una respuesta lineal en todo el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,2 a 1 mg $C_6H_5O^-/L$. Esto reflejado en los valores considerablemente bajos de las desviaciones estándar ($4,47 \times 10^{-4}$ - $8,94 \times 10^{-4}$), de los coeficientes de variación (0,54 - 1,71%) y de los factores de respuesta (0,1293 - 0,1328) para cada nivel de concentración analizado (**Tabla 25**). Por lo

que se infirió que el método cumplió la ley de Beer en dicho rango de concentraciones).

Tabla 25. Evaluación del intervalo de respuesta lineal del método.

Concentración (mg/L)	Absorbancia Promedio	Desviación Estándar (10^{-4})	Coefficiente de variación(%)	Factores repuesta (y/x)
0,20	0,026	4,47	1,71	0,1310
0,30	0,039	4,47	1,15	0,1293
0,40	0,053	7,07	1,33	0,1325
0,50	0,066	8,94	1,35	0,1328
0,60	0,079	8,37	1,06	0,1313
0,70	0,092	8,37	0,91	0,1317
0,80	0,105	8,37	0,80	0,1310
0,90	0,118	8,37	0,71	0,1309
1,00	0,131	7,07	0,54	0,1310

Figura 23. Curva de calibración del método de determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales.



Los resultados de la evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método de cuantificación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales, se muestran en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método.

Parámetro	Valor experimental	Criterio de aceptación
Ecuación de la recta	$y = 0,1309x + 0,0002$	$y = bx + a$
Coefficiente de correlación (r)	0,9999	$\geq 0,990$
Coefficiente de determinación (r²)	0,9999	$\geq 0,980$
Prueba estadística para r	264,55	$t_{exp} > t (p:0,05; n-2) = 2,36$
Promedio de los factores respuesta	0,1313	-
DESVEST de los factores respuesta	$1,01 \times 10^{-3}$	-
CVf (%)	0,77 %	$CVf \leq 5\%$
Pendiente (b)	0,1309	-
Desviación estándar de b	$5,84 \times 10^{-4}$	-
Desviación estándar relativa de b	0,45 %	$S_{brel} \leq 2\%$
Intervalo de confianza de b	0,1296 a 0,1323	Excluye el valor de cero
Prueba estadística t para b	224,17	$t_{exp} > t (p:0,05; n-2) = 2,36$
Intercepto (a)	0,0002	-
Desviación estándar de a	$3,82 \times 10^{-4}$	-
Desviación estándar relativa de a	175,19 %	-
Intervalo de confianza de a	-0,0007 a 0,0011	Debe incluir el cero
Prueba estadística para a	0,57	$t_{exp} < t (p:0,05; n-2) = 2,36$

Se observó una alta correspondencia entre los valores obtenidos con la recta de calibración del método y los obtenidos experimentalmente, es decir se presentó una fuerte correlación entre las variables concentración y absorbancia. Puesto que, el coeficiente de correlación (0,9999) y de determinación (0,9999) fueron mayores a los límites estipulados ($r \geq 0,990$ y $r^2 \geq 0,980$). Dicha correlación se verificó a través de una prueba t de student efectuada al coeficiente de correlación ($t_c = 264,55 > t_{tab} = 2,36$) para un nivel de confianza de $p = 0.05$ y 7 grados de libertad.

Por otro lado, se comprobó una aceptable sensibilidad del método, ya que la pendiente fue significativamente distinta de cero. Esto respaldado en un factor de respuestas promedio (0,1313) similar al valor de la pendiente de la recta de

regresión (0,1309), en un coeficiente de variación de los factores respuestas (0,77 %) menor que el 2%, un coeficiente de variación de la pendiente (0,45%) < 2.0% y un test de proporcionalidad para el coeficiente de variación no significativo ($t_c = 224,17 > t_{tab} = 2,36$ ($p: 0,05; 7$)).

Se demostró la proporcionalidad del método y que su error sistemático es despreciable. Puesto que, el intervalo de confianza del intercepto (-0,0007 a 0,0011) incluyó el cero y el valor de t de Student ($t_c = 0,57$) para este estimador fue menor que el tabulado ($t_{tab} = 2,36$) para el 95 % de confianza y para 7 grados de libertad.

Debido a que el método de cuantificación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales cumplió con los criterios de aceptación establecidos por la literatura, se comprobó su alta linealidad y aceptable sensibilidad en todo el intervalo de respuesta lineal.

5.2.2 Determinación de los límites de detección y cuantificación del método.

Los criterios utilizados para la determinación del LDM y del LCM se describieron en la **Sección 2.5.3.2** de la Parte Experimental. Los análisis realizados a los blancos de reactivos, proporcionaron los datos y resultados que se muestran en el **Anexo 26** y en la **Tabla 28**, respectivamente.

Obteniéndose la desviación estándar de los blancos de reactivos ($5,22 \times 10^{-4}$) que se utilizó para calcular los LDM y LCM. Por otra parte, se comprobó la linealidad del método en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,04 y 0,18 mg/L (**Anexos 27 a 29**), de esta manera el valor de la pendiente de la curva de calibración del método fue 0,1298.

Se calcularon los LDM y LCM a partir de los valores encontrados anteriormente y con las ecuaciones descritas en el **Anexo 5**, presentándose un LDM de 0,0120 mg C₆H₅O⁻/L y un LCM de 0,0399 mg C₆H₅O⁻/L.

Tabla 28. Evaluación de los límites de detección y cuantificación del método.

Parámetros	Resultados
Concentración Promedio de los blancos de reactivos (mg/L)	8,916 x 10 ⁻⁴
Desviación estándar	5,22 x 10 ⁻⁴
Coefficiente de variación (%)	58,58
LDM (mg/L)	0,012
LCD (mg/L)	0,0399
tn= 30(p=0,05)= 2,74	No se descarto ningún dato

5.2.3 Evaluación de la precisión del sistema. Los resultados obtenidos para la evaluación de la precisión del sistema expresada como repetibilidad y precisión intermedia se reportan en la **Tabla 29**.

Tabla 29. Evaluación de la precisión del sistema y del método.

Precisión del sistema						
Parámetros	Repetibilidad			Precisión intermedia		
	Niveles de concentración			Niveles de concentración		
	0,4 mg/L	0,6 mg/L	0,8 mg/L	0,4 mg/L	0,6 mg/L	0,8 mg/L
Promedio	0,401	0,596	0,790	0,401	0,598	0,788
DESVEST	3,56 x 10 ⁻³	5,82 x 10 ⁻³	8,39 x 10 ⁻³	4,46 x 10 ⁻³	7,72 x 10 ⁻³	10,35 x 10 ⁻³
CV%	0,89	0,98	1,06	1,11	1,29	1,31
CV _H %	20,39	18,37	17,28	20,39	18,37	17,28
I.C. media	0,400-0,402	0,594-0,598	0,787-0,793	0,400-0,403	0,595-0,601	0,785-0,792

Precisión del método						
Parámetros	Repetibilidad			Precisión intermedia		
	Niveles de concentración			Niveles de concentración		
	0,4 mg/L	0,6 mg/L	0,8 mg/L	0,4 mg/L	0,6 mg/L	0,8 mg/L
Promedio	0,364	0,592	0,784	0,399	0,598	0,797
DESVEST	$3,11 \times 10^{-3}$	$5,43 \times 10^{-3}$	$7,95 \times 10^{-3}$	$3,88 \times 10^{-3}$	$7,69 \times 10^{-3}$	$10,37 \times 10^{-3}$
CV%	0,86	0,92	1,01	0,97	1,29	1,30
CV_H%	20,39	18,37	17,28	20,39	18,37	17,28
I.C. media	0,362-0,370	0,590-0,604	0,781-0,801	0,398-0,400	0,595-0,601	0,794-0,801

La precisión del sistema y del método evaluada como repetibilidad (Sistema: 0,89; 0,98 y 1,06 %; Método: 0,86; 0,92 y 1,01%) y precisión intermedia (Sistema: 1,11; 1,29 y 1,31 %; Método: 0,97; 1,29 y 1,30 %) para los tres niveles de concentración, es satisfactoria, por cuanto los coeficientes de variación obtenidos para los estándares y muestras enriquecidas estuvieron por debajo de los límites para métodos espectrofotométricos (repetibilidad < 1,5 % y precisión intermedia < 3 %) y a los estipulados mediante la ecuación de Horwitz (0,4 mg/L: 20,39%; 0,6 mg/L: 18,37% y 0,8 mg/L: 17,28%).

Se observó una relación directa entre los coeficientes de variación y la concentración, indicando que la precisión es mayor a bajas concentraciones. Los intervalos de confianza indicaron los rangos de concentración en el que se encontraron las concentraciones consideradas como verdaderas para los estándares y muestras enriquecidas analizadas en cada uno de los niveles de concentración estudiados.

En las **Figuras 24 y 25** se muestran los gráficos de control de la precisión intermedia del sistema y del método. Obtenidos a partir de los ensayos realizados a un estándar y a una muestra enriquecida de concentraciones de 0,6 mg C₆H₅O⁻/L, con respecto a la secuencia cronológica de los ensayos (**Anexos 30-32**).

Figura 24. Gráfico de control de la precisión intermedia del sistema para un estándar de 0,6 mg C₆H₅O⁻/L.

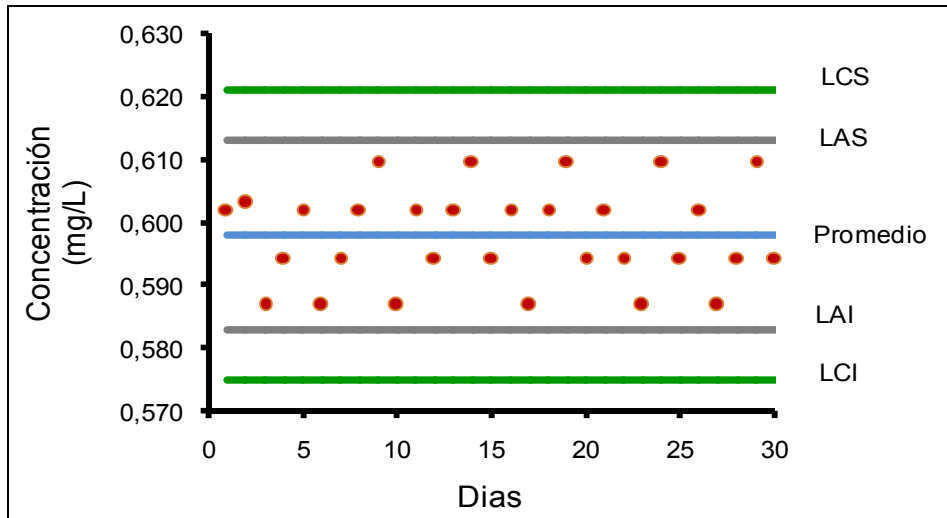
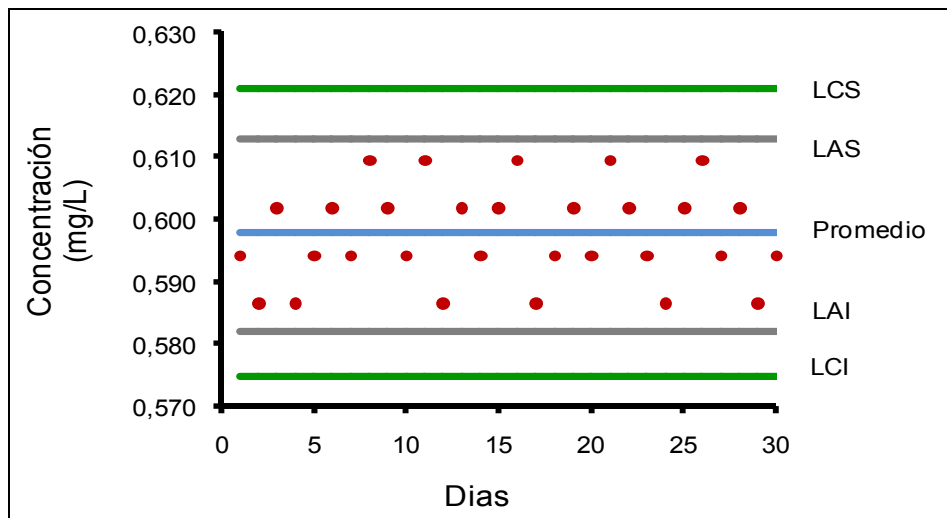


Figura 25. Gráfico de control de la precisión intermedia del método para una muestra de agua natural reforzada de 0,6 mg C₆H₅O⁻/L.



De esta manera se observó que las concentraciones obtenidas usando la curva de calibración de precisión intermedia están distribuidas dentro de los límites de control y no presentaron ningún sesgo, siendo de esta manera la variabilidad de

los resultados atribuida principalmente a los errores aleatorios. Confirmándose una buena precisión del método en todo el intervalo de linealidad.

5.2.4 Evaluación de la exactitud del método a través del porcentaje de recuperación. Los datos y resultados referentes a la exactitud del método, obtenidos por medio de la prueba de recuperación a muestras de aguas residuales industriales enriquecidas, se muestran en el **Anexo 32** y en la **Tabla 30**.

Tabla 30. Resultados del estudio la exactitud del método.

Parámetros	Niveles de concentración			Criterio de aceptación
	0,4 mg/L	0,6 mg/L	0,8 mg/L	
% Recuperación promedio (%)	99,57	99,46	99,53	97-103 %
Desviación estándar	1,939	1,828	1,684	-
Coefficiente de variación (%)	1,95	1,84	1,69	≤ 3 %
Prueba de recuperación media y el 100%	1,20	1,62	1,54	$t_{exp} \leq t(p:0,05; 29)$ = 1,699

Para cada uno de los niveles de concentración estudiados (0,4; 0,6 y 0,8 mg/L) se obtuvieron porcentajes de recuperación media de 99,57; 99,46 y 99,53 %, respectivamente, los cuales estuvieron dentro de los límites establecidos para los métodos espectrofotométricos (97-103 %) y coeficientes de variación comprendidos entre 1,69 y 1,95 % [219]. Por lo que el método presentó una alta exactitud en todo el intervalo de linealidad.

La prueba t de Student realizada a los niveles de concentración de 0,4; 0,6 y 0,8 mg/L proporcionó t calculadas (1,20; 1,62 y 1,54) menores a la t tabulada (1,699) para un 95 % de confianza y g.l. 29. Confirmándose la buena exactitud del método pues el recobrado medio para cada nivel no difirió significativamente del 100 %:

5.3 EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO EN EL ENSAYO DE APTITUD INTERLABORATORIOS. Los resultados obtenidos del análisis estadístico se indican **Tabla 31**.

Tabla 31. Evaluación del desempeño del laboratorio en la determinación de compuestos fenólicos.

Concentración reportada (mg/L)	Concentración de referencia (mg/L)	Desviación estándar (mg/L)	Z
0,76	0,59	0,09	1,89
3,6	2,98	0,44	1,41

Se observa un desvío de los resultados informados por el laboratorio, respecto al valor asignado, aunque los valores del parámetro Z se encuentran dentro del rango considerado como satisfactorio ($|Z| \leq 2$). Indicando que el conjunto de datos probablemente sigue una distribución normal, por lo tanto, el desempeño del laboratorio en la determinación de compuestos fenólicos por el método espectrofotométrico directo SM 5530 D fue bueno con porcentajes de rendimiento del 80%.

5.4 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

Se estimó la incertidumbre del método espectrofotométrico directo SM 5530 D para la determinación de compuestos fenólicos en todo el rango de linealidad, esto con el fin de cumplir con todos los requisitos estipulados en la norma ISO-IEC 17025. Lo anterior comprendió el análisis de las fuentes que contribuyeron a la incertidumbre de la curva de calibración del método (MCR, la respuesta del instrumento y la dilución de los estándares de calibración) y el uso de las ecuaciones presentadas en las **Secciones 2.6.3.3 y 2.6.3.4**.

Los resultados obtenidos de cada una de las contribuciones de cada variable, la incertidumbre combinada e incertidumbre expandida para la determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales se observan en la **Tabla 32**.

Tabla 32. Resultados del cálculo de las contribuciones, incertidumbre combinada e incertidumbre expandida, asociada al método espectrofotométrico directo SM 5530 D para la determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales.

Magnitud	Incertidumbre		
	Estándar	Relativa	Expandida
MCR	0,5774	$5,7735 \times 10^{-3}$	
Respuesta del instrumento			
0,4 mg/L	$9,331 \times 10^{-4}$	$2,3328 \times 10^{-5}$	
0,6 mg/L	$9,5434 \times 10^{-4}$	$1,5906 \times 10^{-4}$	
0,8 mg/L	$9,616 \times 10^{-4}$	$1,2020 \times 10^{-3}$	
Dilución de los estándares			
Primer factor de dilución		$9,1117 \times 10^{-3}$	
Segundo factor de dilución		$1,4150 \times 10^{-3}$	
Método			
0,4 mg/L		$1,0879 \times 10^{-2}$	$2,1759 \times 10^{-2}$
0,6 mg/L		$1,088 \times 10^{-2}$	$2,1761 \times 10^{-2}$
0,8 mg/L		$1,0945 \times 10^{-2}$	$2,1891 \times 10^{-2}$

Es así, como el resultado final de la determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales por el método espectrofotométrico directo SM 5530 D, se encuentra asociado a la incertidumbre expandida obtenida con anterioridad. De esta manera dichos resultados tendrán un margen de error distribuido en todo el rango de linealidad del método de la siguiente manera:

Concentraciones = a 0,4 mg $C_6H_5O^-$ /L: $\pm 0,022$

Concentraciones 0,4 mg $C_6H_5O^-$ /L < a 0,8 mg $C_6H_5O^-$ /L: $\pm 0,022$

Concentraciones > a 0,8 mg $C_6H_5O^-$ /L: $\pm 0,022$

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE ACEITES Y GRASAS EN AGUAS

6.1 DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MERITO

El proceso de estandarización de aceites y grasas en aguas incluyó la determinación de las siguientes figuras analíticas de merito: intervalo de trabajo, límites de detección y cuantificación instrumental, límites de detección y superior del método, precisión intermedia y exactitud.

6.1.1 Intervalo de trabajo del método. La determinación del intervalo de trabajo del método para determinar aceites y grasas en aguas por extracción Soxhlet, proporcionó los datos contemplados en el **Anexo 33** y los resultados que se muestran en la **Tabla 33**.

Tabla 33. Determinación del intervalo de trabajo del método.

Concentración (mg/L)	Concentración experimental promedio (mg/L)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)	Porcentaje de Recuperación promedio (%)
100	97,53	4,613	4,73	97,53
200	194,33	9,365	4,82	97,16
300	290,19	13,637	4,70	96,73
400	384,07	17,596	4,58	96,02
500	484,86	16,818	3,47	96,97

En todo el intervalo de concentraciones analizado se observaron coeficientes de variación entre 3,47 a 4,82 % y porcentajes de recuperación entre 96,02 a 97,53 %. Los cuales fueron considerados aceptables, ya que se encontraron dentro de

los criterios establecidos por la literatura para la capacidad inicial del método (% recuperación del 80 al 120 % y un coeficiente de variación ≤ 15 %).

Las desviaciones presentadas en la precisión y exactitud del intervalo de trabajo del método fueron consecuencias de las extracciones continuas, perdidas de constituyentes que se volatilizaron a temperaturas mayores a las empleadas en la evaporación del n-hexano e incluso compuestos que no se clasifican como aceites y grasas, pero fueron extraíbles contribuyendo al peso final y por ende a la concentración final de aceites y grasas. De esta manera se estableció que el intervalo de concentraciones comprendido entre 100 y 500 mg/L es óptimo de ser medido por el método descrito en la **Sección 2.4.4**, proporcionando resultados confiables.

