

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS



VALIDACIÓN DEL MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS PARA LA
DETERMINACIÓN DE AMONIO EN AGUAS
NATURALES

POR: JOSUÉ ISRAEL PACHECO CONDE

TUTOR: OSWALDO EDUARDO RAMOS RAMOS

LA PAZ - BOLIVIA

2018

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mi familia en especial a mis padres María y Mario quienes con el ejemplo, amor y comprensión supieron guiarme creer en mí y darme la oportunidad de tener una educación e impulsándome para culminar esta meta.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por ser mi principal apoyo, por sus enteros esfuerzos para seguir adelante y hoy en día ser un profesional.

Al Laboratorio de Calidad Ambiental (L.C.A.) en especial al Ing. Jaime Chincheros, Director General, al Lic. Raúl Vidal Quispe jefe de área del módulo de aguas, por abrirme la puerta para poder realizar nuestro estudio, por brindar sus conocimientos, su apoyo y colaboración en la realización de esta monografía. A ustedes muchas gracias.

A mi tutor PhD. Oswaldo Ramos Ramos, por haber asumido con tanto empeño y dedicación la conducción de este trabajo por su tiempo y por su valiosa orientación para culminar este estudio. Al PhD. Leonardo Guzmán por la colaboración en la revisión del documento. Mis respetos y admiración eterna.

Finalmente a todos mis compañeros de laboratorio al Lic. Sergio Catarí por su apoyo en la parte estadística, a mí querido grupo los “Toritos” por las risas que me alegraban los días y el apoyo para culminar este trabajo.

De todo corazón muchas gracias

INDICE

CAPITULO I	3
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 ANTECEDENTES.....	4
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
1.3 OBJETIVOS	9
1.4 JUSTIFICACIÓN	10
CAPITULO II.....	12
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 CICLO HIDROLÓGICO	12
2.2 TRANSFORMACIONES DEL NITRÓGENO.....	13
2.3 NITRÓGENO INORGÁNICO EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS	16
2.4 CRITERIOS DE CALIDAD DE AGUA.....	24
2.5 ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS	26
2.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	28
2.7 IMPORTANCIA DE VALIDAR UN MÉTODO ANALÍTICO	29

2.8 CUANDO REALIZAR UNA VALIDACIÓN	29
2.9 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	31
CAPITULO III.....	52
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	52
3.1 MUESTREO	52
3.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	56
3.3 EQUIPOS MATERIALES Y REACTIVOS	57
3.4 METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	59
CAPITULO IV	68
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	68
4.1 EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DE LOS PUNTOS DE CALIBRACIÓN USANDO EL ESTADISTICO TEST DE GRUBBS (G) Y TEST DE COCHRAN'S (C)..	68
4.2 EVALUACIÓN DE DATOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD	74
4.3 EVALUACIÓN DEL LIMITE DE DETECCIÓN Y LIMITE DE CUANTIFICACIÓN	84
4.4 EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DEL MÉTODO	85
4.5 EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN	92



4.6 EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD.....	97
4.7 EVALUACIÓN DE LA ROBUSTEZ.....	101
CAPITULO V.....	105
5. CONCLUSIONES.....	105
CAPITULO VI.....	107
6. RECOMENDACIONES.....	107
CAPITULO VII.....	108
7. BIBLIOGRAFÍA.....	108
ANEXOS.....	112
ANEXO 1.....	112
ANEXO 2.....	113
ANEXO 3.....	114
ANEXO 4.....	115



RESUMEN

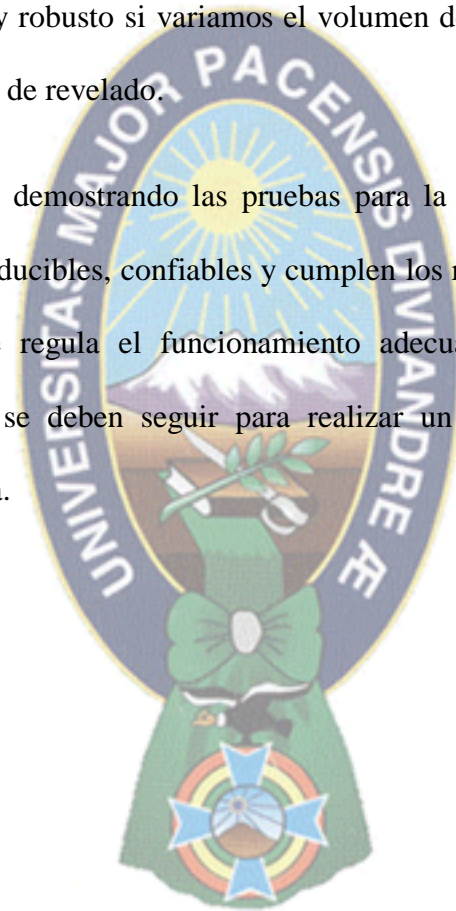
El presente trabajo titulado: “Validación del método espectrofotométrico UV-VIS para la determinación de amonio en aguas naturales” se realizó por la necesidad de implementar un nuevo método de determinación de amonio a concentraciones menores de 1 mg NH₄⁺/L en aguas naturales, teniendo en cuenta los Límites Máximos Permisibles de la norma boliviana amparado en la ley N° 1333 de gestión ambiental. El trabajo se realizó en el Laboratorio de Calidad Ambiental (L.C.A.) basado en el método normalizado de la guía Standard Methods del APHA, el método utilizado fue el de nesslerización que se aplica directamente a la muestra que en medio alcalino al combinarse con nitrógeno amoniacal forma un complejo de color amarillo a pardo a medida que aumenta la concentración de amonio, agregando antes, la solución de sal de Rochelle a las muestras para inhibir las precipitaciones de iones residuales de calcio y magnesio se utilizó el equipo espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 25 en una cubeta de 1 cm de recorrido de luz a una longitud de onda de 410 nm.

Para validar la metodología se utilizó una muestra recolectada de la vertiente de la gruta de la Virgen de Lourdes que se encuentra ubicada entre la avenida del Poeta y la avenida del Libertador, en la zona sur de la ciudad de La Paz a 16°30'41.7" latitud Sur y 68°07'10.0" longitud Oeste, a 9,1 °C un pH 7,7 y 707 uS/cm y de concentración 0,1284 +/- 0,01 mg NH₄⁺/L.

Se determinaron siete parámetros los cuales fueron: linealidad en un rango de 0,2 a 1 mg NH₄⁺/L, la selectividad concluyendo que no hay efecto de matriz, el límite de

detección que es de 0,01 mg NH₄⁺/L, el límite de cuantificación que es de 0,03 mg NH₄⁺/L, precisión con una desviación estándar relativa de 0,1098 %, veracidad con un porcentaje de recuperación de 104,3211 % concluyendo que el método tiene exactitud, la robustez para nuestro método analítico es sensible a diferente equipo espectrofotométrico y robusto si variamos el volumen del estabilizador, el volumen del revelador y el tiempo de revelado.

Se validó el método demostrando las pruebas para la detección de amonio en aguas naturales y son reproducibles, confiables y cumplen los requisitos exigidos por la norma ISO/IEC 17025 que regula el funcionamiento adecuado de los laboratorios y los procedimientos que se deben seguir para realizar un trabajo de validación de una metodología analítica.



CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es un nutriente esencial para todas las formas de vida y cambios pequeños en las concentraciones de nitrógeno biológicamente asequible pueden afectar drásticamente los niveles de la vida de los ecosistemas.

El nitrógeno puede encontrarse en el agua en tres maneras diferentes: como gas disuelto, en combinaciones inorgánicas y en combinaciones orgánicas. Las formas de nitrógeno inorgánico más comunes en los ecosistemas acuáticos son el amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), estos iones pueden estar presentes de manera natural en el medio acuático como consecuencia de la deposición atmosférica, la escorrentía superficial y subterránea, la disolución de depósitos geológicos ricos en nitrógeno, la descomposición biológica de la materia orgánica. Sin embargo, las actividades humanas han alterado de manera significativa el ciclo global del nitrógeno, aumentando su disponibilidad en muchas regiones del planeta como consecuencia de fuentes puntuales y difusas de contaminación (Camargo J. , 2005).