6.1.2 Determinación de los límites de detección y cuantificación instrumental. Para la determinación de los LDI y LCI se analizaron una serie de blancos de reactivos, los cuales proporcionaron los datos y resultados expuestos en el **Anexo 34** y en la **Tabla 34**.

Tabla 34. Determinación de los límites de detección y cuantificación instrumental.

Parámetros	Resultados
Promedio (mg/L)	1,06
Desviación estándar	0,416
Coefficiente de variación (%)	39,09
LDI (mg/L)	0,684
LCI (mg/L)	2,256
$t_n = 30(p=0,05) = 2,74$	No se descarto ningún dato

Por lo tanto los límites instrumentales se determinaron a partir de una desviación estándar de 0,416 y de las ecuaciones descritas en la **Sección 2.6.2.2**, obteniéndose un LDI de 0,684 mg/L y un LCI de 2,256 mg/L. Los ensayos efectuados a los blancos de reactivos fueron necesarios, ya que a partir de estos se verificó la calidad del material y de los reactivos, la cual fue óptima. Por lo tanto, los LDI y LCI calculados deben ser menores al LDM.

6.1.3 Determinación del límite de cuantificación del método. En la determinación del LCM se obtuvieron los datos y los resultados presentados en el **Anexo 35** y en la **Tabla 35**, respectivamente.

Tabla 35. Determinación del límite de detección del método.

Concentración (mg/L)	Concentración experimental promedio (mg/L)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)	Porcentaje de recuperación promedio (%)
10	10,03	0,538	5,36	100,29
20	19,73	1,032	5,23	98,64
30	29,47	1,496	5,08	98,24
40	39,21	2,005	5,11	98,04
50	49,07	2,393	4,88	98,14

Se observó para los diferentes niveles de concentración estudiados coeficientes de variación entre 4,88 - 5,36 % y porcentajes de recuperación entre 98,04 – 100,29 %. Los cuales indicaron que el intervalo estudiado presenta una alta precisión y exactitud puesto que se encontraron comprendidos dentro de los límites establecidos (coeficientes de variación ≤ 15 % y porcentajes de recuperación del 80 al 120%). De esta manera se establece como LCM la concentración de 10 mg/L, ya que fue la menor concentración cuantificada con aceptable precisión y alta exactitud.

6.1.4 Determinación del límite superior del método. La determinación del límite superior del método proporcionó los datos y resultados mostrados en el **Anexo 36** y en la **Tabla 36**, respectivamente.

Tabla 36. Determinación de los límites de detección y superior del método.

Concentración (mg/L)	Concentración experimental promedio (mg/L)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)	Porcentaje de recuperación promedio (%)
750	725,80	24,956	3,44	96,77
1000	970,76	31,804	3,28	97,08
1500	1442,96	46,055	3,19	96,20
2000	1873,80	52,320	2,79	93,59

El estudio del intervalo de concentraciones de 750, 1000, 1500 y 2000 mg/L proporcionó coeficientes de variación entre 2,79-3,44 y porcentajes de recuperación entre 93,59 y 97,08 %. Presentándose una aceptable precisión y exactitud en todo el rango de concentraciones analizado. De otro lado, para los estándares de 1500 y 2000 mg/L se presentó cierta dificultad en la manipulación de los lechos filtrantes al momento de introducirlos al dedal de extracción. Con base en los resultados y a las observaciones experimentales obtenidas se recomienda trabajar en el método hasta un rango máximo de 1000 mg/L.

6.1.5 Evaluación de la precisión intermedia del método. Los resultados obtenidos de la evaluación de la precisión intermedia del método a partir de los estándares de control de concentraciones de 150, 300 y 450 mg/L, se muestran en el **Anexo 37** y en la **Tabla 37**.

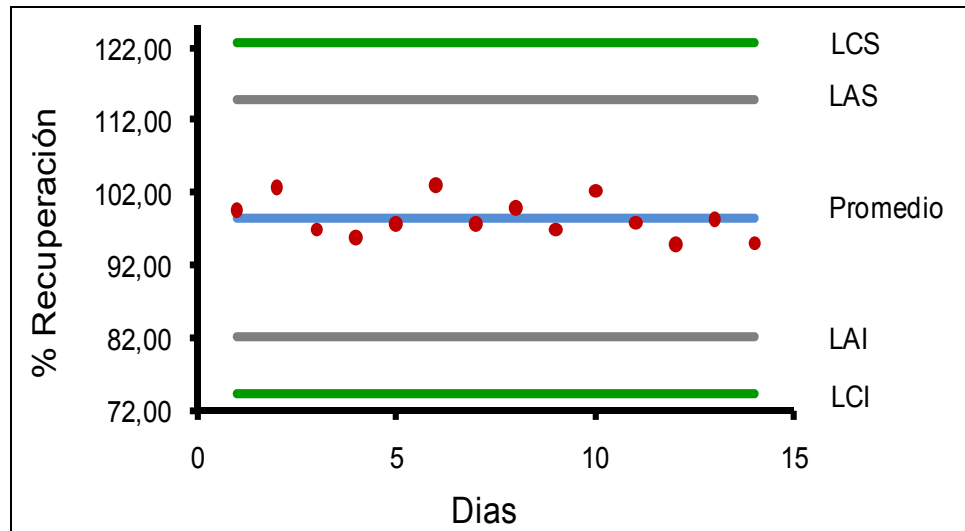
Tabla 37. Evaluación de la precisión intermedia del método.

Parámetros	Niveles de concentración		
	150 mg/L	300 mg/L	450 mg/L
Concentración experimental promedio (mg/L)	147,84	295,34	438,55
Desviación estándar	4,67	8,12	11,80

Coefficiente de variación (%)	3,16	2,75	2,69
Porcentaje de recuperación promedio (%)	98,56	98,45	97,46
Desviación estándar	3,11	2,71	2,62
Coefficiente de variación (%)	3,16	2,75	2,69

El método fue más preciso y menos exacto a altas concentraciones, esto reflejado en los bajos coeficientes de variación (2,69 %) y porcentajes de recuperación (97,46 %). El método se mantuvo bajo control estadístico, ya que de acuerdo a la **Figura 26** los resultados analíticos estuvieron dentro de los límites de control establecidos y no se presentó ningún sesgo que demostrara alteraciones en el contenido de aceites y grasas en aguas.

Figura 26. Gráfico de control de la precisión intermedia del método para un estándar de 300 mg/L.



6.1.6 Evaluación de la exactitud del método. El análisis de la exactitud del método para determinar aceites y grasas en aguas por extracción soxhlet, suministró los resultados que se muestran en la **Tabla 38**.

Tabla 38. Evaluación de la exactitud del método.

Concentración reportada (mg/L)	Concentración de referencia (mg/L)	% Error relativo
18,2	17,60	3,41
75,15	70,60	6,44

Los valores de concentración obtenidos para los dos materiales de referencia certificados por el IDEAM a partir de la experiencia, fueron cercanos a la concentración reportada. Presentándose errores relativos considerablemente bajos (3,41 y 6,44 %), indicando altas exactitudes de 96,59 y 93,56 %, en los casos estudiados. Por lo tanto, se demostró que el método es exacto en el rango de concentraciones de 10 a 1000 mg/L.

6.2 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

Durante el proceso de estimación de la incertidumbre del método de extracción soxhlet SM 5520 D para la determinación de aceites y grasas en aguas, el mensurando identificado fue la concentración de aceites y grasas en aguas y dentro de las principales fuentes de incertidumbre se encontraron la diferencia de masas y el volumen de la muestra. En la **Tabla 39** se resumen los resultados obtenidos del análisis de la incertidumbre del método.

Tabla 39. Resultados del estudio de incertidumbre del método de determinación de aceites y grasas en aguas.

Fuentes de incertidumbre		Valor x	s	$\mu(x)$	$\mu(x)/x$	$[\mu(x)/x]^2$
Peso inicial (g)		87,912	0,1374	0,079	$9,0203 \times 10^{-4}$	$8,1366 \times 10^{-7}$
		5		3		
Peso final (g)		88,912	0,1374	0,079	$9,0203 \times 10^{-4}$	$8,1366 \times 10^{-7}$
		5		3		
	Repetibilidad		0,4961			
	d					
Volumen de la muestra (mL)	Efecto de la temperatura	1000	$4,8497 \times 10^{-1}$	0,734	$7,3433 \times 10^{-4}$	$5,3924 \times 10^{-7}$
	Tolerancia		0,2309	3		
A&G de la muestra (MRC) (mg L^{-1})	448,55					
Incertidumbre combinada (mg L^{-1})						0,66

Se obtuvo la incertidumbre expandida al nivel del 95 % de confianza, para lo cual la incertidumbre combinada se multiplicó por el factor de cobertura $k = 2$ (95 %):

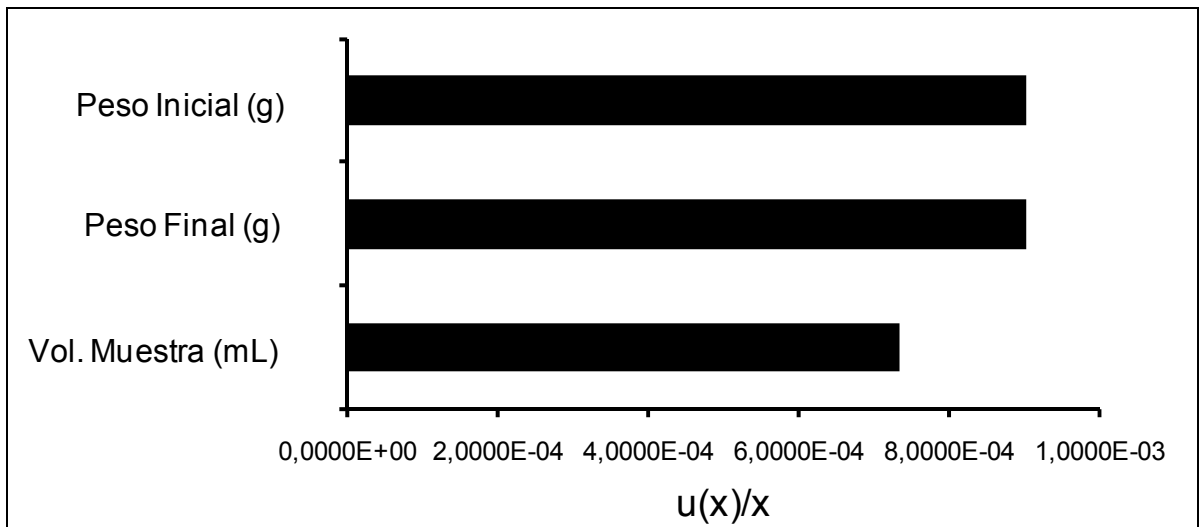
$$U_{\text{AyG}} = 1,32 \text{ mg/L}$$

Por lo tanto, el resultado se expresó como:

$$A \text{ y } G = 448,55 \pm 1,32 \text{ mg/L}$$

Se compararon las incertidumbres estándar relativas de las diferentes fuentes, con el objetivo de determinar sus influencias en el resultado del método, como se muestra en la **Figura 27**.

Figura 27. Contribución de incertidumbres estándar en la medición de aceites y grasas.



Se observó que la mayor contribución a la incertidumbre del ensayo proviene de la diferencia de masas, lo que demuestra que ésta es la operación que es necesario mejorar para aumentar la calidad de los resultados de este método.

CONCLUSIONES

- Se desarrollaron y estandarizaron los métodos analíticos: espectrofotométrico SM 4500-NO₂⁻, salicilato sódico, espectrofotométrico directo SM 5530 B - D y extracción soxhlet, SM 5520 D; para la determinación de nitratos, nitritos, compuestos fenólicos y, aceites y grasas en aguas naturales y residuales industriales. Para el desarrollo y la estandarización de dichas metodologías se verificaron las condiciones de análisis establecidas en la literatura, se determinaron las figuras analíticas de merito, se evaluó el desempeño del laboratorio en los ensayos de aptitud interlaboratorios y se estimó la incertidumbre de cada uno de los métodos anteriormente mencionados.

- Se estudiaron variables como longitud de onda analítica, estabilidad de la señal con respecto al tiempo y efecto del pH de la muestra con el fin de determinar las condiciones de trabajo más favorables para el análisis de nitratos, nitritos y compuestos fenólicos en aguas naturales y residuales industriales. Las condiciones encontradas fueron:

- ❖ Método del Salicilato sódico.

Longitud de onda de máxima absorción (nm): 415

Estabilidad de la señal con respecto al tiempo (min): 15-60

pH óptimo: 8

- ❖ Método espectrofotométrico SM 4500-NO₂⁻.

Longitud de onda de máxima absorción (nm): 543

Estabilidad de la señal con respecto al tiempo (min): 15-60

pH óptimo: 5-7

- ❖ Método espectrofotométrico directo SM 5530 B - D.

Longitud de onda de máxima absorción (nm): 500

Estabilidad de la señal con respecto al tiempo (min): 15-50

pH óptimo: 4

- Las figuras analíticas de merito determinadas cumplen con los índices de calidad estipulados por la literatura, demostrándose la idoneidad de los métodos desarrollados para la determinación de nitratos y nitritos en aguas naturales y, compuestos fenólicos en aguas residuales industriales. Por cuanto las metodologías resultaron ser lineales, precisas y exactas, en los intervalos de concentración estudiados.
 - Se evidenció en las tres metodologías estandarizadas un alto grado de relación entre las variables concentración y respuesta detectada por el espectrofotómetro de absorción molecular UV/VIS Spectronic. Puesto que, se presentaron coeficientes de correlación y determinación superiores a 0,990 y 0,980, respectivamente, en los intervalos de concentración analizados (1,0-10 mg NO_3^-/L , 0,10-0,90 mg NO_2^-/L y 0,2-1,0 mg $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-/\text{L}$).
 - En cuanto a los LDM y LCM los resultados demuestran mínimas concentraciones detectables de 0,0147 mg NO_3^-/L ; 0,0005 mg NO_2^-/L y 0,012 mg $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-/\text{L}$ y, cuantificables a partir de 0,00492 mg NO_3^-/L ; 0,0017 mg NO_2^-/L y 0,0399 mg $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-/\text{L}$. Lo cual demuestra la factibilidad de los métodos para la determinación de los analitos bajo estudio en aguas naturales y residuales industriales.
 - Las metodologías espectrofotométricas estandarizadas proporcionaron coeficientes de variación adecuados tanto para el estudio de repetibilidad (<1,5%) como de precisión intermedia (<3%). Indicando que los métodos: salicilato sódico (repetibilidad: 0,42; 0,44 y 0,49%; precisión intermedia: 0,51; 0,73 y 0,81%); SM 4500- NO_2^- (repetibilidad: 0,72; 0,30 y 0,19%; precisión intermedia: 1,36; 0,63 y 0,62%), y directo SM 5530 B-D (repetibilidad: 0,86; 0,92 y 1,01%; precisión

- Las recuperaciones medias alcanzadas estuvieron comprendidas entre el 97-103%, indicando que los métodos espectrofotométricos estandarizados son exactos y por lo tanto se consideran adecuados para las determinaciones de nitratos (99,85; 99,87 y 99,84%) y nitritos (99,87; 99,83 y 99,77%) en aguas naturales y, compuestos fenólicos (99,57; 99,46 y 99,53%) en aguas residuales industriales.

- El método de extracción soxhlet SM 5520 D para la determinación de aceites y grasas en aguas en el intervalo de concentración comprendido entre 100 y 500 mg/L, resultó ser preciso con coeficientes de variación menores al 15% (3,16, 2,75 y 2,69%) y exacto con bajos porcentajes de error relativo (3,41 y 6,44%). A partir del análisis de una serie de blancos de reactivos se obtuvieron límites de detección y cuantificación instrumental, concentraciones de 0,684 mg/L y 2,256 mg/L, respectivamente. Además, por medio del desarrollo de este método se pueden analizar muestras cuya concentración se encuentren comprendidas entre los límites de cuantificación (10 mg/L) y superior (1000 mg/L). De esta manera, todos los resultados demuestran que el método estandarizado para determinar aceites y grasas en aguas es adecuado y proporciona resultados confiables.

- Se estimó la incertidumbre de los métodos estandarizados en el presente trabajo, de esta manera se suministró confiabilidad en las mediciones realizadas y se cumplió con el requisito 5.4.6 de la norma ISO-IEC 17025.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda desarrollar métodos alternativos de análisis para la determinación de nitratos, compuestos fenólicos y, aceites y grasas en aguas. Dichas metodologías deben proporcionar análisis más rápidos y mayores niveles de sensibilidad en comparación con los métodos estándar usados durante el transcurso del presente trabajo. Persiguiendo el mismo objetivo, dar cumplimiento a las exigentes normativas relacionadas con la calidad del medio hídrico.
- Con respecto al método soxhlet SM 5520 D, se recomienda realizar periódicamente el lavado del material usado (de acuerdo al protocolo de lavado de material (**Anexo 1**) y el proceso de extracción en el tiempo de análisis estipulado de 4 horas. Con el fin de obtener resultados analíticos con un alto grado de precisión y exactitud.
- Se recomienda efectuar de manera constante ciertas actividades para asegurar la calidad de los resultados, entre las que figuran: capacitación del personal, control de las condiciones ambientales, calibración y verificación periódica del material volumétrico e instrumentos usados en el laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Review of World Water Resources by Country. Rome **2003**. pp. 3-7. [Consultado: 20 de Febrero de 2010]. [On-line]: <ftp://ftp.fao.org/agl/aglw/docs/wr23e.pdf>
2. RODRÍGUEZ, M.; GAMBOA, N.; LOZANO, O.; ESTÉVEZ, A.; CASTILLO, E.; PEDRAZA, E.; MORENO, C.; ORDUZ, J. C; ORDUZ, J.; FONSECA, J.; HERRERA, I. Desempeño Ambiental de la Tecnología en la Industria Colombiana. Instituto de Hidrología, Meteorología y estudios ambientales, IDEAM. Bogotá, **2001**. pp. 499-529. [Consultado: 20 de Febrero de 2010]. [On-line]: <http://www2.ideam.gov.co/publica/medioamb/cap12.pdf>
3. RIVERA, H. G.; MARIN, R.; VANEGAS, R. Metodología de cálculo del índice de escasez. Instituto de Hidrología, Meteorología y estudios ambientales, IDEAM. Bogotá, **2004**. pp. 4-29. [Consultado: 22 de Febrero de 2010]. [On-line]: http://www.minambiente.gov.co/Puerta/destacado/vivienda/gestion_ds_municipal/nuevas_resoluciones/Rs_0865_Metodolog%C3%ADa_anexo%20.pdf
4. Instituto de Hidrología, Meteorología y estudios ambientales, IDEAM. Estudio Nacional del Agua. Bogotá, **2010**. pp. 4-29. [Consultado: 22 de Febrero de 2010]. [On-line]: http://www.rgs.gov.co/img_upload/7e2ae91df25ab11ab90322e0dd2bdb1d/enatexto.pdf
5. GARCÍA, M.; SANCHEZ, F. MARIN, R. GUZMAN, H.; VERDUGO, N.; DOMINGUEZ, E.; VARGAS, O.; PANIZZO, L.; SANCHEZ, N.; GOMEZ, J. CORTES G. El Agua. Instituto de Hidrología, Meteorología y estudios ambientales,

IDEAM. Bogotá, **2001**. pp. 115-184. [Consultado: 22 de Febrero de 2010]. [On-line]:

<http://www2.ideam.gov.co/publica/medioamb/cap4.pdf>

6. Defensoría del Pueblo. Tercer diagnóstico sobre calidad de agua para consumo humano. **2007**. P. 5-39. [Consultado: 22 de Febrero de 2010]. [On-line]:

http://www.defensoria.org.co/red/anexos/pdf/02/informe_136.pdf.

7. Rodriguez, Y. Establecimiento de una Metodología analítica para la Determinación de Nitratos en Agua Superficial y Lluvia y de Nitrógeno Orgánico en Agua Superficial por el Método de Electrodo de Ión Selectivo. Bogotá D. C. **2005**, Trabajo de grado (Química). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química.

8. ROLDÁN, G. Fundamentos de Limnología Neotropical. Medellín: Universidad de Antioquia., **1992**, pp. 296-311.

9. CARRASQUILLA, L.; MORILLO, J. Contaminación Industrial en Colombia. Colombia: Departamento Nacional de Planeación., **1994**. pp 93-119.

10. COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Decreto Reglamentario No. 1594 del 26 de junio de 1984. Bogotá : El ministerio, 1984.

11. COLOMBIA. MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE. Ley 99 del 22 de Diciembre de 1993. Bogotá: El ministerio, **1993**.

12. ICONTEC. NTC-ISO 17025. Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayo y calibración. Bogotá D. C. 2 ed. **2005**.

13. American public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. United States of America. 20^a Ed., **1998**, pp. 1-1 – 1-38, 4-112 - 4-114, 5-34-5-44.

14. RODIER, J. Análisis de las aguas: aguas naturales, aguas residuales, agua de mar: química, fisicoquímica, bacteriología y biología, Omega, Barcelona, **1989**. p. 180-181.

15. HUBER, L.; NGUYEN-HUU, J.J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P.; COHEN, N.; COMPAGNON, P.; DEWE, W.; FEINBERG, M.; LALLIER, M.; LAURENTIE, M.; MERCIER, N.; MUZARD.; NIVET, C.; VALAT, L. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—part I. **En:** J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 36 (**2004**); p. 579-586.

16. KANE, J. Analytical Bias: the Neglected Component of Measurement Uncertainty. **En:** Analyst. Vol. 122 (**1997**); p. 1283-1288.

17. BARWICK, V.; ELLISON, S.; RAFFERTY, M.; GILL, R. The evaluation of measurement uncertainty from method validation studies. Part 2: The practical application of a laboratory Protocol. **En:** Accred Qual Assur. Vol. 5 (**2000**); p. 104–113.

18. GOLD, G.; ZAVALA, M.; ZAPATA, O.; CEJA, V. Hydrocarbon Concentration in Oysters (*Crassostrea Virginica*) and Recent Sediments from Three Coastal Lagoons in Tabasco, Mexico. Bull. **En:** Environ. Contam. Toxicol. Vol. 59 (**1997**); p. 430-437.

19. PABON, J.; CHAPARRO, R. Colombia en el Ambiente Global. Instituto de Hidrología, Meteorología y estudios ambientales, IDEAM. pp. 15-32. [Consultado: 4 de Marzo de **2010**]. [On-line]:
http://institucional.ideam.gov.co/descargas?com=institucional&name=pubFile.614&downloadnamecap13_nedo_amb_col.pdf.
20. DOWNS, T. J.; CIFUENTES, E.; SUFFET, I. M. Risk Screenig for Exposure to Groundwater Pollution in a Wastewater Irrigation District of the Mexico City region. **En:** Environ. Health Perspect. Vol. 107 (**1999**); p. 553-561.
21. SIMEONOV, V.; STRATIS, J. A.; SAMARA, C.; ZACHARIADIS, G.; VOUTSA, D.; ANTHEMIDIS, A.; SOFONIOU, M.; KOUIMTZIS, Th. Assessment of the surface water quality in Northern Greece. **En:** Water Research. Vol. 37 (**2003**); p. 4119-4124.
22. VITOUSEK, P. M. Beyond global warming: ecology and global change. **En:** Ecology. Vol. 75. (**1994**); p. 1861-1876.
23. VITOUSEK, P. M.; MOONEY, H. A.; LUBCHENCO J.; MELILLO, J. Human domination of Earth's ecosystems. **En:** Science. Vol. 277 (**1997**); p. 494-499.
24. GUAN, F.; WU, H.; LUO, Y. Sensitive and selective method for direct determination of nitrite and nitrate by high-performance capillary electrophoresis. **En:** Journal of Chromatography A. Vol. 719 (**1996**); p. 427-433.
25. STEWART, B. A.; HOWEL, T. A. Encyclopy of Water Science. 2 ed. New York, USA: Marcel Dekker, Inc, **2003**. pp. 625-629.

26. ABBAS, M. N.; MOSTAFA, G. A. Determination of traces of nitrite and nitrate in water by solid phase spectrophotometry. **En:** Analytica Chimica Acta. Vol. 410 (2000); p. 185-192.
27. BUTT S. B.; RIAZ, M.; ZAFAR, M. Simultaneous Determination of Nitrite and Nitrate by Normal Phase Ion-Pair Chromatography. **En:** Talanta. Vol. 55 (2001); p. 789-797.
28. GREER, F. R.; SHANNON, M.; MD the Committee on Nutrition and the Committee on Environmental Health. Infant Methemoglobinemia: The role of Dietary Nitrate in Food and Water. **En:** Pediatrics. Vol. 116 (2005); p. 784-786.
29. VAN GRINSVEN, H. J. M.; WARD, M. H.; BENJAMIN, N.; M DE KOK, T. Does the evidence about health risks associated with nitrate ingestion warrant an increase of the nitrate standard for drinking water?. **En:** Environmental Health: A Global Access Science Source. Vol. 5 (2006); p. 1-6.
30. LEANZA, L.; PARENTE, J.; VARANESE, C.; ECHEVERRIA, P. Presencia de Nitratos en el Agua Subterránea del Norte Bonaerense. **En:** Revista Avances en energía renovables y medio ambiente. Vol. 9 (2005); p. 13-17.
31. World Health Organization. Guidelines for Drinking-Water Quality. 2nd ed. Vol 2. Health Criteria and Other Supporting Information. Addendum. Geneva, 1998 (WHO/ EOS/98.1). [Consultado: 18 de Marzo de 2010]. [On-line]: <http://institucional.ideam.gov.co/descargas?com=institucional&name=pubFile.614&downloadname>

32. SHEIKHELDIN, S. Y.; CARDWELL, T.; CATTRALL, R.; LUQUE, M.; KOLEV, S. Determination of phenol in water by pervaporation–flow injection analysis. **En:** Anal. Chim. Acta. Vol 419 (2000); p. 9-16.
33. DAVI, M.L.; GNUDI, F. Phenolic compounds in surface water. **En:** Water Research. vol. 33 (1999); p. 3213-3219.
34. NUKATSUKA, I.; NAKAMURA, S.; WATANABE, K.; OHZEKI, K. Determination of phenol in tap water and river water samples by solid-phase spectrophotometry. **En:** Anal. Sci. Vol 16 (2000); p. 269-273.
35. RUSSO, P.; NAVARRO, A.; AGUILAR, M.; FERNANDEZ, J.; GOMEZ, A. Analytical Innovations in the Detection of Phenolics in Wines. **En:** J. of Agricultural and food chemistry. Vol 56 (2008); p. 1858-1865.
36. KUCH, H. M.; BALLSHMITER, K. Determination of Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC–(NCI)–MS in the Picogram per Liter Range. **En:** Environmental Science & Technology. Vol. 35 (2001); p. 3201-3206.
37. MAHUGO, C.; SOSA, Z.; SANTANA, J. Use of non-ionic surfactant solutions for the extraction and preconcentration of phenolic compounds in water prior to their HPLC-UV detection. **En:** Analyst. Vol 127 (2002); p. 1031–1037.
38. BERNAL, J. L.; NOZAL, M. J.; TORIBIO, L.; SERNA, M. L.; BORRULL, F.; MARCE, R. M.; POCURULL, E. Determination of phenolic compounds in water samples by on-line solid-phase extraction—supercritical-fluid chromatography with diode-array detection. **En:** Chromatographia. Vol. 46 (1997); p. 295-300.

39. JUNG, M. W.; AHN, K. H.; LEE, Y.; KIM, K. P.; RHEE, J. S.; TAE, J.; PAENG, K. J. Adsorption characteristics of phenol and chlorophenols on granular activated carbons (GAC). **En:** Microchemical Journal. Vol. 70 (2001); p. 123-131.
40. FARMAKI, E.; KALOUDIS, T.; DIMITROU, K.; THANASOULIAS, N.; KOUSOURIS, L.; TZOUMERKAS, F. Validation of a FT-IR method for the determination of oils and grease in water using tetrachloroethylene as the extraction solvent. **En:** Desalination. Vol. 210 (2007); p. 52-60.
41. MINTY, B.; RAMSEY, E. D.; DAVIES, L.; JAMES, D.; O'BRIEN, P.; LITTLEWOOD, M. Analysis of oil in water at the low ppm level using direct supercritical fluid extraction coupled on-line with infrared spectroscopy. **En:** Anal. Commun. Vol. 35 (1998); p. 277-280.
42. MINTY, B.; RAMSEY, E. D.; DAVIES, I. Development of an automated method for determining oil in water by direct aqueous supercritical fluid extraction coupled on-line with infrared spectroscopy. **En:** Analyst. Vol. 125 (2000); p. 2356-2363.
43. PAWLAK, Z.; RAUCKYTE, T.; OLOYEDE, A. Oil, grease and used petroleum oil management and environmental economic issues. **En:** J. of Achievements in materials and manufacturing engineering. Vol. 16 (2008); p. 11-17.
44. MINISTERIO DE SALUD. 1998. Decreto No. 0475 por el cual se expiden normas técnicas de calidad del agua potable. Presidencia de la República de Colombia. Bogotá.
45. TORTAJADA, L. Soluciones Quimiométricas para Optimizar el Análisis de Parámetros Químicos en Aguas. Valencia. 2002, Tesis Doctoral Europea (Química). Universidad de Valencia. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química analítica.

46. ICONTEC. –NTC-ISO 5667-3. “Calidad del agua. Muestreo. Parte 3: para la preservación y manejo de muestras. Bogotá D. C. **2008**.
47. ICONTEC. –NTC-ISO 5667-14. “Calidad del agua. Muestreo. Parte 14: Guía para el control de la calidad en el muestreo y el manejo ambiental del agua. Bogotá D. C. **2008**.
48. ZONEN, P. V.; HOOGERBRUGGE, R.; GORT, S. M.; VAN DE WIEL, H. J.; KLOOSTER, VAN'T. Some Practical Examples of Method Validation in the Analytical Laboratory. En: Trends in Analytical Chemistry. Vol 18 (**1999**); p. 584-593.
49. SANCHEZ, D. L. Validación de Métodos para la Determinación en Aguas Superficiales de Metales Alcalinos (Sodio y Potasio) por Absorción Atómica a la Llama y Alcalinotérreos (Calcio y Magnesio) por Volumetría con EDTA. Tesis pregrado. Universidad Distrital Francisco José de Caldas- IDEAM. Facultad de Ciencias y Educación. Departamento de Licenciatura en Química. **2002**.
50. OTTO, M. Chemometrics Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry. Ed. Wiley-VCH, Weinheim, **1999**. p. 13-48.
51. PANIZZO, L. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM. GUIA PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD ANALITICA EN LABORATORIOS DE QUIMICA AMBIENTAL. Santafé de Bogotá, D.C., Abril de **1999**.
52. RODRIGUEZ, G.; BLANCO, R. Aseguramiento de la calidad analítica y norma ISO 17 025 en laboratorios clínicos y químicos. En: Rev. Costarric. Cienc. Méd. Vol 22 (**2001**); p. 83-97.

53. OTALORA, A. Séptimo curso-taller VALIDACION DE METODOS ANALÍTICOS. Laboratorio Salud Ambiental. Programa de vigilancia de la calidad del agua potable, metales y no metales de interés en Salud Publica. Bogotá, D. C. Junio, **2005**.
54. HUBER, L. Validation of Analytical Methods: Review and Strategy. Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn. **1999**. P. 1-17.
55. CORTES, N.; MENDEZ, Y. Validación de las pruebas de esterilidad por la técnica de filtración por membrana y endotoxinas bacterianas por el método de LAL en 3 productos farmacéuticos. Bogotá D. C. **2006**, Trabajo de Pregrado (Microbiología). Universidad Pontificia Javeriana. Facultad Ciencias Básicas. Departamento Microbiología.
56. OSPINA, L. S. El método de análisis para los estudios de estabilidad y de biodisponibilidad de medicamentos. Parte I. En: Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas. Vol 22 (**1994**); p. 7-12.
57. CASTILLO, B. C.; GONZALEZ, R. Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para la Cuantificación de Fármacos. En: Rev. Cub. Farm. Vol 30 (**1996**); p. 1-7.
58. Analytical Methods Committee. Recommendations for the Definition, Estimation and Use of the Detection Limit. En: Analyst. Vol 112 (**1987**); p. 199-204.
59. THOMPSON, M.; WOOD, R. Harmonised Guidelines For Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories. En: J. Pure & Applied Chemistry. Vol 67 (**1995**). p. 49-56.

60. MORALES, C. Desarrollo y Validación Prospectiva de una Técnica Analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg Tabletas Cubiertas. Lima. **2004**, Trabajo de Postgrado (Farmacia y Bioquímica). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Química Farmacéutica.
61. FAO/WHO. Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling. In House Method Validation. Budapest, Hungary. **2001**. p. 1-42.
62. OSPINA, L. S. El Método de Análisis para los Estudios de Estabilidad y de Biodisponibilidad de Medicamentos. Parte II. **En:** Rev. Colomb. Cien. Quím. Far. Vol. 23 (**1995**); p. 95-100.
63. LANCAS, F. Validação de Métodos Cromatográficos de Análise. Sao Carlos: RiMa, **2004**. 46 p.
64. HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. **En:** Analytical Chemistry. Vol. 54 (**1982**); p. 67A-76A.
65. RIU, J. Gráficos de Control de Shewhart. **En:** Dialnet. Vol. 306; p. 1016-1019.
66. THOMPSON, M.; ELLISON, S.; FAJGELJ, A.; WILLETTS, P.; WOOD, R. Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement. **En:** J. Pure & Applied Chemistry. Vol. 71 (**1999**); p. 337-348.
67. FAO/IAEA. Validation of Analytical Methods for Food Control. **En:** FAO Food and Nutrition Paper. Vol. 68 (**1998**); p. 1-18.

68. VELANDIA, J. C. Validación del Método Analítico para la Cuantificación de Bacitracina en el Laboratorio de Control de Calidad de una Industria Farmacéutica Veterinaria. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Microbiología Industrial. Bogota D. C. **2008**. p. 29-37.
69. TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and Measurement Uncertainty of Analytical Results. **En:** Trends in Analytical Chemistry. Vol. 23 (**2004**); p. 480-490.
70. ELLISON, S. L. R.; BARWICK, V. J. Estimating Measurement Uncertainty: Reconciliation Using a Cause and Effect Approach. **En:** Accred Qual Assur. Vol. 3 (**1998**); p. 101-105.
71. THOMPSON, M. Towards a unified model of errors in analytical measurement. **En: Analyst.** Vol. 125 (**2000**). p. 2020 – 2025.
72. PHILLIPS, S. D.; EBERHARDT, K. R. Guidelines for Expressing the Uncertainty of Measurement Results Containing Uncorrected Bias. **En:** J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol. Vol. 102 (**1997**). p. 577-585.
73. DELGADO, G.; NAGEL, B. Un Experimento sencillo para evaluar la Incertidumbre siguiendo la guía GUM ISO 1995 y utilizando el cálculo simbólico MAPLE 11.0. **En:** Universitas. Vol 1 (**2008**); p. 19-26.
74. VEENA, K.; NARAYANA, B. Spectrophotometric Determination of Nitrite Using New Coupling Agents. **En:** Ind. Journal of Chemical Technology. Vol. 16 (**2009**); p. 89-92.

75. CHERIAN, T.; NARAYANA, B. A New System for the Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Nitrite in Environmental Samples. **En:** J. Braz. Chem. Soc. Vol. 17 (**2006**); p. 577-581.
76. NARAYANA, B.; SUNIL, K. A Spectrophotometric Method for the Determination of Nitrite and Nitrate. **En:** Eurasian J. Anal. Chem. Vol. 4 (**2009**), p. 204-214.
77. O'TOOLE, M.; SHEPHERD, R.; LAU, K.; DIAMOND, D. Detection of Nitrite by flow injection analysis using a novel Paired Emitter-Detector Diode (PEDD) as a photometric Detector. **En:** Advanced Environmental, Chemical, and Biological Sensing Technologies V. (**2007**).
78. SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **En:** Sensors. Vol. 3 (**2003**); p. 276-284.
79. KERSHAW, N.; CHAMBERLIN, N. Determination of nitrites. Discussion of the shinn method as applied to examination of water. **En:** Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. Vol. 14 (**1942**); p 312-313.
80. MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. **En:** Nitric Oxide. Vol 5 (**2001**); p. 62-71.
81. MIURA, Y.; KUSAKARI, K. Flow Injection Analysis of Nitrite Based on Spectrophotometric Measurements of Iodine Formed by Oxidation of Iodide with Nitrite. **En:** Anal. Sci. Vol. 15 (**1999**); p. 923-926.

82. OMRAN, A. A. NOVEL REAGENTS FOR FACILE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF TRACE AMOUNTS OF NITRITE IN WATER AND SOIL SAMPLES. EN: AFINIDAD: REVISTA DE QUÍMICA TEÓRICA Y APLICADA. VOL. 64 (2007); P. 54-59.
83. REVANASIDDAPPA, H. D.; KUMAR, K.; BILWA, M. Facile Spectrophotometric Determination of Nitrite Using Diazotization with p-Nitroaniline and Coupling with Acetyl Acetone. **En:** Microchimica acta. Vol. 137 (2001); p. 249-253.
84. AYDIN, A.; ERCAN, O.; TASCIOGLU, S. A novel method for the spectrophotometric determination of nitrite in wáter. **En:** Talanta. Vol. 66 (2005); p. 1181-1186.
85. OZMEN, H.; POLAT, F.; CUKUROVALI, A. Spectrophotometric Determination of Nitrite in Water Samples with 4-(1-Methyl-1-Mesitylcyclobutane-3-yl)-2-Aminothiazole. **En:** Analytical Letters. Vol 39 (2006); p. 823-833.
86. WANG, G.F.; SATAKE. M.; HORITA, K. Spectrophotometric determination of nitrate and nitrite in water and some fruit samples using column preconcentration. **En:** Talanta 46 (1998) 671–678
87. MOORCROFT, M.J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **En:** Talanta. Vol. 54 (2001); p. 785-803.
88. NAGARAJA, P.; KUMAR, M.; RANGAPPA,K. Dapsone and Iminodibenzyl as Novel Reagents for the Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Nitrite in Water Samples. **En:** Analytical Sciences. Vol. 17 (2001). p. 439-442.

89. DAYANANDA, B. P.; REVANASIDDAPPA, H. D. A Facile Analytical Method for the Determination of Nitrite in Water and Soil Samples. En: Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. Vol. 6 (2007); p. 2263-2271.
90. SREEKUMAR, N. V.; HEGDE, P.; MANJUNATHA, B. R.; SAROJINI, B. K. Determination of nitrite by simple diazotization method. En: Microchemical journal. Vol 74 (2003); p. 27-32.
91. NAGARAJA, P. and HEMANTHA, M. S. Spectrophotometric Determination of Nitrate in Polluted Water Using a New Coupling Reagent. En: Analytical sciences. Vol. 18 (2002); p. 355-357.
92. NAGARAJA, P.; PRAKASH, J.S.; BHASKARA, B. L. Rapid Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Nitrate-Nitrogen using Dapsone and a-Naphthol. En: E-Journal of Chemistry. Vol. 3 (2006); p. 146-153.
93. BEDWELL, C. L.; HAMAR, D. W.; HOESTEREY, M. L.; SONDERMAN, J. P.; ODDE, K. G. Comparison of four methods for forage nitrate analysis. En: J. Vet. Diagn. Invest. Vol. 7 (1995); p. 527-530.
94. YANG, J. E.; SKOGLEY, E. O.; SCHAFF, B. E.; KIM, J. J. A simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin, and soil extracts. En: Soil Sci. Soc. Am. J. Vol. 62 (1998); p. 1108–1115.
95. COUTO, M. I.; NUNES, F.; MIRANDA, N. M.; AVILA, A. A Simplified Version of the Sodium Salicylate Method for Analysis of Nitrate in Drinking Water. Centro de Tecnologia Mineral. Ministério da Ciência e Tecnologia. Coordenação de Análises Minerais – COAM. Rio de Janeiro. 2002. p. 2-7.