El amonio - amoniaco se encuentran estrechamente relacionados a través de su equilibrio químico y las concentraciones relativas de NH_4^+ y NH_3 dependen básicamente del pH y la temperatura del agua, se consideran uno de los contaminantes más importantes en el medio acuático no sólo por su naturaleza altamente tóxica y su ubicuidad en los sistemas de aguas superficiales, sino también porque muchos efluentes tienen que ser tratados extensamente

para mantener las concentraciones de amonio - amoniaco en aguas superficiales sea inaceptablemente alta (Acevedo D. , 2002).

Existen varias técnicas para realizar el análisis de amonio en sistemas acuáticos una de ellas es por el método espectrofotométrico. En el presente estudio utilizaremos espectroscopia UV-VIS para realizar la validación del método cuantitativo en la determinación de concentración de amonio en aguas naturales, usando una “curva de calibración” y por comparación de un material de referencia. La validación del método analítico cuantitativo permitirá la efectividad del método conocido a través de una serie de pruebas experimentales de las cuales se obtienen datos sobre la linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud y robustez.

1.1 ANTECEDENTES

Las investigaciones en medio ambiente sobre el incremento de la disposición del nitrógeno inorgánico (amonio) en sistemas acuáticos son muy diversos, los resultados de estas investigaciones han demostrado como afectan al ambiente estos incrementos, a pesar de los avances de las leyes y de políticas públicas a favor del medio ambiente, los estudios encontrados revelan detalles de cómo las actividades humanas han alterado de manera significativa el ciclo del nitrógeno.

El estudio en la ciudad de Hamburgo (Alemania) de concentraciones de amonio presentes en muestras de agua de lluvia entre los meses de marzo y junio y los contaminantes atmosféricos producidos por el nitrógeno, pueden clasificarse en óxidos de nitrógeno, o

compuestos reducidos, de los cuales el más representativo es el amoniaco, éste último se encuentra presente en solución acuosa y puede comportarse como una base y formarse el ion amonio (Pérez, 2003). En diferentes puntos de la ciudad de Hamburgo se encontraron un rango de amonio entre 0,6 a 2,7 mg/L. Esta determinación de amonio a concentraciones bajas en aguas de lluvia contribuye a la evaluación y mantener una base de datos de la composición química de las precipitaciones pluviales de esta región y como afecta la contaminación atmosférica. Los valores superan el límite establecido por la directiva 98/83/CE para las aguas pluviales que tiene su máximo de 0,5 mg/L. Observando que las mayores concentraciones de amonio es provocado por las actividades industriales, produciendo problemas que pueden tener efectos sobre multitud de receptores. Para determinar el contenido de amonio de las precipitaciones se utilizó un método espectrofotométrico llamado azul de indofenol (630 nm). Que utiliza reactivos como el citrato de sodio, fenol, hipoclorito de sodio, hidróxido de sodio y nitroprusiato de sodio como catalizador, al reaccionar estos compuestos se obtiene una solución de color azul a verde que varía en función de la concentración de amonio.

En un estudio en el Municipio Jesús María (México) a lo largo del río tenía como uno de los objetivos evaluar los efectos de los núcleos de asentamiento poblacional e industrial, las actividades agropecuarias (Martinez, 1995), sobre la calidad de las aguas sobre el lecho del río desde su paso de áreas rurales a urbanas, estableciendo un gradiente en el análisis de los principales parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de las aguas superficiales temporales del río San Pedro, uno de estos parámetros fue el amonio que es un indicador de contaminación orgánica, en diferentes puntos tenían un valor entre 0,8 a 5 mg/L de

nitrógeno amoniacal, teniendo como objetivo primordial restaurar y mantener la integridad física, química y biológica de sus aguas según la ley nacional de aguas de México y la norma NOM-031-ECOL 1993 que establece, los límites máximos permisibles de contaminantes en aguas superficiales que es de 0,5 mg/L de nitrógeno amoniacal, estas muestras fueron analizadas después de su colección mediante las técnicas especificadas (APHA) y equipos de campo, en el caso de amonio se utilizó espectrofotometría utilizando el reactivo de Nessler.

El estudio de Acevedo (2002) tenía como objetivo cuantificar la descarga de nitrógeno amoniacal en un cultivo de sorgo con espaciamentos diferentes de drenajes subterráneos utilizando como fertilizante al sulfato de amonio, las concentraciones medias anuales de nitrógeno amoniacal cuantificadas fueron de 0,27 mg/L y 0,47 mg/L en aguas del drenaje subterráneo cuando hubo descarga en tiempo de lluvia, estudiando las pérdidas del nitrógeno por vías como la desnitrificación, volatilización, inmovilización y fijación física en suelos. Si bien en este trabajo cuantifica el nitrógeno amoniacal en aguas lixiviadas es pertinente con nuestro trabajo ya que determina el nitrógeno amoniacal a concentraciones bajas y utilizando el método de Nessler, el análisis de sus resultados permite aspectos positivos de ampliar la utilización de nuestro método para la determinación de aguas lixiviadas que provienen de cultivos que contribuyen a la contaminación de las aguas pues parte del nitrógeno que se lixivian llegan al agua de drenaje que descarga en las corrientes y cuerpos de agua locales.

Ramos (2002) Oxapampa, Perú, evaluó las pérdidas de nitrógeno orgánico e inorgánico en muestras de flujo base en época seca y en flujos de tormenta en época de lluvia en las micro cuencas Wara y Killa. En este estudio se cuantificó amonio a bajas concentraciones en época seca 0,745 uM y época de lluvia 0,534 uM. Utilizando el método espectrofotométrico (azul de indofenol) este estudio concluye que la deforestación parcial de la micro cuenca Killa, no ha impactado en los procesos de retención de nitrógeno. Este estudio amplio sobre pérdidas del nitrógeno, ayudo a conocer otro método espectrofotométrico (azul de indofenol) para cuantificar amonio establecido en el manual “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” sin embargo es difícil el acceso de estos reactivos por el costo elevado que tienen, por eso se optó para este trabajo el método espectrofotométrico (Nessler) que también determina amonio a bajas concentraciones, establecido también en el manual y utiliza reactivos de bajo costo económico además de ser un procedimiento más eficiente en cuestión de tiempo.

En el trabajo de (Chambi Tapia, 2017) “Validación del método analítico para la determinación de metales en suelos por la técnica de fluorescencia de rayos X” El estudio fue realizado para muestras de suelos de ocho calicatas en los cantones de Colquenchá, Machacamarcá y Micaya del Municipio de Colquenchá, empleando la técnica de FRX-ED, fue validado el método para la determinación de Mn, Fe, Cu y Zn en suelos, indicando que este método no es adecuado para la cuantificación de Cu en suelos, debido a que los suelos presentan valores de concentraciones muy bajos, la cuantificación del Mn, Fe y Zn en muestras de suelos de calicatas fue determinada por comparación directa utilizando un material de referencia certificada por la IEIA SOIL-7, para la validación de este método se

realizaron los parámetros de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud y robustez, procedimiento que fueron usados en el presente trabajo.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los mayores problemas medio ambientales están relacionados con los desechos a los cuerpos de agua la creciente actividad industrial, minera, agropecuaria y descargas domésticas que generan efluentes que en muchos casos descargan directamente a los cursos de aguas superficiales, las actividades humanas han alterado de manera significativa el ciclo global del nitrógeno (y de otros elementos químicos), aumentando su disponibilidad en muchas regiones del planeta como consecuencia de fuentes puntuales y difusas de contaminación, una de las formas más comunes del nitrógeno inorgánico en sistemas acuáticos es el amoníaco y en su forma ionizada el amonio (NH_4^+) contaminante que por su naturaleza es altamente tóxico que según la Organización Mundial de Salud (OMS 1961) publicaron una revisión sobre los efectos tóxicos del nitrógeno, asociados a esta contaminación generalizada aparecen los siguientes problemas medioambientales, la acidificación de ríos y lagos con baja o reducida alcalinidad, agotamiento de oxígeno, proliferación de algas tóxicas y eutrofización de las aguas que favorecen a organismos transmisores o causantes de enfermedades infecciosas como la malaria y brotes de cólera.

La Norma Boliviana dictada bajo el amparo de la ley de Gestión Ambiental N° 1333 tiene como objetivo la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental, en lo relativo al recurso agua, para salvaguardar y preservar la integridad de las personas, de los ecosistemas y sus interrelaciones la presente norma técnica, los Límites Máximos

Permisibles (LMP) para aguas naturales de máxima calidad, que las habilita como potables con respecto al amonio es de 0,05 mg/L. Para aguas destinadas a mantener la vida natural, para la reproducción, supervivencia, crecimiento y aprovechamiento de especies bioacúaticas en cualquiera de sus formas, tal como en los casos de pesca y acuicultura el LMP para el amonio es de 0,2 mg/L.