[Consultado: 15 de Marzo de 2010]. [On-line]:
www.cetem.gov.br/publicacao/CTs/CT2002-019-00.pdf

96. MOSHAGE, H.; KOK, B.; HUIZENGA, J. R.; JANSEN, P. L. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **En:** Clinical chemistry. Vol. 41 (1995); p. 892-896.

97. MUÑOZ, R. M.; VARGAS, F.; BOBADILLA, N. A. Assay validation for determining nitrites and nitrates in biological fluids. **En:** Revista de investigación clínica. Vol. 55 (2003); p. 670-676.

98. GRANGER, D. L.; TAINTOR, R. R.; KENNETH, B.; HIBBS, Jr.; JOHN, B. Determination of nitrate and nitrite in biological samples using bacterial nitrate reductase coupled with the griess reaction. **En:** Methods: A companion to methods in enzymology. Vol. 7 (1995); p. 78-83.

99. PATTON, C.J.; FISCHER, A. E.; CAMPBELL, W. H.; CAMPBELL, E. R.; Corn leaf nitrate reductase: a nontoxic alternative to cadmium for photometric nitrate determination in water sample. **En:** Environ. Sci. Technol. Vol. 36. (2002); p. 729-735.

100. MALCOME, D. J.; PASQUINI, C. A novel approach to non-segmented flow analysis: Part 3. Nitrate, nitrite and ammonium in waters. **En:** J. of automatic chemistry. Vol. 10 (1988); p. 192-197.

101. MONSER, L.; SADOK, S.; GREENWAY, G. M.; SHAH, I.; UGLOW, R. F. A simple simultaneous flow injection method based on phosphomolybdenum chemistry for nitrate and nitrite determinations in water and fish samples. **En:** Talanta. Vol. 57 (2002); p. 511-518.

102. BURAKHAM, R.; OSHIMA, M.; GRUDPAN, K.; MOTOMIZU, S. Simple flow-injection system for the simultaneous determination of nitrite and nitrate in water samples. **En:** Talanta. Vol. 64 (2004); p. 1259-1265.
103. HALES, B. A.; VAN GEEN.; TAKAHASHI, T.; High-frequency measurement of seawater chemistry: flow-injection analysis of macronutrients. **En:** Limnol. Oceanogr. Meth. Vol. 2 (2004); p. 91-101.
104. NYDAHL, F. On the optimum conditions for the reduction of nitrate to nitrite by cadmium. **En:** Talanta. Vol. 23 (1976); p. 349-357.
105. THABANO, J. R. E.; ABONG'O, D.; SAWULA, G. M. Determination of nitrate by suppressed ion chromatography after copperised-cadmium column reduction. **En:** J. Chromatogr. A. Vol. 1045 (2004); p. 153-159.
106. GABRIEL, D.; BAEZA, J.; VALERO, F.; LAFUENTE, J. A novel FIA configuration for the simultaneous determination of nitrate and nitrite and its use for monitoring an urban waste water treatment plant based on N/D criteria. **En:** Anal Chim Acta. Vol. 359 (1998); p. 173-183.
107. AHMED, M. J.; STALIKAS, C. D.; TZOUWARA, S. M.; KARAYANNIS, M. I. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow-injection analysis. **En:** Talanta. Vol 43 (1996); p. 1009-1018.
- 108. GALHARDO, C. X.; MASINI, J. C. SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS AS A TOOL FOR IN SITU MONITORING OF FE(II), FE(III), NO₃⁻ AND NO₂⁻ IN NATURAL AND WASTE WATERS. EN: ANALYTICA CHIMICA ACTA. VOL. 438 (2001), P. 39-48.**

109. LEGNEROVA, Z. SOLICH, P.; SKLENAROVA, H.; ATINSKU D.; KARLICEK, R. Automated simultaneous monitoring of nitrate and nitrite in surface water by sequential injection analysis. **En:** Water Research. Vol 36 (2002); p. 2777-2783.
110. DIAZ, C.; VIDAL, J. C.; GALBAN, J.; NAVAS, M. A.; LANAJA, J. A double membrane nitrate ion-selective electrode based on aliquat nitrate in paraffin. **En:** Fresenius Zhurnal Analiti Khimii. Vol. 333 (1989); p. 619-623.
111. GUREV, I. A.; ZYUZINA, L. F.; NACHKINA, L. V.; RUSYAEVA, YU. I.; KUZENKOVA, G. V. Behaviour of nitrate selective electrodes in aqueous organic media. **En:** Zhurnal Analiti Cheskoi Khimii. Vol. 36 (1993); p. 125-128.
112. HARA, H.; OHKUDO, H.; SAWAY, K. Nitrate ion selective coated-wire electrode base don tetraoctadecylammonium nitrate in solid solvents and the effect of additives on its selectivity. **En:** Analyst. Vol. 118 (1993); p. 549-552.
113. VASCONCELOS, M. T. S. D.; MACHADO, A. A. S. C. Influence of nature of the support on the temperature behaviour of all-solid-state PVC membrane nitrate ISEs. **En:** Journal of Electroanalytical Chemistry. Vol. 294 (1990); p. 209-223.
114. ARADA, M.; PEREZ, M. A.; DEL TORO, D. ARIAS, R. Comportamiento de los ESI a nitrato empleando TDAN en presencia de DBP y el DOP como disolventes mediadores en membranas liquidas sobre un soporte conductor. **En:** Revista Cubana de Química. Vol. XI (1999); p. 80-85.
115. ARADA, M.; PEREZ, L.; CALVO, J.; ALONSO, J.; TACORONTE, J. E. Evaluación de un electrodo selectivo a nitrato de membrana liquida con cloruro de trioctilmetilamonio sobre un soporte conductor. **En:** Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 1 (2002). p. 23-28.

116. GLAZIER, S. A.; Construction and characterization of nitrate reductase – based amperometric electrode and nitrate assay of fertilizers and drinking water. **En:** Anal. Chem. Vol. 70 (1998); p 1511-1515.
117. BUCHBERGER, W. W. Detection Techniques in Ion Chromatography of Inorganic Ions. **En:** Trend. Anal. Chem. Vol. 20 (2001); p. 296-303.
118. JACKSON, P. E.; CHASSANIOL, K. Advances in the determination of inorganic ions in potable waters by ion chromatography. **En:** J. Environ. Monit. Vol. 4 (2002); p. 10-15.
119. JACKSON, P. E. Ion Chromatography in Environmental Analysis. **En:** Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, (2000). p. 2779–2801.
120. KARIM, Z.; MUMTAZ, M.; SIDDIQUE, A.; KARIM, A. Simultaneous Determination of common inorganic anions in water samples by ion Chromatography. **En:** J. of Basic and Applied Sciences. Vol. 4 (2008); p. 63-66.
121. STEFANOVIC, S. C.; TOMISLAV.; B.; CURKOVIC, L. Simultaneous determination of six inorganic anions in drinking water by non-suppressed ion chromatography. **En:** Journal of Chromatography A. Vol. 918 (2001); p. 325-334.
122. ITO, K.; TAKAYAMA, Y.; MAKABE, N.; MITSUI, R.; HIROKAWA, T. Ion chromatography for determination of nitrite and nitrate in seawater using monolithic ODS columns. **En:** J. of Chromatography A. Vol. 1083 (2005); p. 63-67.

123. LIM L. W., JIN J. Y., TAKEUCHI T. Determination of Inorganic Anions in Natural Water by Microcolumn Ion Chromatography with On-column Enrichment. **En:** Anal. Sci. Vol 19 (2003); 447-449.
124. HATSIS P., LUCY Ch. Improved Sensitivity and Characterization of High-speed Ion Chromatography of Inorganic Anions. **En:** Anal. Chem. Vol 75 (2003); p. 995.
125. MIURA Y. and HAMADA H. Ion Chromatography of Nitrite at the ppb Level with Photometric Measurement of Iodide Formed by Post-Column Reaction of Nitrite with Iodide. **En:** J. Chromatography. Vol. 850 (1999); p. 153.
126. KITAMAKI Y., JIN J. Y., TAKEUCHI T. Simultaneous Determination of Inorganic Nitrogen Species by Microcolumn Ion Chromatography. **En:** J. of Chromatography. Vol. 1003 (2003); p. 197.
127. KITAMAKI Y., JIN J-Y., TAKEUCHI T. Determination of Inorganic Anions via Postcolumn Reaction with Iodide in Ion Chromatography. **En:** J. Pharm. Biomed. Anal. Vol. 30 (2003); p. 1751-1757.
128. TANAKA, H.; HADDAD, K.; HASEBE, P. R. Suppressed Electrostatic Ion Chromatography with Tetraborate as Eluent and Its Application to the Determination of Inorganic Anions in Snow and Rainwater. **En:** J. Chromatography. Vol. 884 (2000); p. 161-165.
129. COOK H.; DICINOSKI, G. W.; HADDAD, P. R. Mechanistic Studies on the Separation of Cations in Zwitterionic Ion Chromatography. **En:** J. Chromatography. Vol. 997 (2003); p. 13-20.

130. MISKAKI, P.; LYTRAS, E.; KOUSOURIS, L.; TZOUMERKAS, P. Data quality in water analysis: Validation of ion chromatographic method for the determination of routine ions in potable water. **En:** Desalination. Vol. 213 (2007); p. 182-188.
131. CHAURET, N.; HUBERT, J. Characterization of indirect photometry for the determination of inorganic anions in natural water by ion chromatography. En: Journal of Chromatography A. Vol. 469 (1989); p. 329-338.
132. GJERDE, D. T.; FRITZ, J. S. Sodium and potassium benzoate and benzoic acid as eluents for chromatography ion **En:** Anal. Chem. Vol. 53 (1981); p. 2324-2327.
133. MAURINO, V.; MINERO, C. Cyanuric Acid-Based Eluent for Suppressed Anion chromatography. **En:** Anal. Chem. Vol. 69 (1997); p. 3333-3338.
134. SCHMUCKLER, G. Gluconate-borate eluent for anion chromatography. Nature of the complex and comparison with other eluents. **En:** J. of chromatography. Vol. 356 (1986); p. 413-419.
135. THOMSEN, J. K.; COX, R, P. Alkanesulphonates as eluents for the determination of nitrate and nitrite by ion chromatography with direct UV detection. **En:** J. of Chromatography. Vol. 521 (1990); p. 53-61.
136. ITO, K.; ARIYOSHI, Y.; TANABIKI, F.; SUNAHARA, H. Anion chromatography using octadecylsilane reversed-phase columns coated with cetyltrimethylammonium and its application to nitrite and nitrate in seawater. **En:** Anal. Chem. Vol. 63 (1991); p. 273-276.

137. KANG, C.; WANG, Y.; LI, RUNBO.; DU, Y.; LI, J.; ZHANG, B.; ZHOU,L.; DU, Y. A modified spectrophotometric Method for the Determination of Trace Amounts of Phenol in Water. **En:** Microchemical Journal. Vol. 64 (2000); p. 161-171.
138. FRENZEL, W.; KREKLER, S. Spectrophotometric determination of total phenolics by extraction and sorbent extraction optosensing using flow methodology. **En:** Anal. Chem. Acta. Vol. 310 (1995); p. 437-446.
139. NUKATSUKA, I.; NAKAMURA, S.; WATANABE, K.; OHZEKI, K. Determination of Phenol in Tap Water and River Water Samples by Solid-Phase Spectrophotometry. **En:** Anal. Sciences. Vol. 16 (2000); p. 269-273.
140. SHEIKHELDIN, S.; CARDWELL, T. J.; CATTRALL, R. W.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; KOLEV, S. D. Determination of phenol in water by pervaporation–flow injection analysis. **En:** Anal. Chem. Vol. 419 (2000); p. 9-16.
141. KANG, C.; WANG, Y.; LI, R.; DU, Y.; LI, j.; ZHANG, B. ZHOU, L; DU, Y. A modified spectrophotometric method for the determination of trace amounts of phenol in water. **En:** Microchemical Journal. Vol. 64 (2000); p. 161-171.
142. SILVA, M. E. Preconcentración Selectiva de Fenoles Contaminantes Prioritarios y Determinación por Espectrofotometría Ultravioleta-Visible, Cromatografía Líquida de alta eficacia y Cromatografía Líquida de Alta Eficacia y Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas. Madrid. 2000, Trabajo de Postgrado. Universidad Complutense. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Analítica.

143. BOSCH, F.; FONT, G.; MAÑES, J. Ultraviolet spectrophotometric determination of phenols in natural and waste waters with iodine monobromide. **En:** *Analyst*. Vol. 112 (1987); p. 1335-1337.
144. EMERSON, E.; KELLY, K. The condensation of aminoantipyrine. VI. A study of the effect of excess base on the reaction of amino-antipyrine with phenolic compounds in the presence of oxidizing agents. **En:** *J. Org. Chem.* Vol. 13 (1948); p. 532-534.
145. KADAM, A. N.; BHANGALE, V. P. Rapid Determination of Total Phenols in Seawater by 4-Aminoantipyrine Colorimetry. **En:** *Indian Journal of Marine Sciences*. Vol. 25 (1996); p. 46-49.
146. ETTINGER, M.; RUCHHOFT, C.; LISHKA, R. Sensitive 4-aminoantipyrine method for phenolic compounds. **En:** *Anal. Chem.* 23 (1951); p. 1783-1788.
147. ERXLEBEN, J.; SIMON, J.; MOSKVIN; L. N.; NIKITINA, T. G. Photometric determination of phenol with a flow-injection analyser that includes a chromatomembrane-cell for sample preconcentration by liquid-liquid solvent extraction. **En:** *J. Flow. Injection. Analysis*. Vol. 18 (2001); p. 39-42.
148. LI, J. F. Flow-injection preconcentration for determination of phenol. **En:** *Tang, Fenx. Huaxue*. Vol. 24 (1996); p. 312-314.
149. FIAMEGOS, Y. C. Synthesis and analytical applications of 4-aminopyrazolone derivatives as chromogenic agents for the spectrophotometric determination of phenols. **En:** *Analytica Chimica Acta*. Vol 403 (2000); p. 315-323.

150. ICONTEC. –NTC 4582. Calidad del Agua. Método de Ensayo para Determinar Compuestos Fenólicos en Agua. Bogotá, D. C. **1999**.

151. MOLLER, J.; MARTIN, M. Determination of phenol in water by flow-injection analysis. **En:** Fresenius'Z. Anal .Chem. Vol 329 (**1988**); p. 728-731.

152. BOOTH, R. A.; LESTER, J. N. A method for the analysis os phenol and monochlorinated and brominated phenols from complex aqueous samples. **En:** J. of Chromatog. Sci. Vol 32 (**1994**); p. 259-264.

153. ALONSO, M. C.; PUIG, D.; SILGONER, I.; GRASERBAUERD, M.; BARCELO, D. Determination of priority phenolic compounds in soil samples by various extraction methods followed by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. **En:** J. Chromatography. Vol. 823 (**1998**); p: 231-239.

154. CASTRO, M. D. Analytical supercritical fluid extraction. Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (**1994**). p. 321.

155. MELCHER, R. G.; BAKE, D. W.; HUGHES, G. H. On-line membrane/liquid chromatographic analyser for pentachlorophenol and other trace phenols in waste water. **En:** Anal. Chem. Vol. 64 (**1992**); p. 2258-2262.

156. BASOVA, E. M. Determination of Phenol in Surface Waters by High-Performance Liquid Chromatography with Sorption Preconcentration. **En:** Journal of Analytical Chemistry. Vol. 57 (**2002**); p. 434-439.

157. TSUKAGOSHI, K.; KAMEDA, T.; YAMAMOTO, M.; NAKAJIMA, R. Separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis with

chemiluminescence detection. **En:** J. of Chromatography A. Vol. 29 (2002); p. 213-220.

158. RUIZ, M. A. Desarrollo de electrodos modificados química y bioquímicamente para la determinación de compuestos orgánicos de interés toxicológico. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Analítica. Madrid. 1995. p. 43-44.

159. BOLZ, U.; KORNER, W.; HAGENMAIER, H. Development and validation of a GC/MS method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. **En:** Chemosphere. Vol. 40 (2000); p. 929-935.

160. PUIG, D. and BARCELÓ, D. Determination of phenolic compounds in water and waste water. **En:** Trends in analytical chemistry. Vol. 15 (1996); p. 362-375.

161. BARCELO, D. Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance. Amsterdam: Elsevier, 1993. p. 635.

162. GEIßLER, A.; SCHOLER, H. F. GasChromatographic determination of phenol, methylphenols, chlorophenols, nitrophenols and nitroquinones in water at 0,1 µg L⁻¹. **En:** Water research. Vol. 28 (1994); p. 2047-2053.

163. GREEN, J. B.; SHIRLEY.; K. T.; ROBERT, YU.; VRANA, R. P. GC-MS analysis of phenolic compounds in fuels after conversion to trifluoroacetate esters. **En:** J. High Resol. Chromatogr. Vol. 17 (1994); p. 439-451.

164. CRESPIN, M. A.; BALLESTEROS, E.; GALLEGO, M.; VALCARCEL, M. Automatic preconcentration of chlorophenols and gas chromatographic determination with electron capture detection. **En:** Chromatographia. Vol. 43 (1996); p. 633-639.

165. BUISSON, R. S. K.; KIRK, P. W. W. Determination of chlorinated phenols in water, waste water and wastewater sludge by capillary GC/ECD. **En:** J. Chromatog. Sci. Vol. 22 (1984); p 339-342.
166. COUTTS, R. Application of a Direct to the GC Quantitation of Nitrophenols and 1-Naphtol in Enviromental Water Samples. **En:** J. of Chromatogr. Vol. 195 (1980); p. 105-112.
167. DeWALLE, F. B.; KALMAN, D. A.; DILLS, R.; NORMAN, D.; CHIAN, E. S. K.; GIABBAI, M.; GHOSAL, M. Presence of phenolic compounds in sewage, effluent and sludge from municipal sewage treatment plants. **En:** Water Sci. Technol. Vol. 14 (1982); p. 143-150.
168. TEN, N. B. Combined gas chromatography-mass spectrometry: a powerful tool in analytical chemistry. **En:** J. Chromatogr. Vol. 165 (1979); p. 207-233.
169. MASQUE, N.; POCURULL, E.; MARCE, R. M.; BORRULL, F. Determination of eleven priority EPA phenolics at ng L⁻¹ levels by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with UV and electrochemical detection. **En:** Chromatographia. Vol. 47 (1998); p. 176-182.
170. SLOBODNIK, J.; OZTEZKIZAN, O.; LINGEMAN, H.; BRINKMAN, Th. Solid-phase extraction of polar pesticides from environmental water samples on graphitized carbon and Empore-activated carbon disks and on-line coupling to octadecyl-bonded silica analytical columns. **En:** J. Chromatogr. Vol. 750 (1996); p. 227.

171. LAMPRECHT, G; HUBER J. F. K. Ultra-Trace Analysis of Phenols in Water Using High-Performance Liquid Chromatography with On-Line Reaction Detection. **En:** J. Chromatogr. A. Vol. 667 (1994); p. 47-57.

172. OJALA, M. Simultaneous separation and determination of chlorobenzenes, PCBs and chlorophenols using silica gel fractionation and CG-ECD analysis. **En:** J. High Resolute Chromatogr. Vol. 16 (1993); p. 679-682.

173. POCURULL, E.; MARCE, R. M.; BORULL, F. Determination of phenolic compounds in natural waters by liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection after on-line trace enrichment. **En:** Journal of chromatography A. Vol. 738 (1996); p 1-9.

174. WISSIACK, R.; ROSENBERG, E. Universal screening method for the determination of US Environmental Protection Agency phenols at the lower ng l^{-1} level in water samples by on-line solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry within a single run. **En:** Journal of Chromatography A. Vol. 963 (2002); p. 149-157.

175. LI, G.; LOCKE, D. C. Nonionic surfactants for improving resolution of the priority pollutant phenols by micelle-modified capillary electrophoresis. **En:** Journal of chromatography A. Vol. 734 (1996); p. 357-365.

176. FIEHN, O.; JEKEL, M. ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS IN INDUSTRIAL WASTEWATER WITH HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND POST-COLUMN REACTION DETECTION. EN: J. OF CHROMATOGRAPHY A. VOL. 769 (1997); P. 189-200.

177. ACHILLI, G.; CELLERINO, G. P.; MELZI, G.; BIRD, S. Simultaneous determination of 27 phenols and herbicides in water by high-performance liquid

chromatography with multielectrode electrochemical detection. **En:** Journal of Chromatography. Vol. 697 (**1995**); p. 357-362.

178. TURNES, M. I.; MEJUTO, M. C.; CELA, R. Determination of pentachlorophenol in water samples by capillary zone electrophoresis. **En:** Journal of chromatography A. Vol. 733 (**1996**); p. 395-404.

179. PUIG, D.; BARCELO, D. Determination of phenolic compounds in water and waste water. **En:** Trends in Analytical Chemistry. Vol. 15 (**1996**); p. 362-375.

180. MUNA, G. W.; QUAISEROVA-MOCKO, V.; SWAIN, G. M. Chlorinated Phenol Analysis Using Off-Line Solid-Phase Extraction and Capillary Electrophoresis Coupled with Amperometric Detection and a Boron-Doped Diamond Microelectrode. **En:** Anal. Chem. Vol. 77 (**2005**); p. 6542-6548.

181. MASSELTHER, S. M.; ZEMANN, A. J. Influence of organic solvents in coelectroosmotic capillary electrophoresis of phenols. **En:** Anal. Chem. Vol. 67. (**1995**); p. 1047-1053.

182. Técnicas Avanzadas en Química Ciencias Ambientales. Práctica 5. Determinación del Contenido Graso de Leche en Polvo: Extracción Soxhlet. 2004; p. 1-6. [Consultado: 30 de Marzo de **2010**]. [On-line]: www.profeonline.com/.../practico_soxhlet_grasa_leche_en_polvo.pdf -

183. ROMERO, M. T.; FERRER, N. Determination of oil and grease by solid phase extraction and infrared spectroscopy. **En:** Anal. Chim. Acta. Vol 395 (**1999**); p. 77-84.

184. LAU, S-L.; STENSTROM, M. K. Solid-Phase Extraction for Oil and Grease Analysis. **En:** Water Environment Research. Vol. 69 (1997); p. 368-374.
185. LOUCHOUARN, P.; BONNER, J. S.; TISSOT, P.; McDONALD, T. J. FULLER, C. Quantitative determination of oil films/slicks from water surfaces using a modified solid phase extraction (SPE) sampling method. **En:** Proceedings of the Twenty-third Arctic and Marine Oilspill Program (AMOP) Technical Seminar, Environment Canada, Ottawa, ON. Vol 1 (2000); p. 59-68.
186. SPARR. C.; BJORKLUND, E. Analytical-Scale Microwave-Assisted Extraction. **En:** J. of Chromatography A. Vol. 902 (2000); p. 227-250.
187. BRONDZ, I. Development of Fatty Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography, Gas Chromatography, and Related Techniques. **En:** Anal. Chim. Acta. Vol. 465 (2002); p. 1-37.
188. Organización de las Naciones Unidas (ONU). "Protocolo de Kioto".
[Consultado: 30 de Marzo de 2010].
[On-line]: http://unfccc.int/kyoto_protocol/items/2830.php.
189. DAGHBOUCHE, Y.; GARRIGUES, S.; MORALES, R.; DE LA GUARDIA, M. Evaluation of extraction alternatives for Fourier transform infrared spectrometric determination of oil and greases in water. **En:** Anal. Chim. Acta. Vol. 345 (1997); p. 161-171.
190. WELLS, M. J. M.; FERGURSON, D. M.; GREEN, J. C. Determination of oil and grease in waste water by solid-phase extraction. **En:** Analyst. Vol 120 (1995); p. 1715-1721.

191. MARTINEZ, A.; PRIETO, V. Metodología Técnico-Organizativa para el Estudio de las Contaminaciones por Hidrocarburos en Aguas. Centro Provincial de Higiene y Epidemiología Ciudad de La Habana. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. p. [Consultado: 3 de Abril de **2010**]. [On-line]: www.bvsde.paho.org/bvsaidis/aresidua/mexico/01299e08.pdf -

192. ARÉVALO, A. G. Evaluación de un Método por Espectroscopia UV-VIS para la Detección de Contaminantes Orgánicos en Agua. Universidad De San Carlos De Guatemala. Facultad De Ingeniería. Escuela De Ingeniería Química. Guatemala, octubre de **2006**.

193. KAWAHARA, F. K.; BURLINGTON, KY. US Patent 5294553. Method for the gravimetric determination of oil and grease, 1994. [Consultado: 5 de Abril de **2010**]. [On-line]: <http://www.patentstorm.us/patents/5294553/claims.html>.

194. BOJACA, R. Grasas y Aceites en Agua Extracción Líquido-Líquido y gravimetría. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – República de Colombia. **2007**, p. 2-8.

195. ROMERO, T.; FERRER.N. Determination of oil and grease by solid phase extraction and infrared spectroscopy. **En: Analytica Chimica Acta**. Vol 395 (**1999**); p. 77-84.

196. PISAL, A. Determination of Oil and Grease in Water with a Mid-Infrared Spectrometer. Pelkin Elmer, Inc. 2009. USA. p. 1-4.

197. MUNIATEGUI, S.; PASEIRO, P.; SIMAL, J. Medida del Grado de Instauración de Aceites y Grasas Comestibles por Espectroscopia Infrarroja y su Relación con el Índice de Yodo. Área de Nutrición y Bromatología. Departamento de Química

Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. **1992**. Universidad de Santiago de Compostela. España. 1-5.

198. ICONTEC. –NTC-ISO 5667-3. “Calidad del agua. Muestreo. Parte 3: para la preservación y manejo de muestras. Bogotá D. C. **2008**.

199. ICONTEC. –NTC-ISO 5667-14. “Calidad del agua. Muestreo. Parte 14: Guía para el control de la calidad en el muestreo y el manejo ambiental del agua. Bogotá D. C. **2008**.

200. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. PROGRAMA DE FISICOQUÍMICA AMBIENTAL. Protocolo: de toma y preservación de muestras. Bogotá: IDEAM, **1999**.

201. ICH. Guideline on Validation of Analytical Procedures; Methodology. November **1996**.

202. HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. En: Analytical Chemistry. Vol. 54 (**1982**); p. 67A-76A.

203. HORWITZ, W. Nomenclature for Sampling in Analytical Chemistry-Recommendations. En: IUPAC, Pure Appl. Chem. Vol. 62 (**1990**); p. 1193-1208.

204. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM. PROTOCOLO DE LA ESTANDARIZACION DE METODOS ANALITICOS. Bogotá, Noviembre de **1999**.

205. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM. REQUERIMIENTOS GENERALES PARA LA COMPETENCIA DE ANALISIS QUIMICOS. Bogotá, **1999**.

206. IUPAC recommendation: Nomenclature in evaluation of analytical methods, including quantification and detection capabilities. En: Pure and Applied Chem. Vol. 67 (1995). p. 1699-1723.

207. LONG, G. L; WINEFORDNER J. D. Report Limit of Detection. A Closer Look at the IUPAC Definition. En: Analytical Chemistry. Vol. 55 (1983); p. 712A-724A.

208. MILLER J. C. y MILLER J. N. "Estadística para química analítica". 4 ed. Delaware: Addison - Wesley Iberoamericana, 1993. p. 103-106.

209. MORALES, C. Desarrollo y Validación Prospectiva de una Técnica Analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg Tabletas Cubiertas. Lima. 2004, Trabajo de Postgrado (Farmacia y Bioquímica). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Química Farmacéutica.

210. ISO/IEC Guide 43 (1997). Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons. Part 1: Development and Operation of Proficiency Testing Schemes.

Part 2: Selection and Use of Proficiency Testing Schemes by Laboratory Accreditation Bodies.

211. AGUIAR, R., et al. Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean la técnica de espectrofotometría de ultravioleta- visible. En: Centro Nacional de Metrología & Entidad Mexicana de Acreditación. México (2004). p. 1-70.

212. EURACHEM GUIDE: The Fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to methods validation and related topics, LGC, Teddington. 1998. <URL: <http://www.eurachem.bam.de/index.htm>>

213. EURACHEM; "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement". www.measurementuncertainty.org/mu/guide/index.html.
214. FAO/IAEA. Validation of Analytical Methods for Food Control. En: FAO Food and Nutrition Paper. Vol. 68 (1998); p. 1-18.
215. FAO/WHO. Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling. In House Method Validation. Budapest, Hungary. 2001. p. 1-42.
216. QUINO, I.; RAMOS, O.; GUISBERT, E. Determinación del límite de detección instrumental (LDI) y límite de cuantificación instrumental (LCI) en elementos traza de agua subterránea. En: Rev. Bol. Quim. Vol. 24 (2007); p. 53-57.
217. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM. REQUERIMIENTOS GENERALES PARA LA COMPETENCIA DE ANALISIS QUIMICOS. Bogotá, 1999.
218. AGUIAR, R. Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean la técnica de gravimetría de masa. En: Centro Nacional de Metrología & Entidad Mexicana de Acreditación. México (2008). p. 1-51.
219. ICH. Harmonised Tripartite Guideline Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1994.

ANEXOS

Anexo 1. Lavado del material volumétrico u otros

❖ **Limpieza del material de vidrio.** Teniendo en cuenta la importancia de una estricta limpieza del material, en el desarrollo del procedimiento de análisis de nitratos, nitritos, fenoles y, aceites y grasas, todo el material de vidrio utilizado se sometió al siguiente procedimiento de limpieza:

- **Nitratos y nitritos**

1. Inicialmente, se lavó el material con abundante agua de grifo y una solución de extran neutro al 5%.
2. Se enjuagó nuevamente el material con suficiente agua del grifo.
3. Seguidamente, se sumergió el material en una solución de extran neutro al 5% dentro del ultrasonido y se puso en funcionamiento durante 30 minutos.
4. Se enjuagó con agua de grifo y se purgó tres veces con agua destilada.
5. Por último se dejó secar.
6. Se cubrió con papel transparente y se almacenó.

- **Fenoles**

1. Primeramente, el material se lavó con abundante agua del grifo y solución de extran neutro al 5%.
2. Se retiró el jabón con agua del grifo.
3. Posteriormente, el material se sumergió durante media hora en una mezcla sulfocrómica.
4. Se lavó con abundante agua del grifo y se purgó tres veces con agua destilada.

5. Finalmente, se dejó secar.
6. Se cubrió con papel transparente y se almacenó.

- **Aceites y grasas**

1. En primer lugar, el material se lavó con agua del grifo y varsol.
2. Se enjuagó con agua del grifo e inmediatamente se lavó con jabón extran neutro al 5%.
3. Se retiró el jabón con abundante agua del grifo.
4. Seguidamente, el material se sumergió en una mezcla sulfocrómica durante media hora.
5. Se enjuagó con agua del grifo y se purgó tres veces con agua destilada.
6. Se dejó secar y se purgó con n-hexano.
7. Se dejó secar nuevamente, se cubrió con papel transparente y se almacenó.

ANEXO 2. Verificación del material volumétrico aforado clase A tipo IN y EX

El proceso de calibrado en general se realizó empleando el método de calibración absoluta directa en el cual se determinó la masa del agua destilada de densidad conocida que está ya sea, contenida en el material volumétrico o vertida por este a una temperatura dada y calculando el volumen a partir de la masa y la densidad conocida. Esta calibración es trazable al sistema internacional de unidades ya que la medida de peso que sirvió para calcular la medida de volumen se obtuvo con una balanza calibrada con una pesa certificada. De esta manera la metodología se aplicó a todo material volumétrico en general (pipetas aforadas y graduadas, matraces aforados, probeta y erlenmeyer), empleado en los procesos de estandarización.

❖ **Procedimiento para la calibración del material volumétrico tipo IN.** La probeta, el erlenmeyer y los balones aforados se calibraron de acuerdo al volumen específico que contenían, por lo tanto se emplearon mediciones directas, para este fin se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se lavó y secó el material volumétrico a calibrar
2. Se taro la balanza con el material volumétrico a calibrar limpio y seco
3. Se midió la temperatura del agua destilada empleada en el proceso de calibración
4. Se lleno el material volumétrico con agua y se enrasó la hasta la marca del aforo

Nota: No hubo presencia de gotas de agua en el cuello.

5. Se pesó el material a calibrar lleno y enrasado (m)
6. Se repitió el procedimiento tres veces más.

❖ **Calibración del material volumétrico tipo EX.** Las pipetas graduadas y volumétricas se calibraron mediante el vaciado de un volumen específico de agua destilada, es decir empleando mediciones indirectas.

1. Se lavó y secó el material volumétrico
2. Se taro la balanza con el material volumétrico a calibrar limpio y seco
3. Se midió la temperatura del agua destilada empleada en el proceso de calibración
4. Se lleno la pipeta con agua destilada contenida en un vaso de precipitado y se enrasó la hasta la marca del aforo
5. Se secó la parte exterior de la pipeta con papel adsorbente
6. Se transfirió el volumen de agua total de la pipeta que se calibró al vaso de precipitado previamente pesado, para lo cual se vació la pipeta libremente hasta que cesó el flujo. Nota: El pequeño volumen que permaneció luego de este procedimiento en el pico de la pipeta no se soplo, debido a que fue tomado en cuenta en el calibrado original de la misma
7. Se pesó el material a calibrar (m)
8. Se repitió el procedimiento tres veces más.

❖ **Calculo del volumen del material calibrado.** Se calculó el volumen del material calibrado a partir del peso del agua contenido en dicho material y el valor apropiado (ver siguiente tabla), se empleó la posterior ecuación:

$$V = m_a \times \theta_{20}$$

El valor de θ_{20} se eligió de acuerdo a la temperatura de trabajo.

Volumen ocupado por 1,0000 g de agua pesado en aire utilizando pesas de acero inoxidable. Factor de corrección (θ^*) para el calibrado del material volumétrico

T(°C)	Densidad (g/mL)	Volumen de 1g de agua (mL)	
		Para T	Corregido a 20°C
10	0.9997026	1.0013	1.0016
11	0.9996084	1.0014	1.0016
12	0.9995004	1.0015	1.0017
13	0.9993801	1.0016	1.0018
14	0.9992474	1.0018	1.0019
15	0.9991026	1.0019	1.0020
16	0.9989460	1.0021	1.0022
17	0.9987779	1.0022	1.0023
18	0.9985986	1.0024	1.0025
19	0.9984082	1.0026	1.0026
20	0.9982071	1.0028	1.0028
21	0.9979955	1.0030	1.0030
22	0.9977735	1.0033	1.0032
23	0.9975415	1.0035	1.0034
24	0.9972995	1.0037	1.0036
25	0.9970479	1.0040	1.0037
26	0.9967867	1.0043	1.0041
27	0.9965162	1.0045	1.0043
28	0.9962365	1.0048	1.0046
29	0.9959478	1.0051	1.0048
30	0.9956502	1.0054	1.0052

(*) Corregido a 20°C, aplicando las correcciones debidas al empuje del aire desplazado (pesas de acero inoxidable) y a los cambios de volumen por efecto de la temperatura.

ANEXO 3. Preparación de soluciones usadas en los procesos de estandarización

PARÁMETRO	REACTIVO	PREPARACIÓN
Nitratos	Salicilato de sodio al 5% p/V	Se preparó disolviendo 5 g de salicilato de sodio en agua destilada y posteriormente se diluyó a 100 mL.
	Hidróxido sódico y de tartrato doble de sodio y potasio	Se disolvió 400g de NaOH y 60g de tartrato de sodio y potasio anhidro en agua destilada y cuando la solución estuvo a temperatura ambiente, se diluyó a 1L y se guardó la solución en un recipiente de polietileno.
Nitritos	Reactivo Combinado	Se añadió 100 mL de ácido fosfórico al 85% a aproximadamente 800 mL de agua, posteriormente se adicionó 10 g de sulfanilamida y se disolvió completamente. Se añadió 1 g de diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina, se mezcló y diluyó hasta 1L con agua destilada. Se almacenar la solución en frío en botella oscura.
Fenoles	Amoniaco 0,5 N	Se diluyó 35 mL de amoníaco concentrado en 1 L de agua.
	Ácido fosfórico (1:10)	Se diluyó 10 mL de ácido fosfórico en 100 mL de agua.
	Aminoantipirina (2% P/V)	Se pesó 2,0 g de 4-aminoantipirina y se disolvió en 100 mL de agua. Se preparó diariamente
	Ferricianuro de potasio (8 % P/V)	Se pesó 8,0 g de ferricianuro de potasio y se disolvió en 100 mL de agua. Se almacenó en un frasco de vidrio ámbar y se preparó cada semana.
Aceites y grasas	Suspensión de tierra de diatomea	Disolver 10 g de tierra de diatomeas en 1L de agua destilada

ANEXO 4. Evaluación del intervalo de respuesta lineal, de la linealidad y de la sensibilidad de los métodos espectrofotométricos

Se realizó a partir de los estimadores de la curva de calibración promedio obtenida para cada uno de los métodos: coeficiente de correlación (test estadístico de regresión), coeficiente de variación de los factores respuesta, pendiente (desviación estándar, desviación estándar relativa, límite de confianza y test estadístico de la pendiente) e intercepto (desviación estándar, desviación estándar relativa, límite de confianza y test estadístico del intercepto).

Los modelos lineales propuestos se expresaron como una ecuación de la forma:

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Señales de cada uno de los estándares analizados;

m = Pendiente de la curva de calibración promedio de cada método estandarizado;

x = Concentraciones de cada uno de los estándares analizados;

b = Intercepto de la curva de calibración promedio de cada método estandarizado.

❖ **Coefficiente de correlación.** El valor de t_r (test de regresión) con n-2 grados de libertad y un intervalo de confianza del 95% ($\alpha=0,05$), se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$t_r = |r|\sqrt{n-2} / \sqrt{1-r^2}$$

Donde:

r = Coeficiente de correlación;

r^2 = Coeficiente de determinación;

n = Número de replicas.

Se utilizaron las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula (H_0) : No existe correlación entre x e y ($r=0$);
- Hipótesis alterna (H_1): "r" No debe ser significativamente diferente de uno ($r \neq 0$).

El criterio de aceptación fue $t_r > t_{\text{tabla}}$, rechazándose la hipótesis nula y existiendo correlación lineal significativa entre las variables bajo estudio ($r \cong 1$).

❖ **Coeficiente de variación de los factores respuesta.** El coeficiente de variación de las respuestas (CVf) se calculó a partir de la relación entre las absorbancias y las concentraciones de cada uno de los estándares analizados y su cálculo se efectuó con base en la posterior ecuación:

$$\text{C.V.f} = \frac{y}{x}$$

❖ **Pendiente e intercepto.** Se determinó la desviación estándar relativa de la pendiente y del intercepto a través de las siguientes relaciones:

$$S_b\% = \left(\frac{S_b}{b} \right) \times 100\% \qquad S_a\% = \left(\frac{S_a}{a} \right) \times 100\%$$

Donde:

b = Valor de la pendiente;

s_b = Desviación estándar de la pendiente;

a = Valor del intercepto;

s_a = Desviación estándar del intercepto.