La importancia de estos problemas, demuestran la necesidad de contar con una metodología confiable de análisis de amonio, el laboratorio de Calidad ambiental (LCA) de la Universidad Mayor de San Andrés no cuenta con un método validado para la determinación de amonio a bajas concentraciones con el presente trabajo se pretende validar el método espectrofotométrico que determine amonio en aguas.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Validar el método espectrofotométrico ultravioleta – visible (UV-VIS) para la determinación de amonio en aguas naturales, en el Laboratorio de Calidad Ambiental (L.C.A.)

1.3.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones experimentales, instrumentales óptimos para el correcto desempeño del método para la cuantificación de amonio en aguas naturales utilizando el reactivo de Nessler por el método espectrofotométrico UV-VIS.

- Evidenciar los parámetros del desempeño para la validación definidos en la ISO-17025 referidos a la linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad, precisión, exactitud y robustez.

1.4 JUSTIFICACIÓN

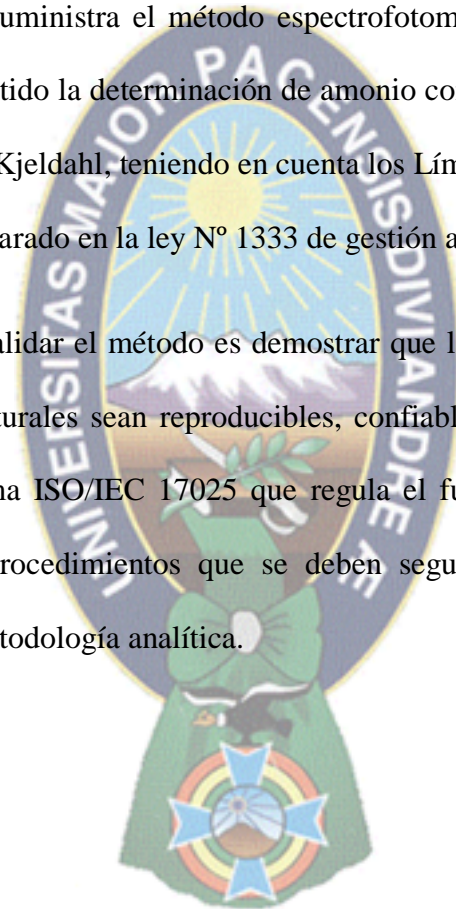
El agua es esencial para la vida por esta razón debemos insistir en la relación entre el agua y la salud, la disponibilidad y la calidad del agua determina el grado de salud e higiene de cualquier sociedad.

La disponibilidad del ión amonio, que existe de manera natural en suelos, vegetales y agua formando parte del ciclo del nitrógeno, han sido alteradas por actividades humanas, aumentando su disponibilidad, la ley de gestión ambiental N° 1333 en lo relativo al recurso agua presenta una norma técnica donde los Límites Máximos Permisibles (LMP) para aguas naturales de máxima calidad es de 0,05 mg/L de amonio y para aguas destinadas a mantener la vida natural los Límites Máximos Permisibles (LMP) son de 0,2 mg/L de amonio, se vuelven tóxicos y causan cambios medioambientales como la eutrofización si se superan estos límites máximos de concentración de amonio, de ahí la responsabilidad de los laboratorios de análisis de agua en presentar resultados confiables con métodos validados.

En el Laboratorio de Calidad ambiental (LCA) el equipo Kjeldahl para la determinación de amonio tiene un límite de cuantificación de 1 mg/L, esta situación cobra mayor importancia, al considerar que los resultados que emite el laboratorio que analiza

indicadores medio ambientales, por lo regular se emplean para compararlos con los valores de las normativas y demostrar su cumplimiento, de esta forma, se da el caso de que, cuando se compare el resultado del laboratorio con el límite máximo permisible, no se aprecia si cumple o no el mismo. La importancia de la realización de este trabajo se debe al aporte que suministra el método espectrofotométrico utilizando el reactivo de Nessler que ha permitido la determinación de amonio con límites de cuantificación (LC) inferiores al método Kjeldahl, teniendo en cuenta los Límites Máximos Permisibles de la norma boliviana amparado en la ley N° 1333 de gestión ambiental.

La importancia de validar el método es demostrar que las pruebas para la detección de amonio en aguas naturales sean reproducibles, confiables y que cumpla los requisitos exigidos por la norma ISO/IEC 17025 que regula el funcionamiento adecuado de los laboratorios y los procedimientos que se deben seguir para realizar un trabajo de validación de una metodología analítica.



CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CICLO HIDROLÓGICO

El ciclo hidrológico es un modelo conceptual que describe la acumulación y movimiento del agua entre la biosfera, atmósfera, litosfera y la hidrosfera (Pidwirny, 2001).

El agua en el planeta (Figura 1) puede estar almacenada en uno de los siguientes reservorios: atmósfera, océanos, lagos, ríos, suelos, seres vivos, glaciales, nevados y aguas subterráneas (Pidwirny, 2001).

Figura 1. Ciclo hidrológico



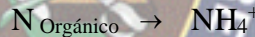
Fuente: UNESCO, 1992

2.1.1 Aguas Naturales

Las aguas de origen natural puede ser de los lagos, lagunas, manantiales, ríos y sus afluentes, nevados y glaciares, aguas subterráneas, aguas de pozos y aguas que vienen de lluvias, no están controladas, por lo que es muy importante conocer la calidad de las mismas antes de su utilización o consumo. Pueden existir diversos focos de contaminación que pueden afectar a la calidad del agua, incluso si estos se encuentran a varios kilómetros de su captación.

2.2 TRANSFORMACIONES DEL NITRÓGENO

2.2.1 La mineralización del nitrógeno



El nitrógeno orgánico se transforma a nitrógeno inorgánico a través de un proceso llamado mineralización del nitrógeno, también conocido como desintegración. Cuando los organismos mueren, las materias de descomposición (como la bacteria y los hongos) consumen la materia orgánica y llevan al proceso de descomposición. Durante este proceso, una cantidad significativa del nitrógeno contenido dentro del organismo muerto se convierte en amonio.

2.2.2 Proceso de asimilación del amonio

La asimilación de amonio es un proceso por el cual NH_3 y NH_4^+ son captados por un organismo para llegar a ser parte de su biomasa bajo la forma de compuesto de nitrógeno orgánico (Jaffe, 1992).

2.2.3 Proceso de Nitrificación

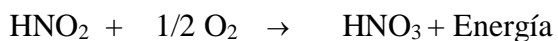
La nitrificación es el proceso de oxidación de NH_3 o NH_4^+ a nitrito o nitrato por un organismo como medio para producir energía (Jaffe, 1992).

La conversión de amonio a nitrato es mediante bacterias nitrificantes, las cuales están especializadas en obtener su energía por la oxidación del amonio, mientras utiliza CO_2 como fuente de carbono para sintetizar componentes orgánicos. Los organismos que realizan esta clase de reacciones son llamados bacterias quimio-autotróficas (Young, 2001).

Las bacterias del género *Nitrosomonas* oxidan el amoníaco a nitrito:



Las bacterias del género *Nitrobacterias* oxidan el nitrito a nitrato:



Parte del amonio producido por la descomposición se convierte en nitrato a través de un proceso llamado nitrificación. Las bacterias que llevan a cabo esta reacción obtienen energía de sí misma. La nitrificación requiere la presencia del oxígeno, por consiguiente, la nitrificación puede suceder principalmente en ambientes ricos de oxígeno, como las aguas que circulan o que fluyen y las capas de la superficie de los suelos y sedimentos. El proceso de nitrificación tiene algunas importantes consecuencias. Los iones de amonio tienen carga positiva y por consiguiente se pegan a partículas y materias orgánicas del suelo que tienen carga negativa. La carga positiva previene que el nitrógeno de amonio sea lixiviado del suelo por las lluvias. Por otro lado, el ión de nitrato con carga negativa no se mantiene en las partículas del suelo y puede ser barrido del perfil de suelo. Esto lleva a una disminución de la fertilidad del suelo y a un enriquecimiento de nitrato de las aguas corrientes de la superficie y del subsuelo.