Para lo cual se requirió calcular previamente la desviación estándar de la pendiente y del intercepto de acuerdo a las expresiones:

$$s_{\frac{Y}{X}} = \sqrt{\frac{\sum_i [(Y_i) - \hat{Y}]^2}{n - 2}}$$

$$s_b = \frac{s_{\frac{Y}{X}}}{\sqrt{\sum_i [(X_i) - \bar{X}]^2}}$$
$$s_a = s_{\frac{Y}{X}} \sqrt{\frac{\sum_i X_i^2}{\sum_i (X_i - \bar{X})^2}}$$

Donde:

X_i = Concentración de analito;

\bar{X} = Promedio de la concentración de analito;

\hat{Y} = Residuo de la señal de analito;

n = Numero de determinaciones.

Inmediatamente se procedió a la determinación del test estadístico de la pendiente e intercepto, por medio de las siguientes ecuaciones:

$$t_{exp} = |b|/s_b \quad t_{exp} = |a|/s_a$$

Empleándose las siguientes hipótesis:

Pendiente:

- Hipótesis nula (Ho) : b es igual a cero (b=0);
- Hipótesis alterna (H1): b es significativamente diferente de cero (b≠0);

Intercepto:

- Hipótesis nula (Ho) : a tiene que ser cero (a=0);
- Hipótesis alterna (H1): a es significativamente diferente de cero (a≠0).

Se utilizó como criterio de aceptación para la pendiente que el valor de $t_{exp} > t_{tabla}$ a un nivel de significación de 0,05 y n-2 grados de libertad, rechazándose la hipótesis nula, siendo por lo tanto $b \neq 0$. Para el intercepto el criterio de aceptación fue el siguiente $t_{exp} < t_{tabla}$ por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula, concluyéndose que el intercepto es igual a cero.

Complementando este análisis se calculó el límite de confianza de la pendiente y el intercepto por medio de las ecuaciones, donde el valor calculado de la pendiente en el análisis de regresión debe encontrarse en dicho intervalo y el intervalo del intercepto debe incluir al cero.

$$b = b \pm t_{tabla} \cdot s_b \quad a = a \pm t_{tabla} \cdot s_a$$

Anexo 5. Evaluación de los límites de detección y cuantificación de métodos espectrofotométricos

El límite de detección de cada uno de los métodos espectrofotométricos analizados, se calcularon de acuerdo a la definición adoptada por la IUPAC. Estableciéndose que la concentración mínima detectable es distinguible con certeza del ruido de fondo, siempre y cuando la diferencia entre la señal del analito, de concentración muy baja, y la señal de los blancos de reactivos sea igual a tres veces la desviación estándar de la señal de los blancos, utilizados para medir el ruido de fondo. Es decir que:

$$y_L = \bar{y}_B \pm kS_B$$

Donde:

y_L = Señal del límite de detección;

\bar{y}_B = Promedio de la señal de los blancos;

s_B = Desviación estándar de los blancos;

k = Factor numérico cuyo valor está relacionado con el nivel de confianza, la IUPAC sugiere un valor de 3 a un nivel de confianza del 99,86 %.

Por otra parte, el límite de cuantificación corresponde a la cantidad o concentración de analito que proporciona una señal que es diez veces (k = 10) la desviación estándar del blanco siendo de esta manera confiable realizar determinaciones cuantitativas. Es así como los LDM y LCM de cada uno de los métodos desarrollados se determinan involucrando todos los factores que afectan la medida y se calculan en unidades de concentración, a través de las siguientes ecuaciones:

$$\text{LDM} = \frac{3s_B}{m_b} \qquad \text{LCM} = \frac{10s_B}{m_b}$$

Donde:

s_B = Desviación estándar de los blancos;

m_b = Pendiente de la curva de calibración del método, calculada a muy bajas concentraciones.

Anexo 6. Evaluación de la precisión de los métodos espectrofotométricos

La precisión se expresó matemáticamente a partir del cálculo de la dispersión de los datos respecto a la media a través de la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). [Velandia., 2008] Según Horwitz en la determinación de cualquier tipo de muestra, la precisión del método analítico se considera aceptable cuando su coeficiente de variación experimental es inferior al valor de coeficiente de Horwitz (CV_H) calculado, para lo anterior se emplearon las siguientes fórmulas:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}; \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}; \quad \% CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100\%; \quad \% CV_H = 2^{(1-0,51 \log C)}$$

Donde:

\bar{X} = Valor promedio;

X_i = Valor parámetro (absorbancia o concentración);

- n = Numero de mediciones;
- S = Desviación estándar;
- CV = Coeficiente de variación (%);
- CV_H = Coeficiente de variación de horwitz (%);
- C = Concentración de la muestra expresada como potencia de 10
(1 ppb=10⁹; 1 ppm = 10⁻⁶; 1%=10⁻²; 10%= 10⁻¹; etc).

También fue necesario calcular el intervalo de confianza de la media para cada nivel de concentración estudiado, dentro del cual se supone de manera razonable que se encuentra el valor verdadero de la medición. Esto se realizó a través de la prueba estadística t student y aplicando la siguiente ecuación:

$$I.C = \bar{X} \pm \frac{t_{\text{tabla}} \cdot S}{\sqrt{n}}$$



Donde:

- \bar{X} = Promedio de la concentración de analito;
- t_{tabla} = Valor encontrado en la tabla de la distribución de student con las siguientes condiciones: n-1 grados de libertad y probabilidad de cometer erro (p) de 0,05 es decir un grado de confianza del 95%;
- S = Desviación estándar de las mediciones;
- n = Numero de mediciones.

Anexo 7. Evaluación de la exactitud de los métodos espectrofotométricos

La evaluación estadística de la exactitud por el método de recuperación de cada uno de los métodos estandarizados, se realizó a partir de la determinación de los siguientes criterios estadísticos:

- ❖ **Calculo del porcentaje de recuperación de cada concentración.** La exactitud se expresó como porcentajes de recuperación de las concentraciones obtenidas en cada uno de los métodos analíticos estudiados, comparándose con el correspondiente porcentaje de concentración teórica adicionada. Los porcentajes de recuperación de los niveles de concentración analizados, se calcularon a partir de la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{C_{M+A} - C_M}{C_A} \times 100\%$$



Donde:

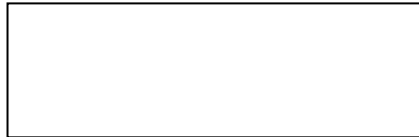
C_{M+A} = Concentración de la muestra más el patrón añadido;

C_M = Concentración inicial de la muestra;

C_A = Concentración del patrón añadido.

❖ **Cálculo del porcentaje de t student.** El cálculo del porcentaje de t Student fue necesario para confirmar que el valor medio (recuperación promedio) no difiere significativamente del aceptado como referencia. Para esto se empleó la posterior formula donde se halló el t experimental (t_{exp}):

$$t_{exp} = \frac{|100 - R|}{CV} \times \sqrt{n}$$



Donde:

R = Recuperación promedio;

n = Numero de muestras;

CV = Coeficiente de variación de la precisión intermedia.

Empleándose las siguientes hipótesis:

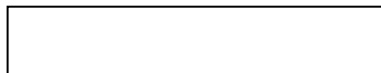
- Hipótesis nula (H_0) : No existe diferencia significativa entre la recuperación promedio y el 100 %;
- Hipótesis alterna (H_1): La recuperación promedio es significativamente diferente al 100% de recuperación.

Se utilizó como criterio de aceptación $t_{exp} > t_{tabla}$ confirmando la hipótesis nula y por lo tanto la exactitud de los métodos.

ANEXO 8. Estimación de la incertidumbre de los métodos espectrofotométricos

- ❖ **Modelo matemático del mesurando.** Los cálculos involucrados en la medición de la concentración de nitratos, nitritos y compuestos fenólicos están descritos mediante la siguiente relación:

$$Y_{X_i} = Y_{(X-B)} * fd_n * fc$$



Donde:

Y_{X_i} = Concentración del mesurando obtenida a partir de la aplicación de un método de medición;

$Y_{(X-B)}$ = Concentración del mesurando obtenida a través de las respectivas curvas de calibración;

fd_n = Factor de dilución con $n = 1, 2, 3, \dots, n$;

fc = Factor de corrección.

- ❖ **Cuantificación de las fuentes de incertidumbre estándar.**

- ✓ **Incertidumbre estándar de la curva de calibración.** A continuación, se describe la manera en que se calcularon las diversas fuentes que contribuyeron en la incertidumbre estándar de las curvas de calibración, de cada uno de los métodos estandarizados en el presente trabajo:
- **Incertidumbre estándar debida al MRC.** Para el cálculo de la incertidumbre estándar de los MRC utilizados para realizar las respectivas curvas de calibración en los diferentes métodos estudiados, se utilizó la siguiente ecuación, en donde se consideró la incertidumbre que se reporta en los certificados de los MCR, debido a que dicho certificado incluye el factor de cobertura k ($\sqrt{3}$) se asumió que se trata de una distribución normal.

139

$$U_{Y_{MRC}} = \frac{U_{cert}}{\sqrt{3}}$$

Mientras la incertidumbre estándar relativa se obtuvo dividiendo la incertidumbre estándar por el valor de concentración del material de referencia certificado.

$$U_{Y_{MRC}} = \frac{U_{Y_{MRC}}}{C_{MRC}}$$

- **Incertidumbre estándar debida a la respuesta del instrumento.** La incertidumbre estándar de la concentración de masa del analito (NO_3^- , NO_2^- y CF) medido “ y ”, mediante la respuesta del instrumento (α) se calculó mediante la posterior fórmula:

$$u_{\gamma(x)} = \frac{s}{b_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\gamma_{(x)i} - \bar{\gamma}_{MRC})^2}{S_{xx}}}$$

Donde:

$u_{\gamma(x)}$ = Incertidumbre del mesurando obtenida por el instrumento calibrado;

s = Desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal;

b_1 = Pendiente de la recta;

p = Número de réplicas de la muestra en estudio;

n = Número de disoluciones empleados en la curva de calibración multiplicado por el número de réplicas de cada disolución, total de datos (ij);

$\gamma_{(x)i}$ = Concentración de masa (mg/L) en estudio;

$\bar{\gamma}_{MRC}$ = Promedio de las concentraciones de masa de las disoluciones empleadas en la curva de calibración;

S_{xx} = Suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas.

A su vez la desviación estándar residual y la suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas se calcularon a partir de las siguientes ecuaciones:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (\alpha_j - \bar{\alpha})^2}{n - 2}}$$



Donde:

s = Desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal;

α_j = Las "i" lecturas observadas correspondientes a γ_{iMRC} conocidas con las que se calibró el instrumento;

\bar{c} = Las "i" lecturas ajustadas correspondientes a γ_{iMRC} conocidas del instrumento en la curva de calibración;

n = Número total de datos (ij).

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (\gamma_i - \bar{\gamma})^2$$



Donde:

S_{xx} = Suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas por la curva de calibración;

γ_i = Concentración de masa de cada i disolución de referencia (MRC) empleadas en la curva de calibración;

$\bar{\gamma}$ = Promedio de las concentraciones de masa de las disoluciones de referencias empleadas en cada uno de los puntos de la curva de calibración.

✓ **Incertidumbre estándar debida a las disoluciones de los estándares de trabajo.** La determinación de la incertidumbre estándar debida a las disoluciones de los estándares de trabajo para cada método, comprendió los factores de dilución (primer y segundo factor de dilución) de la curva de calibración y la incertidumbre del material volumétrico empleado en dicho ensayo. El tipo de distribución del factor de dilución es normal y le corresponde una evaluación tipo A.

• **Incertidumbre estándar debida al material volumétrico.** La determinación de la incertidumbre estándar debido al material volumétrico clase A, involucró el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el proceso de

ANEXO 9. Respuestas del instrumento obtenidas para cada ensayo de intervalo de linealidad del método de cuantificación de nitratos en aguas naturales por UV/VIS

Concentración	Respuesta del instrumento (absorbancia)				
	(mg/L)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4
1,0	0,296	0,292	0,298	0,299	0,287
2,0	0,589	0,587	0,593	0,584	0,589
3,0	0,877	0,883	0,876	0,889	0,889
4,0	1,169	1,167	1,178	1,165	1,162
5,0	1,464	1,454	1,470	1,452	1,460
6,0	1,746	1,759	1,744	1,757	1,755
7,0	2,047	2,039	2,046	2,038	2,039
8,0	2,331	2,335	2,342	2,332	2,336
9,0	2,623	2,629	2,635	2,643	2,645
10,0	2,925	2,919	2,922	2,915	2,919
Pendiente	0,2914	0,2916	0,2916	0,2914	0,2924
Intercepto	0,0039	0,0025	0,0065	0,0042	6,7x10-5
Coef. correlación	0,9999	0,9999	0,9999	0,9997	0,9999
Coef.determinación	0,9999	0,9999	0,9999	0,9998	0,9999

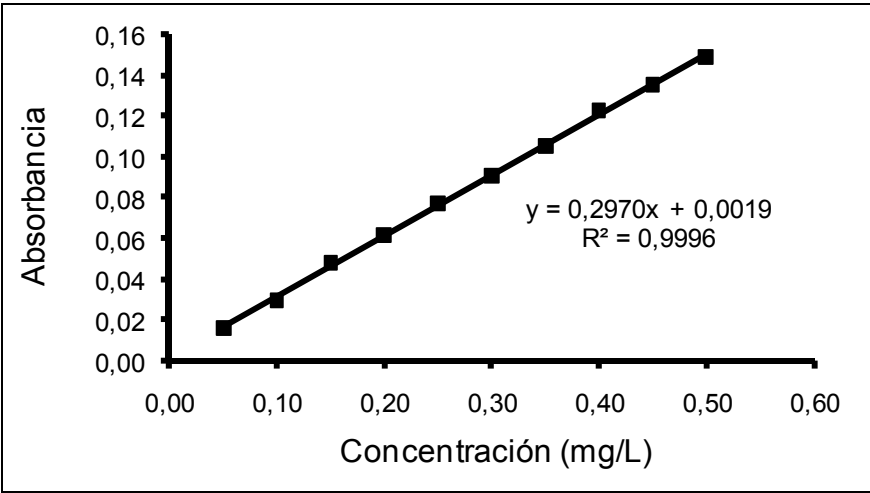
ANEXO 10. Resultados de los de los blancos de reactivos para la determinación del límite de detección y de cuantificación del método de cuantificación de nitratos en aguas naturales por UV/VIS

Experimento	Concentración (mg/L)	Experimento	Concentración (mg/L)	Experimento	Concentración (mg/L)
1	0,024	11	0,024	21	0,023
2	0,024	12	0,024	22	0,022
3	0,021	13	0,023	23	0,022
4	0,024	14	0,021	24	0,022
5	0,024	15	0,023	25	0,02
6	0,024	16	0,021	26	0,021
7	0,021	17	0,024	27	0,024
8	0,021	18	0,024	28	0,021
9	0,024	19	0,021	29	0,02
10	0,021	20	0,022	30	0,024

ANEXO 11. Respuestas del instrumento obtenidas para cada ensayo del intervalo de linealidad del método de cuantificación de nitratos en aguas naturales a bajas concentraciones por UV/VIS

Concentración (mg/L)	Respuesta del instrumento (Absorbancia)				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5
0,05	0,015	0,017	0,016	0,016	0,016
0,10	0,030	0,032	0,030	0,031	0,029
0,15	0,047	0,050	0,048	0,048	0,048
0,20	0,064	0,060	0,065	0,062	0,061
0,25	0,079	0,079	0,075	0,074	0,076
0,30	0,088	0,092	0,094	0,090	0,092
0,35	0,106	0,109	0,101	0,105	0,103
0,40	0,123	0,126	0,123	0,122	0,119
0,45	0,135	0,140	0,132	0,134	0,133
0,50	0,147	0,155	0,148	0,148	0,149
Pendiente	0,2933	0,2933	0,2910	0,2919	0,2886
Intercepto	0,0029	0,029	0,0031	0,0029	0,0037
Coef. correlación	0,9988	0,9988	0,9981	0,9996	0,9997
Coef. determinación	0,9977	0,9977	0,9961	0,9993	0,9993

ANEXO 12. Curva de calibración promedio a bajas concentraciones del método de determinación de nitratos en aguas naturales, para la determinación del límite de detección y de cuantificación del método por UV/VIS



ANEXO 13. Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método para determinar nitratos en aguas naturales a bajas concentraciones por UV/VIS

Intervalo de respuesta lineal del método a bajas concentraciones				
Concentración (mg/L)	Absorbancia Promedio	Desviación Estándar (10^{-4})	Coefficiente variación(%)	Factores repuesta (y/x)
0,05	0,016	7,07	4,42	0,32
0,10	0,030	1,14	3,75	0,30
0,15	0,048	1,10	2,27	0,32
0,20	0,062	2,07	3,32	0,31
0,25	0,077	2,30	3,01	0,31
0,30	0,091	2,28	2,50	0,30
0,35	0,105	3,03	2,89	0,30
0,40	0,123	2,51	2,05	0,31
0,45	0,135	3,11	2,31	0,30
0,50	0,149	3,21	2,15	0,30

Linealidad y sensibilidad del método a bajas concentraciones		
Parámetro	Valor experimental	Criterio de aceptación
Ecuación de la recta	$y = 0,2970x + 0,0019$	$y = mx + b$
Coefficiente de correlación (r)	0,9996	$\geq 0,990$
Coefficiente de determinación (r^2)	0,9991	$\geq 0,980$
Prueba estadística para r	399,94	$t_{exp} > t (p:0,05; n-2) = 2,31$
Promedio de los factores respuesta	0,31	-
DESVEST de los factores repuesta	$8,15 \times 10^{-4}$	-
CVf (%)	2,65%	$CVf \leq 5\%$
Pendiente (b)	0,2970	-

Desviación estándar de b	9,36 x 10 ⁻⁴	-
Desviación estándar relativa de b (Sbrel (%))	1,02%	Sbrel ≤ 2%
Intervalo de confianza de b	0,2900 a 0,3039	Excluye el valor de cero
Prueba estadística t para b	98,47	texp > t (p:0,05; n-2) = 2,31
Intercepto (a)	0,0019	-
Desviación estándar de a	3,02 x 10 ⁻³	-
Desviación estándar relativa de a (Sarel (%))	49,47 %	-
Intervalo de confianza de a	-0,00022 a 0,0041	Debe incluir el cero
Prueba estadística para a	1,53	texp < t (p:0,05; n-2)= 2,31

ANEXO 14. Resultados de la precisión del sistema en la determinación de nitratos por UV/VIS

Precisión del sistema						
Experimento	Repetibilidad del sistema			Precisión intermedia del sistema		
	Niveles de concentración					
	2 mg/L	5 mg/L	8 mg/L	2 mg/L	5 mg/L	8 mg/L
1	1,996	4,993	7,985	2,002	4,999	7,998
2	1,979	5,003	7,998	1,975	5,002	7,994
3	1,999	4,997	7,992	1,992	4,979	7,989
4	1,985	4,983	7,981	2,002	4,999	8,002
5	1,989	5,004	7,992	1,982	4,992	7,992
6	2,004	4,990	7,985	1,975	5,002	8,002
7	1,985	4,993	7,991	1,969	4,991	7,981
8	2,002	4,999	7,980	1,982	4,985	7,983
9	1,979	4,995	7,981	1,996	5,001	7,997
10	1,982	4,984	7,985	1,989	4,993	7,985
11	1,996	5,003	7,979	1,972	4,985	7,979
12	1,999	4,987	8,005	2,002	5,003	7,982
13	1,985	4,989	7,989	1,989	4,98	7,976
14	1,998	5,002	7,988	1,973	4,994	7,981
15	1,982	4,988	7,986	2,001	4,981	7,985
16	1,989	4,997	8,001	1,992	4,992	7,999
17	1,992	4,993	7,995	1,985	4,989	7,984

18	1,985	4,984	7,998	2,001	4,995	7,991
19	1,996	4,997	7,989	1,999	4,999	8,002
20	1,999	4,999	7,991	1,978	4,979	7,977
21	1,980	4,992	7,992	1,985	4,995	8,003
22	1,996	4,989	8,002	1,999	4,984	7,998
23	1,989	4,995	7,992	1,985	4,998	7,984
24	1,999	5,002	7,989	1,982	4,993	7,987
25	1,996	4,981	8,002	2,002	4,981	7,998
26	1,999	4,985	7,994	1,978	4,984	7,988
27	1,996	4,988	7,998	2,000	4,994	7,991
28	1,985	4,998	8,002	1,996	4,987	7,986
29	1,978	4,981	7,995	1,979	4,999	7,999
30	1,991	4,987	8,005	1,992	5,001	8,002

148

ANEXO 15. Resultados de la repetibilidad del método en la determinación de nitratos por UV/VIS

Repetibilidad del método			
Experimento	Niveles de concentración		
	2 mg/L	5 mg/L	8 mg/L
1	1,982	4,975	7,981
2	1,969	4,968	8,012
3	1,978	5,002	7,980
4	1,968	5,019	7,985
5	1,958	4,995	7,998
6	1,965	4,968	7,971
7	1,972	5,005	7,962
8	1,985	4,988	8,005
9	1,951	5,009	7,964
10	1,948	4,978	7,983
11	1,968	5,010	7,995
12	1,961	4,999	7,985
13	1,989	4,982	7,974
14	1,958	5,005	7,991
15	1,948	5,009	7,981
16	1,961	4,985	7,963
17	1,982	5,012	8,009
18	1,999	4,992	7,991
19	1,974	4,971	7,998
20	1,958	4,999	7,984
21	1,975	5,015	7,986
22	1,985	4,981	8,009
23	1,951	4,992	7,964
24	1,989	5,012	8,009
25	1,975	4,974	7,991
26	1,994	4,988	7,987
27	1,982	5,012	8,010
28	1,967	4,994	7,980
29	1,971	4,989	7,988

30

1,993

4,984

8,014

ANEXO 16. Resultados de la precisión intermedia y exactitud del método en la determinación de nitratos por UV/VIS.

Precisión intermedia y exactitud del método										
Niveles de concentración										
Nº Muestra	Concentración Muestra (mg/L)	2 mg/L			5 mg/L			8 mg/L		
		Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	% R	Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	%R	Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	% R
1	0,152	1,830	1,961	98,87	4,850	4,975	99,44	7,850	8,009	100,08
2	1,021	0,930	1,937	98,52	3,980	5,019	100,46	6,980	8,012	100,16
3	0,728	1,250	1,978	100,03	4,270	5,026	100,66	7,270	7,957	99,44
4	0,478	1,490	1,941	98,17	4,520	5,043	101,23	7,520	7,937	99,18
5	0,618	1,340	1,972	101,01	4,380	4,995	99,94	7,380	8,029	100,42
6	0,275	1,690	1,937	98,36	4,730	4,944	98,71	7,730	7,961	99,43
7	0,452	1,520	1,972	99,97	4,550	5,005	100,08	7,550	7,882	98,41
8	0,345	1,640	2,012	101,69	4,660	4,954	98,91	7,660	7,940	99,15
9	0,711	1,240	1,927	98,06	4,290	5,023	100,50	7,290	7,974	99,63
10	0,368	1,580	1,941	99,54	4,630	4,968	99,35	7,630	7,971	99,64
11	0,618	1,350	1,968	100,01	4,380	5,040	101,42	7,380	8,029	100,42
12	0,351	1,600	1,982	101,93	4,650	4,995	99,88	7,650	8,022	100,28
13	0,949	1,040	1,978	98,98	4,050	4,964	99,14	7,050	7,871	98,19
14	0,429	1,529	1,958	99,99	4,570	5,047	101,12	7,570	8,060	100,81
15	0,454	1,490	1,920	98,40	4,550	4,999	99,88	7,550	8,015	100,15

ANEXO 16. Resultados de la precisión intermedia y exactitud del método en la determinación de nitratos por UV/VIS.

Precisión intermedia y exactitud del método										
Niveles de concentración										
Nº Muestra	Concentración Muestra (mg/L)	2 mg/L			5 mg/L			8 mg/L		
		Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	% R	Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	%R	Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	% R
16	0,651	1,310	1,975	101,07	4,350	4,944	98,68	7,350	8,098	101,32
17	0,392	1,590	2,011	101,93	4,610	5,019	100,37	7,610	8,009	100,09
18	0,549	1,450	1,985	99,05	4,450	4,978	99,53	7,450	7,947	99,30
19	0,333	1,621	1,954	100,02	4,670	4,964	99,17	7,670	7,998	99,94
20	0,128	1,820	1,924	98,66	4,870	4,999	100,01	7,880	7,954	99,31
21	0,205	1,770	2,006	101,74	4,800	5,005	100,01	7,800	8,019	100,18
22	0,244	1,740	1,978	99,68	4,760	4,981	99,53	7,760	7,988	99,79
23	0,231	1,720	1,951	100,00	4,770	4,992	99,81	7,770	8,043	100,54
24	0,158	1,830	2,010	101,72	4,840	5,012	100,30	7,850	8,002	99,92
25	0,185	1,790	1,944	98,27	4,820	4,954	98,94	7,820	7,998	99,91
26	0,183	1,770	1,985	101,82	4,820	4,985	99,62	7,820	7,947	99,28
27	0,212	1,770	1,951	98,25	4,790	5,012	100,22	7,790	8,026	100,30
28	0,189	1,759	1,948	99,97	4,810	4,957	99,14	7,810	8,015	100,21
29	0,230	1,740	1,954	99,10	4,770	4,985	99,68	7,770	7,947	99,32
30	0,275	1,700	1,985	100,60	4,730	5,016	100,23	7,730	8,033	100,36

ANEXO 17. Respuestas del instrumento obtenidas para cada ensayo de intervalo de linealidad del método de cuantificación de nitritos en aguas naturales por UV/VIS.

Concentración (mg/L)	Respuesta del instrumento (absorbancia)				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5
0,10	0,292	0,294	0,292	0,293	0,293
0,20	0,584	0,585	0,583	0,584	0,584
0,30	0,875	0,878	0,873	0,877	0,876
0,40	1,167	1,169	1,166	1,170	1,168
0,50	1,458	1,461	1,456	1,460	1,456
0,60	1,748	1,752	1,753	1,756	1,749
0,70	2,038	2,044	2,035	2,047	2,045
0,80	2,329	2,338	2,323	2,329	2,338
0,90	2,625	2,634	2,614	2,632	2,626
Pendiente	2,9123	2,922	2,903	2,9195	2,9188
Intercepto	0,0012	0,0005	0,0034	0,0011	2,7778x10 ⁻⁵
Coef. correlación	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Coef.determinación	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

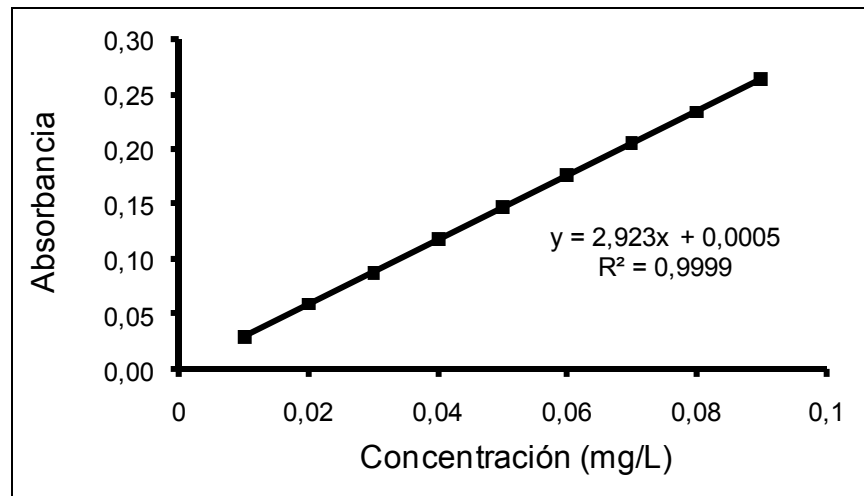
ANEXO 18. Resultados de los de los blancos de reactivos para la determinación del límite de detección y de cuantificación del método de cuantificación de nitritos en aguas naturales por UV/VIS

Experimento	Concentración (mg/L)	Experimento	Concentración (mg/L)	Experimento	Concentración (mg/L)
1	0,000	11	0,001	21	0,002
2	0,000	12	0,001	22	0,001
3	0,001	13	0,001	23	0,001
4	0,001	14	0,002	24	0,001
5	0,001	15	0,001	25	0,000
6	0,000	16	0,001	26	0,001
7	0,001	17	0,000	27	0,001
8	0,000	18	0,001	28	0,001
9	0,000	19	0,001	29	0,001
10	0,001	20	0,001	30	0,001

ANEXO 19. Respuestas del instrumento obtenidas para cada ensayo del intervalo de linealidad del método de cuantificación de nitritos en aguas naturales a bajas concentraciones por UV/VIS

Concentración (mg/L)	Respuesta del instrumento (Absorbancia)				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5
0,01	0,029	0,029	0,029	0,029	0,030
0,02	0,059	0,058	0,059	0,060	0,059
0,03	0,089	0,086	0,087	0,088	0,088
0,04	0,119	0,117	0,117	0,119	0,119
0,05	0,149	0,146	0,148	0,147	0,148
0,06	0,177	0,174	0,177	0,179	0,175
0,07	0,205	0,203	0,206	0,205	0,206
0,08	0,236	0,233	0,234	0,235	0,233
0,09	0,265	0,260	0,263	0,263	0,264
Pendiente	2,942	2,900	2,932	2,925	2,917
Intercepto	0,00005	0,0001	$8,333 \times 10^{-5}$	0,0010	0,0011
Coef. correlación	0,9999	0,9999	0,9999	0,9998	0,9999
Coef. determinación	0,9999	0,9999	0,9998	0,9999	0,9998

ANEXO 20. Curva de calibración promedio a bajas concentraciones del método de determinación de nitritos en aguas naturales, para la determinación del límite de detección y de cuantificación del método por UV/VIS



ANEXO 21. Evaluación del intervalo de respuesta lineal, de la linealidad y de la sensibilidad del método para determinar nitritos en aguas naturales a bajas concentraciones por UV/VIS

Intervalo de respuesta lineal del método a bajas concentraciones				
Concentración (mg/L)	Absorbancia Promedio	Desviación Estándar (10^{-3})	Coefficiente variación(%)	Factores repuesta (y/x)
0,01	0,029	0,45	1,532	2,92
0,02	0,059	0,71	1,198	2,95
0,03	0,088	1,14	1,302	2,92
0,04	0,118	1,10	0,927	2,96
0,05	0,148	1,14	0,772	2,95
0,06	0,176	1,95	1,105	2,94
0,07	0,205	1,23	0,597	2,93
0,08	0,234	1,30	0,557	2,93
0,09	0,263	1,87	0,711	2,92

Linealidad y sensibilidad del método a bajas concentraciones		
Parámetro	Valor experimental	Criterio de aceptación
Ecuación de la recta	$y = 2,923x + 0,0005$	$y = mx + b$
Coefficiente de correlación (r)	0,9999	$\geq 0,990$
Coefficiente de determinación (r^2)	0,9999	$\geq 0,980$
Prueba estadística para r	187,07	$t_{exp} > t (p:0,05; n-2) = 2,36$
Promedio de los factores respuesta	2,94	-
DESVEST de los factores repuesta	0,014	-
CVf (%)	0,49 %	$CVf \leq 5\%$
Pendiente (b)	2,923	-
Desviación estándar de b	$8,10 \times 10^{-3}$	-
Desviación estándar relativa de b (Sbrel (%))	0,28 %	$Sbrel \leq 2\%$
Intervalo de confianza de b	2,904 a 2,942	Excluye el valor de cero
Prueba estadística t para b	360,91	$t_{exp} > t (p:0,05; n-2) = 2,36$
Intercepto (a)	0,0005	-
Desviación estándar de a	$4,56 \times 10^{-4}$	-
Desviación estándar relativa de a (Sarel (%))	84,57 %	-
Intervalo de confianza de a	-0,0005 a 0,0016	Debe incluir el cero
Prueba estadística para a	1,18	$t_{exp} < t (p:0,05; n-2) = 2,36$

ANEXO 22. Resultados de la precisión del sistema en la determinación de nitritos por UV/VIS

Precisión del sistema						
Experimento	Repetibilidad del sistema			Precisión intermedia del sistema		
	Niveles de concentración					
	0,2 mg/L	0,5 mg/L	0,8 mg/L	0,2 mg/L	0,5 mg/L	0,8 mg/L
1	0,200	0,496	0,788	0,200	0,496	0,798
2	0,199	0,493	0,796	0,199	0,493	0,795
3	0,199	0,493	0,796	0,200	0,494	0,798
4	0,200	0,491	0,790	0,199	0,496	0,798
5	0,199	0,491	0,792	0,200	0,497	0,798
6	0,200	0,494	0,794	0,199	0,492	0,791
7	0,199	0,493	0,791	0,200	0,494	0,802
8	0,199	0,495	0,796	0,199	0,497	0,802
9	0,200	0,491	0,793	0,199	0,495	0,798
10	0,200	0,495	0,793	0,200	0,492	0,802
11	0,200	0,496	0,792	0,199	0,496	0,791
12	0,199	0,492	0,785	0,199	0,497	0,802
13	0,200	0,495	0,790	0,199	0,495	0,802
14	0,200	0,496	0,788	0,199	0,493	0,788
15	0,199	0,496	0,791	0,199	0,497	0,791
16	0,199	0,494	0,796	0,200	0,496	0,795
17	0,200	0,494	0,793	0,199	0,492	0,802
18	0,200	0,495	0,795	0,199	0,497	0,795
19	0,199	0,496	0,794	0,200	0,496	0,802
20	0,200	0,495	0,796	0,199	0,494	0,791
21	0,200	0,493	0,796	0,200	0,493	0,798
22	0,199	0,491	0,787	0,200	0,496	0,798
23	0,200	0,492	0,795	0,200	0,498	0,795
24	0,200	0,493	0,796	0,199	0,494	0,795
25	0,200	0,492	0,793	0,200	0,495	0,798
26	0,199	0,491	0,790	0,200	0,498	0,795
27	0,200	0,493	0,791	0,199	0,494	0,791
28	0,199	0,492	0,795	0,199	0,496	0,795
29	0,200	0,493	0,793	0,200	0,497	0,791

30	0,199	0,494	0,796	0,200	0,494	0,795
----	-------	-------	-------	-------	-------	-------

ANEXO 23. Resultados de la repetibilidad del método en la determinación de nitritos por UV/VIS

Repetibilidad del método			
Experimento	Niveles de concentración		
	0,2 mg/L	0,5 mg/L	0,8 mg/L
1	0,199	0,499	0,791
2	0,201	0,499	0,799
3	0,200	0,495	0,788
4	0,201	0,498	0,790
5	0,199	0,501	0,792
6	0,198	0,499	0,795
7	0,199	0,497	0,789
8	0,200	0,499	0,800
9	0,198	0,501	0,797
10	0,200	0,500	0,800
11	0,200	0,501	0,792
12	0,199	0,495	0,796
13	0,200	0,499	0,793
14	0,200	0,497	0,791
15	0,199	0,501	0,799
16	0,199	0,499	0,789
17	0,199	0,496	0,792
18	0,200	0,498	0,797
19	0,199	0,500	0,791
20	0,200	0,498	0,787
21	0,198	0,497	0,793
22	0,199	0,496	0,789
23	0,200	0,494	0,795
24	0,200	0,501	0,799
25	0,200	0,499	0,791
26	0,202	0,495	0,797
27	0,198	0,499	0,796
28	0,201	0,495	0,789

29	0,199	0,499	0,788
30	0,199	0,496	0,793

Anexo 24. Resultados de la precisión intermedia y exactitud del método en la determinación de nitritos por UV/VIS

Precisión intermedia y exactitud del método										
Niveles de concentración										
N° Muestra	Concentración Muestra (mg/L)	0,02 mg/L			0,05 mg/L			0,08 mg/L		
		Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	% R	Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	%R	Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	% R
1	0,021	0,179	0,201	100,33	0,479	0,503	100,73	0,779	0,800	100,03
2	0,024	0,176	0,200	99,94	0,476	0,498	99,51	0,776	0,797	99,68
3	0,053	0,147	0,199	99,46	0,447	0,504	100,86	0,747	0,804	100,54
4	0,080	0,157	0,200	99,93	0,457	0,497	99,26	0,757	0,800	100,03
5	0,034	0,166	0,200	99,73	0,466	0,500	100,00	0,766	0,800	99,94
6	0,028	0,172	0,199	99,54	0,472	0,498	99,58	0,772	0,785	98,03
7	0,046	0,154	0,199	99,26	0,454	0,502	100,44	0,754	0,801	100,08
8	0,033	0,167	0,199	99,12	0,467	0,498	99,50	0,767	0,806	100,75
9	0,026	0,174	0,199	99,55	0,474	0,501	100,21	0,774	0,803	100,34
10	0,051	0,149	0,200	99,93	0,449	0,496	99,17	0,749	0,799	99,89
11	0,034	0,166	0,202	101,18	0,466	0,503	100,64	0,766	0,800	100,03
12	0,019	0,181	0,201	100,70	0,481	0,500	99,94	0,781	0,805	100,60
13	0,038	0,162	0,199	99,51	0,462	0,503	100,76	0,762	0,800	100,03
14	0,025	0,175	0,200	100,14	0,475	0,498	99,58	0,775	0,796	99,46
15	0,017	0,183	0,199	99,38	0,483	0,500	100,01	0,783	0,789	98,63

ANEXO 24. Resultados de la precisión intermedia y exactitud del método en la determinación de nitritos por UV/VIS

Precisión intermedia y exactitud del método										
Niveles de concentración										
Nº Muestra	Concentración Muestra (mg/L)	0,02 mg/L			0,05 mg/L			0,08 mg/L		
		Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	% R	Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	%R	Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	% R
16	0,019	0,181	0,200	99,75	0,481	0,497	99,44	0,781	0,802	100,21
17	0,068	0,132	0,201	100,96	0,432	0,502	100,49	0,732	0,808	101,11
18	0,043	0,157	0,200	99,72	0,457	0,499	99,86	0,757	0,790	98,63
19	0,042	0,158	0,199	99,28	0,458	0,498	99,64	0,758	0,804	100,57
20	0,018	0,182	0,200	99,94	0,482	0,504	100,80	0,782	0,800	100,03
21	0,120	0,163	0,202	100,99	0,463	0,487	97,19	0,763	0,801	100,08
22	0,015	0,185	0,201	100,32	0,485	0,502	100,44	0,785	0,791	98,85
23	0,014	0,186	0,200	99,94	0,486	0,495	98,97	0,786	0,790	98,68
24	0,037	0,163	0,200	99,73	0,463	0,500	100,00	0,763	0,792	98,91
25	0,020	0,180	0,201	100,71	0,480	0,497	99,38	0,780	0,800	99,99
26	0,014	0,186	0,201	100,50	0,486	0,495	98,97	0,786	0,788	98,42
27	0,016	0,184	0,199	99,20	0,484	0,504	100,79	0,784	0,786	98,24
28	0,031	0,169	0,198	98,92	0,469	0,496	99,06	0,769	0,808	101,10
29	0,046	0,154	0,199	99,04	0,454	0,498	99,49	0,754	0,801	100,08
30	0,038	0,162	0,199	99,30	0,462	0,501	100,24	0,762	0,800	100,03