2.2.4 Proceso de desnitrificación

La desnitrificación es la reducción del NO_3^- a formas del nitrógeno gaseoso (óxido nítrico NO , óxido nitroso N_2O o nitrógeno gaseoso N_2). Solo es realizada por organismos usualmente facultativos anaeróbicos y predominantemente por dos géneros *Pseudomonas* spp y *Basillus*, con la producción de materia orgánica en condiciones anaeróbicas, utilizando el nitrato en lugar del oxígeno como aceptor de electrones, en ausencia de oxígeno el nitrato es reducido a nitrito. Se distinguen dos tipos de desnitrificación: la des-asimilativa y la asimilativa.

La vía des-asimilativa retorna a nitrógeno gaseoso a la atmósfera por la reducción de nitrato a nitrógeno molecular, la enzima utilizada es la nitrato reductasa (Pinay, 1993).

2.3 NITRÓGENO INORGÁNICO EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS

Las formas iónicas (reactivas) de nitrógeno inorgánico más comunes en los ecosistemas acuáticos son el amonio (NH_4^+), el nitrito (NO_2^-) y el nitrato (NO_3^-). Estos iones pueden estar presentes de manera natural en el medio acuático como consecuencia de la deposición atmosférica, la escorrentía superficial y subterránea, la disolución de depósitos geológicos ricos en nitrógeno, la descomposición biológica de la materia orgánica, y la fijación de nitrógeno por ciertos procariontes (Figura 2). Sin embargo, las actividades humanas han alterado de manera significativa el ciclo global del nitrógeno (y de otros elementos químicos), aumentando su disponibilidad en muchas regiones del planeta como consecuencia de fuentes puntuales y difusas de contaminación (Tabla 1). Asociados a esta contaminación generalizada aparecen los siguientes problemas medioambientales en los ecosistemas acuáticos: (1) acidificación de ríos y lagos con baja o reducida alcalinidad; (2) eutrofización de las aguas y proliferación de algas tóxicas; (3) toxicidad directa de los compuestos nitrogenados para los animales acuáticos. Además, la contaminación por nitrógeno inorgánico podría inducir efectos perjudiciales sobre la salud humana.

En la Figura (2) es el esquema del nitrógeno en ecosistemas acuáticos, y los principales problemas medioambientales derivados de la contaminación.

Tabla 1. Principales fuentes antropogénicas de nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos

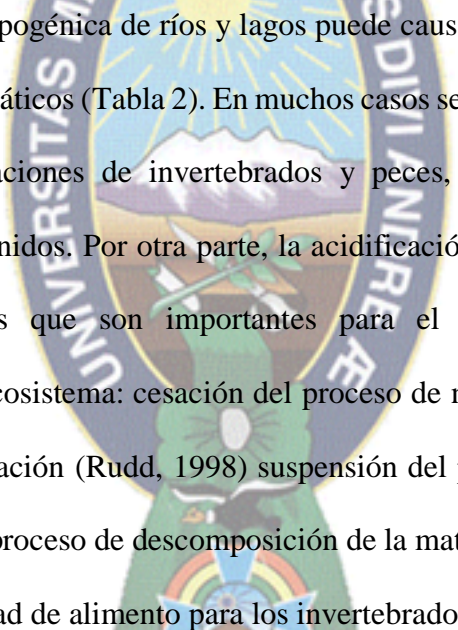
FUENTES PUNTUALES
<ul style="list-style-type: none"> • Residuos y vertidos de granjas de animales, piscifactorías continentales, y centros de acuicultura marina. • Vertidos industriales y municipales sin un tratamiento adecuado. • Procesos de escorrentía e infiltración en basureros.
FUENTES DIFUSAS
<ul style="list-style-type: none"> • Procesos de escorrentía e infiltración en campos de cultivo. • Procesos de escorrentía e infiltración en praderas y bosques quemados. • Emisiones a la atmósfera provenientes del uso de combustibles fósiles y fertilizantes, y la posterior deposición atmosférica sobre las aguas superficiales.

Fuente: (Camargo J. , 2005)

2.3.1 Acidificación

El dióxido de azufre (SO₂) y los óxidos de nitrógeno (NO, NO₂) han sido reconocidos tradicionalmente como los contaminantes principales en el proceso de acidificación de lagos y ríos con baja o reducida alcalinidad (Schindler, 1998). Estos gases, una vez emitidos a la atmósfera, pueden reaccionar con otras moléculas (H₂O, OH, O₃), llegando

a formar ácido sulfúrico (H_2SO_4) y ácido nítrico (HNO_3). La deposición atmosférica de estos ácidos sobre las aguas superficiales puede incrementar no solo la concentración de $(\text{SO}_4)^{2-}$ y $(\text{NO}_3)^-$ sino también la concentración de H^+ y, en consecuencia, reducir el valor del pH del agua (Schindler, 1998). Una disminución del pH puede incrementar la concentración de aluminio disuelto y otros metales trazas (Campbell, 1991).



La acidificación antropogénica de ríos y lagos puede causar diversos efectos adversos en plantas y animales acuáticos (Tabla 2). En muchos casos se ha observado una disminución drástica de las poblaciones de invertebrados y peces, especialmente de crustáceos, gasterópodos y salmónidos. Por otra parte, la acidificación de ríos y lagos puede alterar procesos microbianos que son importantes para el reciclaje de nutrientes y el funcionamiento del ecosistema: cesación del proceso de nitrificación y estimulación del proceso de desnitrificación (Rudd, 1998) suspensión del proceso de fijación (Schindler, 1998), reducción del proceso de descomposición de la materia vegetal, con cambios en la calidad y disponibilidad de alimento para los invertebrados acuáticos (Gessner, 2004).

En la tabla (2) Principales efectos adversos de la acidificación antropogénica sobre los productores primarios y secundarios.

Tabla 2. Principales efectos adversos de la acidificación antropogénica sobre los productores primarios y secundarios

EFFECTOS ADVERSOS
<ul style="list-style-type: none">• Reducción de la fotosíntesis y la productividad en algas del plancton y bentos.• Disminución de la diversidad de especies en las comunidades del fitoplancton y el perifiton.• Bioacumulación y toxicidad del aluminio en macrófitos sumergidos y animales acuáticos.• Alteración de la respiración y la regulación iónica en animales acuáticos.• Reducción de la actividad o eficiencia alimentaria en animales acuáticos.• Alteración del desarrollo embrionario y la tasa de crecimiento en animales acuáticos.• Disminución de la diversidad de especies en las comunidades de animales acuáticos.

Fuente: (Camargo J. , 2005)

2.3.2 Eutrofización

El proceso de eutrofización se define como la secuencia de cambios en los ecosistemas acuáticos causados por un incremento en el suministro de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo. Concentraciones elevadas de NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- pueden, por tanto,

promover el desarrollo, mantenimiento y proliferación de los productores primarios (fitoplancton, algas bentónicas, macrófitos), contribuyendo al muy extendido fenómeno de la eutrofización cultural de los ecosistemas acuáticos (Smith, 2003).

La eutrofización cultural puede producir diversos efectos ecológicos y toxicológicos los cuales están directa o indirectamente relacionados con la proliferación de los productores primarios Tabla (3). Esta proliferación, y su posterior muerte y descomposición, suelen conducir a una marcada disminución de la concentración de oxígeno disuelto en aquellos ecosistemas con una reducida tasa de renovación de agua. Las muertes masivas de peces (y de otros animales) son probablemente la manifestación más dramática de hipoxia o anoxia en ecosistemas eutróficos e hipertróficos que experimentan estratificación. Por otra parte, los procesos de mortalidad y la pérdida de hábitat pueden acentuarse con la proliferación de algas tóxicas en la comunidad fitoplanctónica.

La Tabla (3) muestra los principales efectos toxicológicos que producen efectos ecológicos.

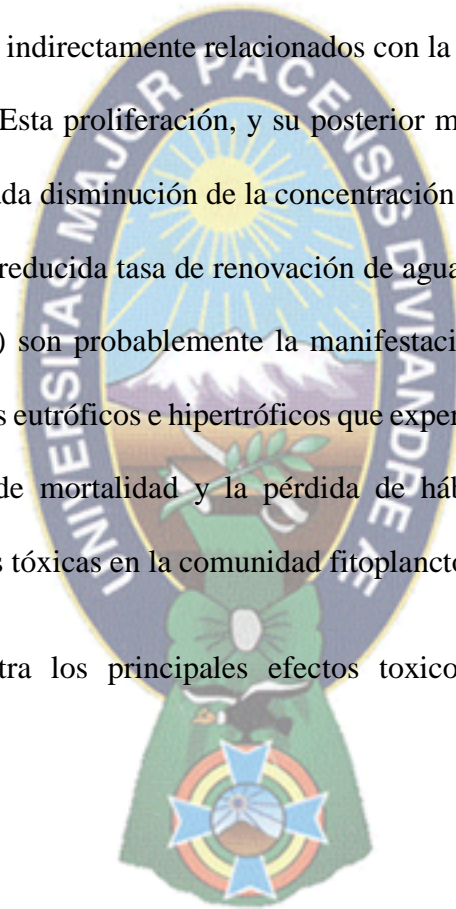


Tabla 3. Principales efectos ecológicos y toxicológicos de la eutrofización cultural

EFFECTOS ECOLÓGICOS Y TOXICOLÓGICOS
<ul style="list-style-type: none">• Incremento de la biomasa de los productores primarios (proliferación de algas tóxicas en ciertas situaciones).• Reducción de la transparencia y la disponibilidad de luz.• Aumento de la materia orgánica sedimentada.• Disminución de la concentración de oxígeno disuelto en las aguas del fondo y los sedimentos.• Formación de compuestos reducidos (H_2S, por ejemplo) en las aguas del fondo y los sedimentos.• Cambios (aumento o disminución) en la biomasa de los productores secundarios.• Disminución de la diversidad de especies en las comunidades de productores primarios y secundarios.

Fuente: (Camargo J. , 2005)

2.3.3 Toxicidad del amonio-amoniaco

El amoniaco ionizado o ión amonio (NH_4^+) y el amoniaco no ionizado (NH_3) se encuentran estrechamente relacionados a través del equilibrio químico. Las concentraciones relativas de NH_4^+ y NH_3 dependen básicamente del pH y la temperatura

del agua (Russo, 1985), a medida que los valores de pH y temperatura aumentan, la concentración de NH_3 también aumenta pero la concentración de NH_4^+ disminuye.

El amoníaco no ionizado es muy tóxico para los animales acuáticos, en especial para los peces, mientras que el ión amonio es apreciablemente mucho menos tóxico. La acción tóxica de NH_3 puede ser debida a una o más de las siguientes causas: (1) destrucción del epitelio branquial; (2) estimulación de la glucólisis y supresión del ciclo de Krebs; (3) inhibición de la producción de ATP y reducción de sus niveles; (4) alteración de la actividad osmorreguladora; (5) disrupción del sistema inmunológico (Camargo J. , 2005).

No obstante, niveles elevados de Na^+ y Ca^{2+} en el medio acuático pueden reducir la susceptibilidad de los animales a la toxicidad del amoníaco (Environment, 2001). Esto explicaría el hecho de que, en general, los animales de agua dulce muestran una menor tolerancia, con ciertos invertebrados (moluscos, planarias) y peces (salmónidos) como los más sensibles.

2.3.4 Efectos sobre los seres humanos

El amoníaco tiene un efecto tóxico en los seres humanos sanos sólo si la ingesta se hace más alta que la capacidad de desintoxicar. Si se administra amoníaco en forma de sus sales de amonio, también deben tenerse en cuenta los efectos del anión. Con el cloruro amónico, los efectos acidóticos del ion cloruro parecen ser de mayor importancia que los del ion amonio (Health, 1989). A una dosis de más de 100 mg/kg de peso corporal por día (33,7 mg de ion amonio por kg de peso corporal por día), el cloruro amónico influye en el

metabolismo cambiando el equilibrio ácido-base, alterando la tolerancia a la glucosa y reduciendo el sensibilidad de los tejidos a la insulina (Environment, 2001).

Además, la eutrofización de las aguas puede favorecer el desarrollo de organismos transmisores o causantes de enfermedades infecciosas. Varios estudios han mostrado una relación directa entre la concentración de nutrientes en las aguas superficiales y la abundancia de mosquitos (vectores potenciales de agentes patógenos productores de enfermedades como la malaria) y la ocurrencia de brotes de cólera (Townsend A. R., 2003).

2.4 CRITERIOS DE CALIDAD DE AGUA

Con el objetivo fundamental de prevenir el fenómeno de la eutrofización cultural en los ecosistemas acuáticos, investigadores y organismos han sugerido o establecido una serie de criterios de calidad del agua con relación a la carga de nutrientes. (Dodds W.K., 1998) Han sugerido límites superiores de nitrógeno total, dentro de los rangos 1,260 – 1,500 mg N_T/L , para prevenir el desarrollo de lagos y ríos eutróficos en regiones templadas del planeta. Similarmente, (US EPA 2002, 2006) ha considerado que niveles superiores a 0,760 mg N_T/L pueden resultar en eutrofización de ríos y lagos.

Para proteger a los animales acuáticos de la toxicidad de los compuestos nitrogenados (amoníaco, nitrito, nitrato), varios criterios de calidad del agua han sido propuestos y recomendados. (EPA, 2006) Y Alonso (2005) han recomendado concentraciones máximas dentro del rango 0,05 – 0,35 mg NH_3-N/L durante exposiciones de corta

duración, y concentraciones máximas dentro del rango 0,01 – 0,1 mg NH₃-N/L durante exposiciones de larga duración, para proteger a las especies más sensibles de la toxicidad del amoniaco.

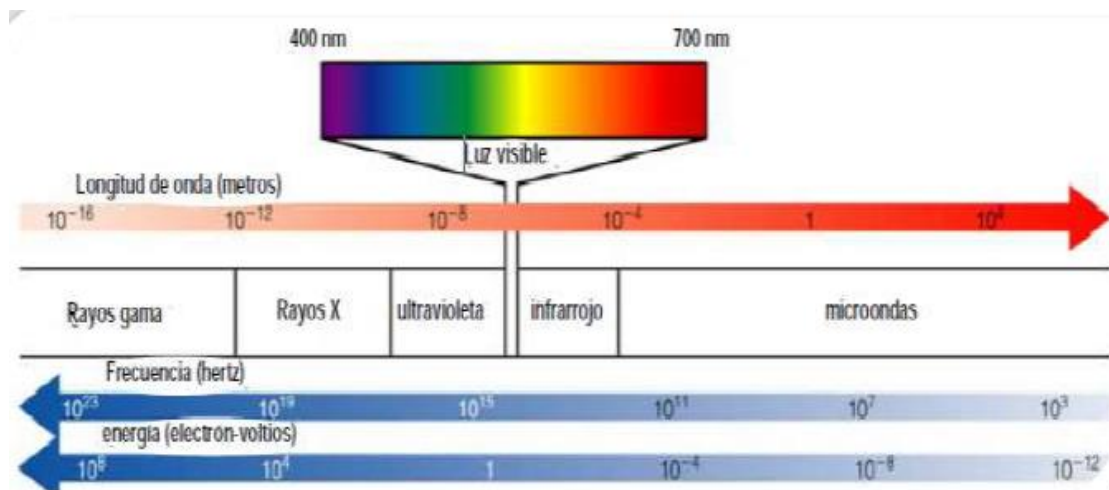
La Norma Boliviana dictada bajo el amparo de la ley de Gestión Ambiental N° 1333, decreto supremo N° 24176 tiene el reglamento en materia de contaminación hídrica (1992), como objetivo la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental, en lo relativo al recurso agua, para salvaguardar y preservar la integridad de las personas, de los ecosistemas y sus interrelaciones y del ambiente en general. La presente norma determina que la contaminación de agua: es la alteración de las propiedades físico - químico y/o biológico del agua por sustancias ajenas, por encima o debajo de los límites máximos o mínimos permisibles. Según corresponda, de modo que produzcan daños a la salud del hombre deteriorando su bienestar o su medio ambiente.

El limite permisible según la norma técnica es la concentración máxima o mínima permitida, según corresponda, de un elemento, compuesto o microorganismo en el agua, para preservar la salud y el bienestar humano y equilibrio ecológico. Los Límites Máximos Permisibles (LMP) para aguas potables según la norma técnica para aguas potables con respecto al amonio de 0,05 mg /L.

El Límite Máximo Permisible de amonio en aguas superficiales para el consumo humano y doméstico que requieren un tratamiento convencional es de 0,5 mg/L.

2.5 ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

Figura 3. Espectro de absorción y cuantificación colorimétrica



La espectrofotometría UV-Visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución, la espectroscopia se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas (Diaz, 2005).

En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano, de 195-400 nm) y el visible (400-780 nm).