ANEXO 25. Respuestas del instrumento obtenidas para cada ensayo de intervalo de linealidad del método de cuantificación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales por UV/VIS

Concentración (mg/L)	Respuesta del instrumento (absorbancia)				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5
0,20	0,027	0,026	0,026	0,026	0,026
0,30	0,039	0,039	0,038	0,039	0,039
0,40	0,053	0,052	0,053	0,054	0,053
0,50	0,067	0,065	0,067	0,067	0,066
0,60	0,079	0,078	0,078	0,080	0,079
0,70	0,093	0,092	0,091	0,093	0,092
0,80	0,105	0,104	0,104	0,106	0,105
0,90	0,118	0,117	0,117	0,119	0,118
1,00	0,131	0,130	0,131	0,132	0,131
Pendiente	0,1305	0,1302	0,1305	0,1323	0,1312
Intercepto	0,0008	0,00001	0,00003	0,0002	0,00008
Coef. correlación	0,9999	0,9999	0,9997	0,9999	0,9999
Coef.determinación	0,9997	0,9999	0,9994	0,9997	0,9999

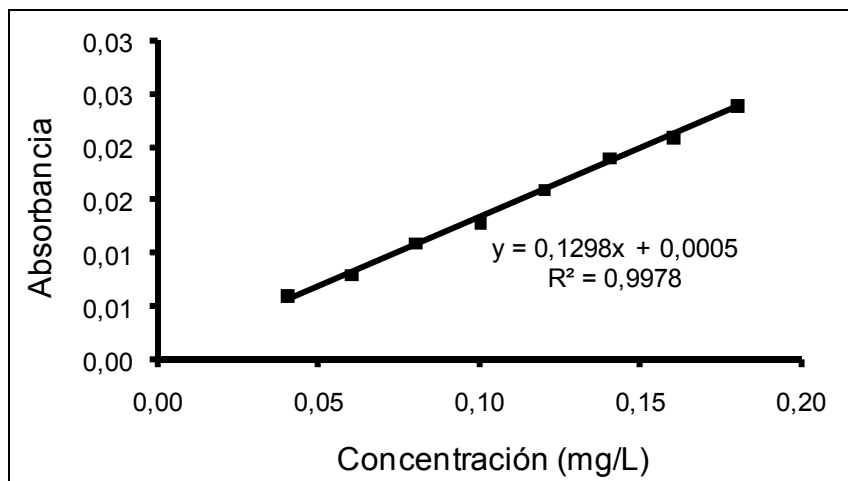
ANEXO 26. Resultados de los de los blancos de reactivos para la determinación del límite de detección y de cuantificación del método de cuantificación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales por UV/VIS

Experimento	Concentración (mg/L)	Experimento	Concentración (mg/L)	Experimento	Concentración (mg/L)
1	0,002	11	0,001	21	0,001
2	0,001	12	0,001	22	0,002
3	0,000	13	0,001	23	0,002
4	0,001	14	0,001	24	0,001
5	0,001	15	0,001	25	0,000
6	0,000	16	0,000	26	0,000
7	0,001	17	0,001	27	0,000
8	0,000	18	0,001	28	0,000
9	0,001	19	0,000	29	0,000
10	0,001	20	0,001	30	0,002

ANEXO 27. Respuestas del instrumento obtenidas para cada ensayo del intervalo de linealidad del método de cuantificación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales a bajas concentraciones por UV/VIS

Concentración (mg/L)	Respuesta del instrumento (Absorbancia)				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5
0,04	0,006	0,006	0,007	0,007	0,006
0,06	0,008	0,008	0,009	0,009	0,008
0,08	0,011	0,011	0,012	0,012	0,010
0,1	0,014	0,013	0,014	0,014	0,012
0,12	0,017	0,017	0,018	0,016	0,014
0,14	0,020	0,020	0,021	0,019	0,017
0,16	0,022	0,022	0,023	0,021	0,019
0,18	0,025	0,024	0,025	0,024	0,023
Pendiente	0,1387	0,1351	0,1351	0,1173	0,1298
Intercepto	0,0001	0,0003	0,0013	0,0007	0,0005
Coef. correlación	0,989	0,9965	0,9965	0,9938	0,9989
Coef. determinación	0,9978	0,9930	0,9930	0,9877	0,9978

ANEXO 28. Curva de calibración promedio a bajas concentraciones del método de determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales industriales, para la determinación del límite de detección y de cuantificación del método por UV/VIS



ANEXO 29. Evaluación de la linealidad y de la sensibilidad del método para determinar compuestos fenólicos en aguas residuales industriales a bajas concentraciones por UV/VIS

Intervalo de respuesta lineal del método a bajas concentraciones				
Concentración (mg/L)	Absorbancia Promedio	Desviación Estándar (10^{-3})	Coefficiente variación(%)	Factores repuesta (y/x)
0,04	0,006	0,548	8,56	0,15
0,06	0,008	0,548	6,52	0,13
0,08	0,011	0,837	7,47	0,14
0,10	0,013	0,894	6,67	0,13
0,12	0,016	1,517	9,25	0,13
0,14	0,019	1,517	7,82	0,13
0,16	0,021	1,517	7,09	0,13
0,18	0,024	0,837	3,46	0,13

Linealidad y sensibilidad del método a bajas concentraciones		
Parámetro	Valor experimental	Criterio de aceptación
Ecuación de la recta	$y = 0,1298x + 0,0005$	$y = mx + b$
Coefficiente de correlación (r)	0,9989	$\geq 0,990$
Coefficiente de determinación (r^2)	0,9978	$\geq 0,980$
Prueba estadística para r	52,17	$t_{exp} > t (p:0,05; n-2) = 2,36$
Promedio de los factores respuesta	0,14	-
DESVEST de los factores repuesta	$6,29 \times 10^{-3}$	-
CVf (%)	4,64 %	$CVf \leq 5\%$
Pendiente (b)	0,1298	-
Desviación estándar de b	$2,48 \times 10^{-3}$	-
Desviación estándar relativa de b (Sbrel (%))	1,91 %	$Sbrel \leq 2\%$
Intervalo de confianza de b	0,1237 a 0,1358	Excluye el valor de cero
Prueba estadística t para b	52,36	$t_{exp} > t (p:0,05; n-2) = 2,36$
Intercepto (a)	0,0005	-
Desviación estándar de a	$2,95 \times 10^{-4}$	-
Desviación estándar relativa de a (Sarel (%))	62,01 %	-
Intervalo de confianza de a	-0,0002 a 0,0012	Debe incluir el cero
Prueba estadística para a	1,61	$t_{exp} < t (p:0,05; n-2) = 2,36$

ANEXO 30. Resultados de la precisión del sistema en la determinación de compuestos fenólicos por UV/VIS

Precisión del sistema						
Experimento	Repetibilidad del sistema			Precisión intermedia del sistema		
	Niveles de concentración					
	0,4 mg/L	0,6 mg/L	0,8 mg/L	0,4 mg/L	0,6 mg/L	0,8 mg/L
1	0,396	0,610	0,770	0,403	0,602	0,785
2	0,403	0,602	0,801	0,403	0,603	0,793
3	0,403	0,602	0,793	0,396	0,587	0,785
4	0,403	0,587	0,793	0,403	0,594	0,778
5	0,403	0,594	0,778	0,403	0,602	0,801
6	0,403	0,594	0,785	0,411	0,587	0,785
7	0,396	0,594	0,793	0,396	0,594	0,793
8	0,403	0,594	0,785	0,403	0,602	0,785
9	0,396	0,602	0,793	0,396	0,610	0,793
10	0,403	0,602	0,793	0,403	0,587	0,785
11	0,403	0,602	0,801	0,403	0,602	0,793
12	0,396	0,594	0,793	0,403	0,594	0,801
13	0,396	0,587	0,785	0,396	0,602	0,793
14	0,403	0,594	0,793	0,403	0,610	0,785
15	0,403	0,594	0,793	0,403	0,594	0,793
16	0,396	0,594	0,793	0,396	0,602	0,785
17	0,396	0,587	0,793	0,411	0,587	0,801
18	0,403	0,594	0,778	0,403	0,602	0,785
19	0,403	0,594	0,801	0,403	0,610	0,793
20	0,403	0,594	0,793	0,396	0,594	0,785
21	0,403	0,594	0,770	0,403	0,602	0,801
22	0,403	0,602	0,793	0,403	0,594	0,785
23	0,396	0,602	0,778	0,396	0,587	0,770
24	0,396	0,587	0,793	0,396	0,610	0,801
25	0,403	0,594	0,785	0,403	0,594	0,801
26	0,403	0,602	0,793	0,403	0,602	0,762
27	0,403	0,602	0,793	0,396	0,587	0,770
28	0,403	0,587	0,801	0,396	0,594	0,793
29	0,403	0,594	0,801	0,403	0,610	0,801

30

0,403

0,594

0,793

0,403

0,594

0,770

ANEXO 31. Resultados de la repetibilidad del método en la determinación de compuestos fenólicos por UV/VIS

Repetibilidad del método			
Experimento	Niveles de concentración		
	0,4 mg/L	0,6 mg/L	0,8 mg/L
1	0,365	0,594	0,785
2	0,365	0,594	0,793
3	0,365	0,594	0,785
4	0,365	0,594	0,785
5	0,365	0,587	0,793
6	0,365	0,587	0,785
7	0,358	0,587	0,801
8	0,365	0,587	0,785
9	0,365	0,610	0,785
10	0,358	0,587	0,785
11	0,365	0,579	0,785
12	0,365	0,594	0,793
13	0,365	0,594	0,778
14	0,358	0,594	0,785
15	0,365	0,594	0,785
16	0,365	0,594	0,785
17	0,365	0,594	0,778
18	0,365	0,594	0,785
19	0,365	0,594	0,770
20	0,365	0,594	0,785
21	0,358	0,587	0,770
22	0,365	0,587	0,778
23	0,365	0,594	0,785
24	0,365	0,587	0,762
25	0,365	0,587	0,785
26	0,365	0,587	0,770
27	0,365	0,594	0,793
28	0,365	0,594	0,778

29	0,358	0,594	0,785
30	0,358	0,594	0,785

ANEXO 32. Resultados de la precisión intermedia y exactitud del método en la determinación de compuestos fenólicos por UV/VIS

Precisión intermedia y exactitud del método										
Niveles de concentración										
Nº Muestra	Concentración Muestra (mg/L)	0,4 mg/L			0,6 mg/L			0,8 mg/L		
		Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	% R	Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	%R	Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	% R
1	0,109	0,291	0,403	101,16	0,491	0,594	98,85	0,691	0,801	100,09
2	0,089	0,311	0,396	98,62	0,511	0,587	97,40	0,711	0,785	97,94
3	0,182	0,218	0,403	101,54	0,418	0,602	100,48	0,618	0,793	98,86
4	0,148	0,252	0,396	98,30	0,452	0,587	97,06	0,652	0,816	102,44
5	0,140	0,260	0,403	101,29	0,460	0,594	98,77	0,660	0,785	97,78
6	0,161	0,239	0,403	101,41	0,439	0,602	100,45	0,639	0,801	100,10
7	0,205	0,195	0,403	101,72	0,395	0,594	98,57	0,595	0,785	97,53
8	0,190	0,210	0,396	97,96	0,410	0,610	102,35	0,610	0,808	101,35
9	0,219	0,181	0,403	101,86	0,381	0,602	100,52	0,581	0,793	98,79
10	0,241	0,159	0,396	97,31	0,359	0,594	98,43	0,559	0,785	97,38
11	0,178	0,222	0,403	101,51	0,422	0,610	102,28	0,622	0,808	101,33
12	0,253	0,147	0,396	97,09	0,347	0,587	96,17	0,547	0,801	100,11
13	0,071	0,329	0,396	98,70	0,529	0,602	100,38	0,729	0,785	97,99
14	0,247	0,153	0,396	97,20	0,353	0,594	98,40	0,553	0,793	98,73
15	0,091	0,309	0,403	101,09	0,509	0,602	100,39	0,709	0,808	101,16

Precisión intermedia y exactitud del método

Nº Muestra	Concentración Muestra	Niveles de concentración								
		0,4 mg/L			0,6 mg/L			0,8 mg/L		
		Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	% R	Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	%R	Estándar añadido	Muestra + estándar añadido	% R
16	0,245	0,155	0,403	102,17	0,355	0,610	102,71	0,555	0,785	97,36
17	0,164	0,236	0,396	98,19	0,436	0,587	96,95	0,636	0,801	100,10
18	0,199	0,201	0,403	101,67	0,401	0,594	98,59	0,601	0,785	97,56
19	0,224	0,176	0,396	97,57	0,376	0,602	100,53	0,576	0,808	101,43
20	0,189	0,211	0,403	101,59	0,411	0,594	98,62	0,611	0,785	97,60
21	0,192	0,208	0,396	97,94	0,408	0,610	102,36	0,608	0,801	100,10
22	0,093	0,307	0,396	98,61	0,507	0,602	100,39	0,707	0,793	99,01
23	0,257	0,143	0,396	97,01	0,343	0,594	98,35	0,543	0,785	97,30
24	0,097	0,303	0,403	101,11	0,503	0,587	97,36	0,703	0,801	100,09
25	0,159	0,241	0,396	98,22	0,441	0,602	100,45	0,641	0,808	101,29
26	0,176	0,224	0,403	101,50	0,424	0,610	102,27	0,624	0,793	98,87
27	0,215	0,185	0,403	101,82	0,385	0,594	98,53	0,585	0,808	101,41
28	0,184	0,216	0,396	98,02	0,416	0,602	100,48	0,616	0,816	102,58
29	0,095	0,305	0,396	98,60	0,505	0,587	97,37	0,705	0,785	97,92
30	0,281	0,119	0,396	96,40	0,319	0,594	98,23	0,519	0,808	101,59

ANEXO 33. Resultados del intervalo de trabajo del método para determinar aceites y grasas en aguas por extracción Soxhlet

Intervalo de trabajo del método							
Concentración n (m/L)	Experiment o	Concentración n experimental promedio (m/L)	Porcentaje de recuperación n (%)	Concentración n (m/L)	Experiment o	Concentración n experimental promedio (m/L)	Porcentaje de recuperación n (%)
100	1	104,20	104,20	400	1	373,60	93,40
	2	103,40	103,40		2	375,40	93,85
	3	93,90	93,90		3	367,70	91,92
	4	96,70	96,70		4	408,50	102,13
	5	92,80	92,80		5	389,90	97,47
	6	97,70	97,70		6	367,20	91,80
	7	94,00	94,00		7	406,20	101,55
200	1	183,90	91,95	500	1	510,30	102,06
	2	207,90	103,95		2	455,70	91,14
	3	193,90	96,95		3	481,70	96,34
	4	206,20	103,10		4	495,10	99,02
	5	185,90	92,95		5	483,30	96,66
	6	190,20	95,10		6	490,30	98,06
	7	192,30	96,15		7	477,60	95,52
300	1	308,90	102,97				
	2	282,70	94,23				
	3	287,50	95,83				
	4	289,10	96,37				
	5	282,20	94,07				
	6	272,60	90,87				

	7	308,30	102,77				
--	---	--------	--------	--	--	--	--

Anexo 34. Resultados de los de los blancos de reactivos para la determinación de los límites de detección y de cuantificación instrumental para el método de aceites y grasas en aguas por extracción Soxhlet

Limites de detección y cuantificación instrumental	
Experimento	Concentración (mg/L)
1	1,40
2	0,40
3	1,50
4	1,30
5	0,80
6	1,20
7	0,50
8	0,70
9	1,70
10	0,80
11	1,10
12	1,00
13	1,00
14	1,10
15	1,10
16	0,30
17	0,80
18	1,80
19	1,20
20	1,60
21	0,80
22	1,30
23	0,80
24	0,70
25	1,60
26	1,40
27	0,80
28	1,50
29	1,40
30	0,30

Anexo 35. Resultados de la determinación del límite de detección del método para la cuantificación de aceites y grasas en aguas por extracción Soxhlet

Límite de detección del método							
Concentración (m/L)	Experimento	Concentración experimental promedio (m/L)	Porcentaje de recuperación (%)	Concentración (m/L)	Experimento	Concentración experimental promedio (m/L)	Porcentaje de recuperación (%)
10	1	9,60	96,00	40	1	39,10	97,75
	2	9,60	96,00		2	41,60	104,00
	3	9,80	98,00		3	39,10	97,75
	4	10,90	109,00		4	36,10	90,25
	5	10,40	104,00		5	41,90	104,75
	6	10,40	104,00		6	38,80	97,00
	7	9,50	95,00		7	38,10	95,25
20	1	20,80	104,00	50	1	51,40	102,80
	2	21,20	106,00		2	46,50	93,00
	3	19,50	97,50		3	46,10	92,20
	4	18,50	92,50		4	47,60	95,20
	5	18,50	92,50		5	49,00	98,00
	6	19,80	99,00		6	51,50	103,00
	7	19,80	99,00		7	51,40	102,80
30	1	28,70	95,67				
	2	29,50	98,33				
	3	28,60	95,33				
	4	29,00	96,67				
	5	32,80	109,33				
	6	28,80	96,00				
	7	28,90	96,33				

Anexo 36. Resultados de la determinación del límite superior del método para la cuantificación de aceites y grasas en aguas por extracción Soxhlet

Límite superior del método							
Concentración (m/L)	Experimento	Concentración experimental promedio (m/L)	Porcentaje de recuperación (%)	Concentración (m/L)	Experimento	Concentración experimental promedio (m/L)	Porcentaje de recuperación (%)
750	1	767,30	102,31	1500	1	1490,30	99,35
	2	706,70	94,23		2	1384,90	92,33
	3	720,60	96,08		3	1486,10	99,07
	4	747,00	99,60		4	1420,30	94,69
	5	717,20	95,63		5	1424,10	94,94
	6	692,80	92,37		6	1400,90	93,39
	7	729,00	97,20		7	1494,10	99,61
1000	1	1011,30	101,13	2000	1	1800,50	90,025
	2	917,90	91,79		2	1905,10	95,255
	3	981,10	98,11		3	1876,50	93,825
	4	983,10	98,31		4	1897,80	94,89
	5	939,50	93,95		5	1818,80	90,94
	6	990,60	99,06		6	1864,20	93,21
	7	971,80	97,18		7	1953,70	97,685

Anexo 37. Resultados de la precisión intermedia del método en la determinación de aceites y grasas por extracción Soxhlex

Precisión intermedia del método			
Concentración (mg/L)	Experimento	Concentración experimental promedio (m/L)	Porcentaje de recuperación (%)
150	1	155,40	103,60
	2	144,70	96,47
	3	144,80	96,53
	4	153,10	102,07
	5	144,90	96,60
	6	151,90	101,27
	7	146,60	97,73
	8	145,70	97,13
	9	144,10	96,07
	10	156,80	104,53
	11	143,90	95,93
	12	146,80	97,87
	13	141,90	94,60
	14	149,20	99,47
300	1	298,60	99,53
	2	308,20	102,73
	3	290,70	96,90
	4	287,40	95,80
	5	293,20	97,73
	6	308,80	102,93
	7	293,00	97,67
	8	299,80	99,93
	9	290,70	96,90
	10	306,80	102,27
	11	293,40	97,80
	12	284,20	94,73
	13	294,90	98,30
	14	285,10	95,03

anexo 37. Resultados de la precisión intermedia del método en la determinación de aceites y grasas por extracción Soxhlex

Precisión intermedia del método			
Concentración (mg/L)	Experimento	Concentración experimental promedio (m/L)	Porcentaje de recuperación (%)
450	1	430,40	95,64
	2	440,70	97,93
	3	435,20	96,71
	4	440,80	97,96
	5	432,90	96,20
	6	455,20	101,16
	7	439,20	97,60
	8	449,20	99,82
	9	438,90	97,53
	10	444,75	98,83
	11	434,50	96,56
	12	431,50	95,89
	13	457,10	101,58
	14	409,40	90,98