La región UV se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm, es una región de energía muy alta. Provoca daño al ojo humano así como quemadura común. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores como pH, concentración de sal y el disolvente que alteran la carga de las moléculas, provocan desplazamientos de los espectros UV. La fuente de radiación ultravioleta es una lámpara de deuterio. En la región visible apreciamos el color visible de una solución y que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite. Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada.

2.5.1 Ley de Beer

De acuerdo con la ley de Beer, la absorbancia **A** está relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente, **c**, y con la longitud de la trayectoria de la radiación en el medio absorbente o camino óptico, **b**. Esto es:

$$A = abc$$

Dónde: **a** es una constante de proporcionalidad llamada absorptividad. Cuando la concentración **c** se expresa en moles por litro, y **b** en centímetros, la constante de proporcionalidad se denomina absorptividad molar, y se designa por el símbolo ϵ , y, puesto

que la absorbancia es una magnitud adimensional, tendrá unidades de L/ cm mol. En este caso, la ley de Beer adquiere la forma:

$$A = \epsilon bc$$

2.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación parte del concepto de la norma NTC/ISO/IEC 17025:2005 es, “La confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.

Un método debe validarse cuando es necesario verificar que sus parámetros de desempeño cumplen en su totalidad la calidad deseada brindando seguridad y respaldo a una investigación analítica; por ejemplo cuando se desarrolla un nuevo procedimiento para solucionar un problema específico, cuando se requiere incorporar mejoras, extenderlo o cuando el control de la calidad indica que dicho procedimiento establecido está cambiando con el tiempo.

Es importante, cumplir las normativas (NB – ISO – IEC 17025) como:

- Optimizar los procesos.
- Asegurar la calidad/mejorar la productividad.
- Reducir costos

2.7 IMPORTANCIA DE VALIDAR UN MÉTODO ANALÍTICO

El laboratorio debe validar métodos no normalizados, métodos diseñados, desarrollados por el laboratorio, métodos normalizados usados fuera de su alcance propuesta y modificaciones de método normalizados para confirmar que los métodos se ajustan al uso propuesto. La validación establece un método y confirma su desempeño de apreciaciones cualitativas por parte del laboratorio en general, realizando mediciones analíticas que diariamente varios laboratorios van desarrollando, por ejemplo: como apoyo en la salud, para verificar los parámetros de calidad de agua para consumo humano, para verificar la composición nutricional en inocuidad alimentaria y evaluación de elementos tóxicos en aguas y alimentos. La validación de métodos analíticos junto con otras actividades englobadas en el área del aseguramiento de la calidad, otorgando confianza en los resultados obtenidos.

2.8 CUANDO REALIZAR UNA VALIDACIÓN

Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que los parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico.

Por ejemplo:

Un nuevo método

Un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema

Cuando el control de calidad indica que el método ya establecido está cambiando con el tiempo

Un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación

Para demostrar la equivalencia para dos métodos, es decir: un método nuevo y uno de referencia.

2.8.1 Métodos No normalizados

Corresponde a métodos desarrollados por laboratorio o métodos nuevos o bien a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.

2.8.2 Métodos Normalizados

Cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no esté normalizado, se puede realizar la validación retrospectiva, es decir, en base a los datos experimentales que el laboratorio dispone, para la cual se realiza la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados, estos datos pueden ser curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control y ensayos de aptitud. A través de esto, se deberán determinar los parámetros de validación, y evaluar si los resultados obtenidos para los fines son aceptables.

En caso de ser un método nuevo se debe realizar una validación prospectiva, generando a través de análisis de datos experimentales.

La verificación, tiene generalmente como objeto, el comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y lo utiliza correctamente, en caso de tratarse de un método normalizado modificado para la verificación se requiere realizar solo aquellas pruebas que indique que la variación realizada no afecta el ensayo.

2.9 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

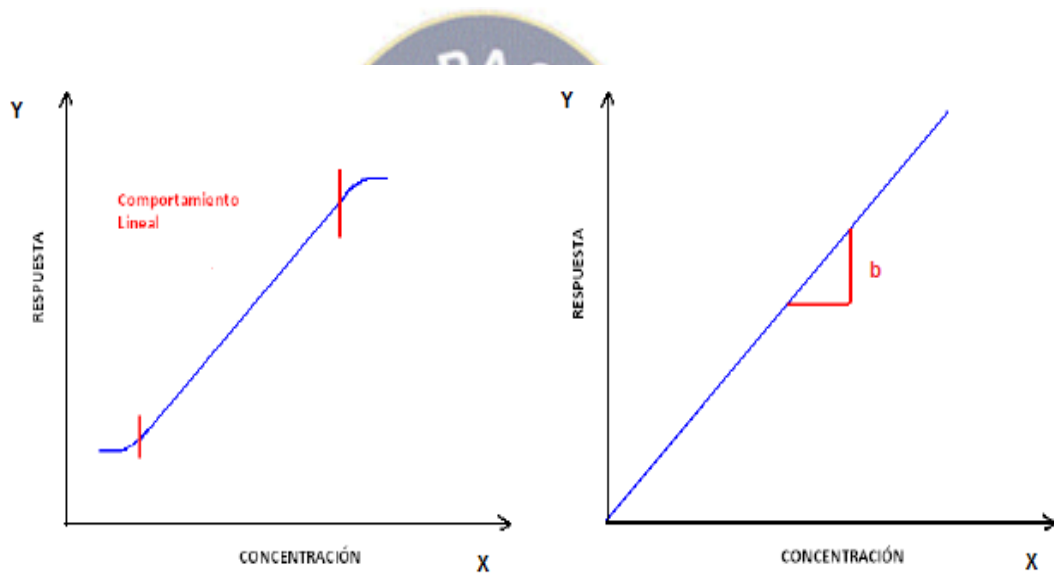
La caracterización de desempeño del método es un proceso costoso pero puede restringirse por consideraciones de tiempo y costo, por tanto el laboratorio decide cuales de los parámetros de desempeño del método necesitan ser evaluados con el fin de validar su método. Los parámetros estudiados para un mejor desempeño del método son mencionados a continuación.

2.9.1 Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método de análisis dentro de un determinado intervalo de dar una respuesta o resultado instrumental que sean proporcionales a la cantidad de analito que se habrá determinar en la muestra de laboratorio. Se la puede realizar mediante un gráfico de concentración versus respuesta también llamado curva de calibración. Se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de valores teóricos conocidos en este sentido se recomienda partir de valores de cero o cercanos al cero y valores superiores.

Después de establecer el comportamiento lineal del método se debe realizar la curva de calibración graficando los datos de concentración de los estándares (X) versus la lectura observada (Y).

Figura 4. Curva de calibración



$$y = a + x * b$$

Ecuación (1)

Evaluar los estimadores de regresión lineal del gráfico: la pendiente (**b**), el coeficiente de correlación (**r**) y el punto de corte o intercepto (**a**) con el eje de las (**y**).

2.9.2 Evaluación de los resultados

Para estimar la bondad con que se ajustan los puntos experimentales a una línea recta, se calcula el **coeficiente de correlación o momento producto (r)**, su valor viene dado por:

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

Ecuación (2)

El coeficiente de correlación (**r**) indica el grado de relación entre la variable concentración (**x**) y la variable respuesta (**y**) de la curva de calibración. Los valores máximos que puede alcanzar son de -1 y 1, el valor máximo de 1 indica una correlación positiva perfecta (entre **x** e **y**). En la práctica si (**r**) tiene un valor cercano a 1 esto significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Para una curva de calibración es recomendable que el coeficiente de correlación obtenida sea mayor o igual a 0,999 aunque para trazas se admite un valor igual o mayor que 0,99.

Adicionalmente como un mejor indicador se puede realizar una evaluación de curva de calibración global, haciendo repeticiones de la curva en las mismas condiciones, realizando una evaluación estadística de prueba t-Student, que es un contraste estadístico para ver si el coeficiente de correlación es realmente significativo, el método de realizarlo es calculando un **t_{exp}** usando la siguiente ecuación.

$$t_{\text{exp}} = \frac{|r| \sqrt{P - 2}}{\sqrt{(1 - r^2)}}$$

Ecuación (3)

La t_{crit} se calcula por medio de tablas con $n-2$ grados de libertad, para el nivel de confianza requerido del 95% ($\alpha = 0.05$), dos-colas, en este caso para un “P” que depende de los niveles de calibración (número de puntos usados en su cálculo).

$H_0: r=0$ No existe correlación entre **X** y **Y** Si $t_{exp} < t_{crit}$

$H_1: r \neq 0$ Existe correlación entre **X** y **Y** Si $t_{exp} > t_{crit}$

Si $t_{exp} < t_{crit}$ Se acepta la hipótesis nula, las variables **X** y **Y** No están relacionadas.

Si $t_{exp} > t_{crit}$ se acepta la hipótesis alterna, las variables **X** y **Y** están relacionadas.

Ya que se ha supuesto que todos los errores se encuentran en **Y** ahora se trata de buscar la recta que minimice las desviaciones en el eje **Y** entre los puntos experimentales y los puntos calculados por la línea, estos son más conocidos como residuos de **Y** como algunas de estas desviaciones serán positivas y negativas es razonable intentar minimizar la **suma de los cuadrados de los residuos** debido a que estos cuadrados serán todos positivos, la línea recta se calcula basándose en este principio que viene a dar por la pendiente de la recta de mínimos cuadrados:

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

Ecuación (4)

Y para el intercepto:

$$a = \frac{\sum y_i - b \cdot \sum x_i}{n} = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

Ecuación (5)

La recta de regresión calculada se utilizara para estimar la concentración de las muestras de ensayo por interpolación. Los errores aleatorios en los valores de la pendiente y ordenada son importantes, en primer lugar se debe calcular el estadístico $S_{y/x}$ (Error típico o desviación estándar residual) que estima los errores aleatorios en la dirección de **Y**.

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{ó} \quad s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - a - b \cdot x_i)^2}{n-2}}$$

Ecuación (6)

\hat{y}_i = Son los valores de **Y** ajustados en la recta.

$S_{y/x}$ mide la calidad del ajuste a comparación de (**r**) es un parámetro cuantitativo y sus unidades son iguales que **Y**.

Las desviaciones estándar de la pendiente y del intercepto vienen dado por:

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ecuación (7)

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ecuación (8)

Estas desviaciones se utilizan para estimar los límites de confianza de la pendiente y de la ordenada, así los límites de confianza de la pendiente viene dado por $\mathbf{b} \pm t_{(n-2)} * \mathbf{Sb}$ donde \mathbf{t} se obtiene para un nivel de confianza deseado, similar los límites de confianza de la ordenada $\mathbf{a} \pm t_{(n-2)} * \mathbf{Sa}$.

El cálculo de un valor de \mathbf{X} a partir de un valor de \mathbf{Y} utilizando la ecuación de la recta con lleva tanto al uso de la pendiente como del intercepto y como ambos valores están sujetos a error, además de errores aleatorios que derivan del instrumento del material de ensayo, como resultado la determinación del error global en la concentración correspondiente es

extremadamente compleja y se utiliza una formula aproximada que estima el error asociado a la concentración calculada por:

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$



Ecuación (9)

s_{x_0} = Desviación estándar para la concentración de la muestra.

$s_{x/y}$ = Desviación estándar en el eje de absorbancias (error típico de la recta).

b = Pendiente de la curva de calibración.

Y_0 = Absorbancia promedio de la muestra.

\bar{Y} = Absorbancia promedio de los patrones

m = Número de repeticiones para obtener Y_0

n = Número de patrones utilizados para obtener la curva de calibración

X_i = Concentraciones de los patrones.

\bar{X} = Concentración promedio de los patrones.

Los límites de confianza para la muestra se calculan como $X_0 \pm t_{(n-2)} * S_{x_0}$.

2.9.3 Evaluar los resultados y eliminar los resultados anómalos

Son resultados que parecen ser inconsistentes comparados con el resto de resultados de una serie de datos, a veces se pueden identificar graficando los datos, aunque es conveniente obtener ensayos estadísticos objetivos que permitan evaluar si realmente son resultados inconsistentes. La identificación de estos datos anómalos es importante ya que alteran la estimación de la media y la desviación estándar.

Una prueba robusta que compara valores extremos con el valor medio y no con sus valores vecinos es la prueba de Grubbs que utiliza la desviación estándar, la cual es una medida de variabilidad más eficiente que el rango.

$$G_{1,1} = \frac{\bar{X} - X_1}{s} \quad \text{ó} \quad G_{1,n} = \frac{X_n - \bar{X}}{s}$$

Ecuación (10)

Se calcula un valor G_1 para el valor más bajo X_1 o más alto de la serie X_n .

Si $G_{1 \text{ cal}} > G_{\text{crit}}$ el resultado de la prueba es significativo y el dato evaluado es inconsistente.

Si $G_{1 \text{ cal}} < G_{\text{crit}}$ se acepta los datos.

Evaluación de Test de Cochran's (c) (prueba de homogeneidad de varianzas).

$$C = \frac{S_{ij}^2 \max}{\sum_{i=1}^n S_{ij}^2}$$

Ecuación (11)

Si $C_{cal} < C_{crit}$ se acepta los datos.

2.9.4 Limite de detección (LOD)

De acuerdo a la Guía EURACHEM (2005), bajo la AOAC, el límite de detección es: “El menor contenido que puede medirse con una certeza estadística razonable. O bien el menor contenido de analito, si está presente, que será detectado y que puede ser identificado”.

El término límite de detección no es aceptado ampliamente aunque se usa en varios documentos sectoriales. La ISO utiliza como un término general “valor mínimo detectable de la variable de estado definida”. De acuerdo a la Guía EURACHEM (2005). El límite de detección no existe criterio de aceptación, ya que depende del propósito de la metodología empleada, pero se puede determinar con la muestra en concentración cercana al blanco.

Se determina a partir de la pendiente de la recta de calibración y de la desviación estándar de la respuesta (S_a).

$$L_{OD} = 3,3 \frac{S_a}{b}$$

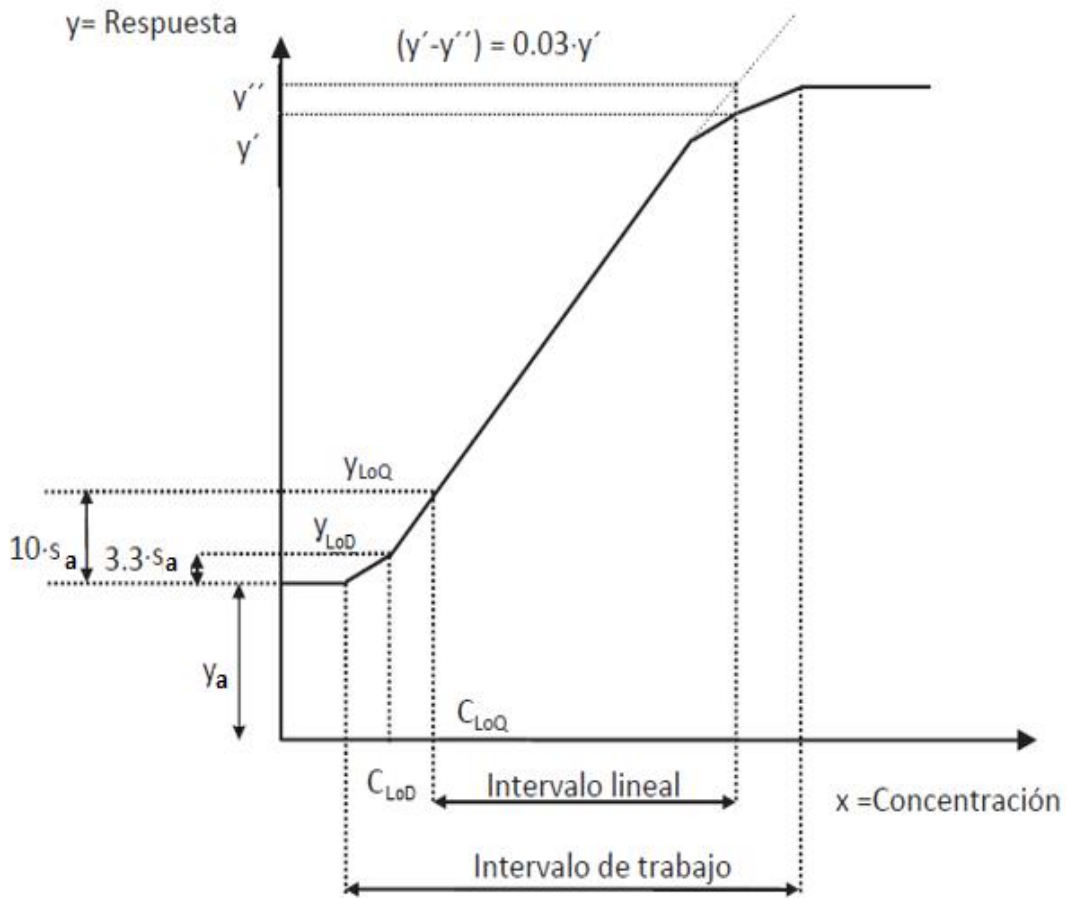
Ecuación (12)

2.9.5 Limite de cuantificación (LOQ)

Generalmente se acuerda la cuantificación como la señal para una concentración igual a diez veces la desviación estándar de la respuesta.



Figura 5. Representación gráfica señal/concentración Eurachem (2011)



El límite de cuantificación (LOQ) estrictamente es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad, veracidad. También se define por diversas convenciones como la menor concentración de analito en una muestra que puede ser determinada con un aceptable nivel de incertidumbre (Guía EURACHEM, 2005).

Se determina a partir de la pendiente de la recta de calibración y de la desviación estándar de la respuesta (S_a).

$$L_{oQ} = 10 \frac{S_a}{b}$$

Ecuación (13)

Si representamos gráficamente la señal analítica obtenida para concentraciones crecientes de analito, al visualizar la curva se comprueba que se divide en tres intervalos.

2.9.6 Selectividad

Capacidad de un método para ser utilizado para determinar análisis particulares en mezclas o matrices, sin interferencias de otros componentes de similar comportamiento IUPAC.

¿Selectividad o especificidad?

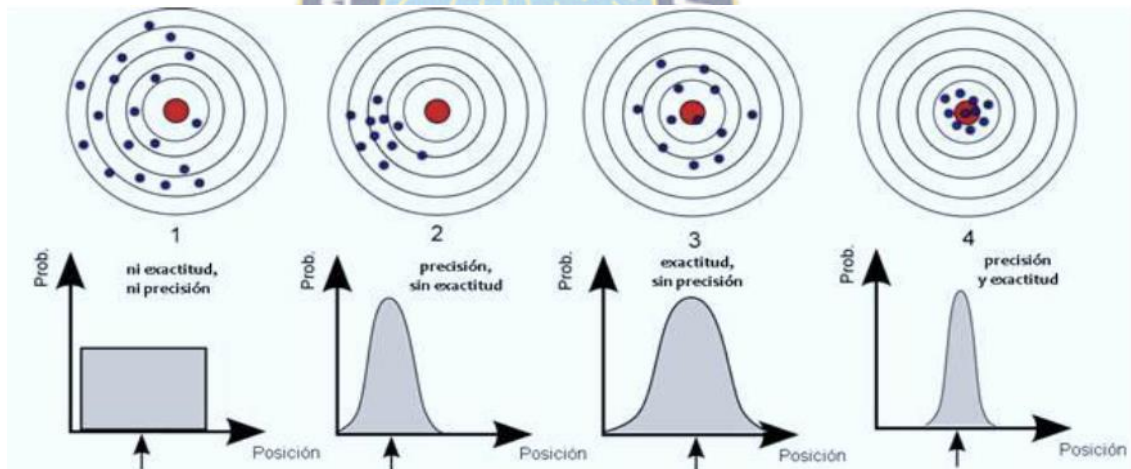
En algunos ámbitos se suele decir que un método es específico cuando sólo responde a un componente y que un método es selectivo cuando es sensible a varios componentes. Otras veces, en cambio, se afirma que la especificidad es equivalente a un 100% de selectividad. En este caso, la especificidad se lograría buscando las condiciones experimentales adecuadas para evitar que los otros componentes de la muestra afecten la determinación del análisis de interés. Sin embargo, el uso del término “especificidad” es no aconsejado por la IUPAC.

La selectividad es validada por la comparación de las inclinaciones de las curvas de adición de patrón.

2.9.7 Precisión

Grado de concordancia entre resultados obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto o de objetos similares, bajo condiciones especificadas. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. Las dos medidas más comunes, que generalmente definen la precisión en términos de la desviación estándar son repetibilidad y la reproducibilidad (Figura 6).

Figura 6. Diagrama de precisión



Fuente: <http://www.scoop.it>

2.9.7.1 Repetibilidad

Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método, mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de los intervalos cortos de tiempo (Rodríguez, 2010).

Se determina realizando al menos diez mediciones bajo las mismas condiciones (mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y corto intervalo de tiempo de un análisis).

Formas de expresarla como desviación estándar (**S**) o coeficiente de variación (**RSD**) que es igual a la desviación estándar relativa.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Ecuación (14)

$$RSD \% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Ecuación (15)

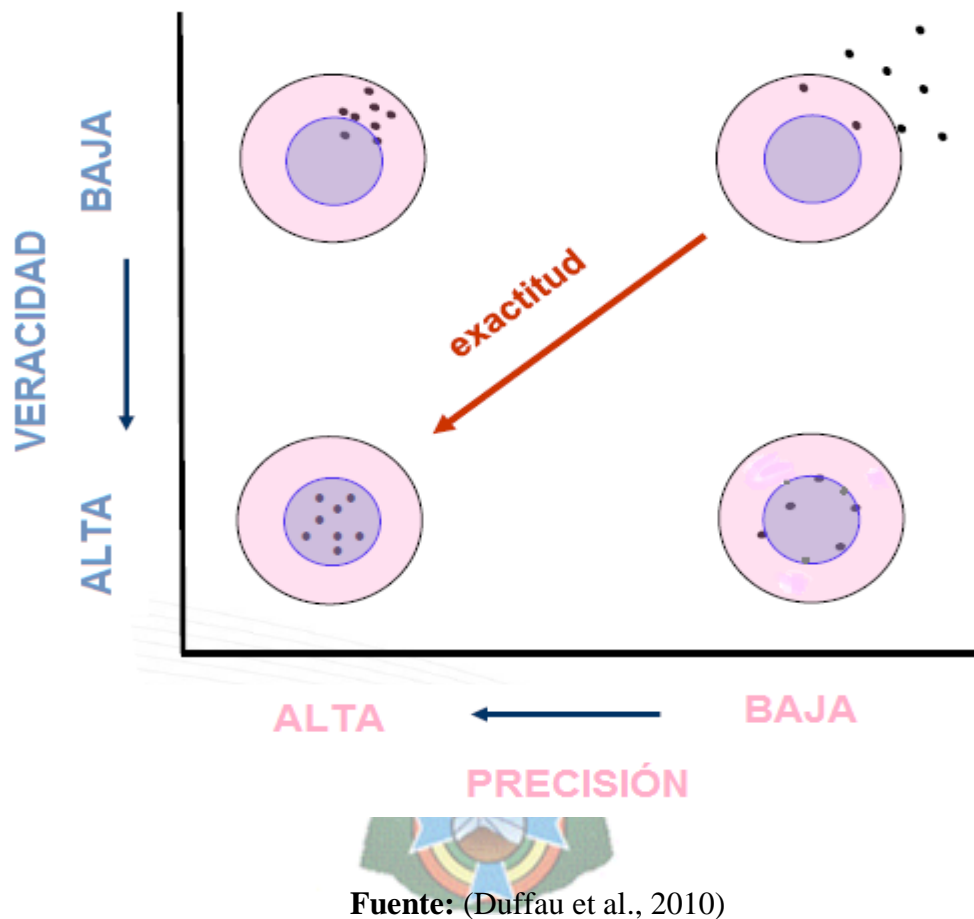
2.9.8 Exactitud

El término “exactitud” está aplicado a un conjunto de resultados de un ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios y un componente común de error sistemático o sesgo.

Al ser aplicado a un método de ensayo, la exactitud se refiere a la combinación de veracidad y precisión. Se puede ejemplificar de acuerdo a la figura 7, los círculos equivalen al rango en que se espera el valor de referencia, y los puntos a los resultados

analíticos. Mientras más veraz y preciso sea, el método tendrá una exactitud alta (EURACHEM (2005)).

Figura 7. Esquema tiro al blanco para definir exactitud



2.9.8.1 Veracidad

Proximidad entre el promedio de un número infinito de resultados y un valor de referencia.

La veracidad puede ser determinada por sesgo o porcentaje de recuperación:

a) Sesgo (S)

La diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o una medición y el valor verdadero. En la práctica el valor convencional de cantidad puede sustituir el valor verdadero. El sesgo es el error sistemático total en contraposición al error aleatorio. Para determinar el sesgo puede utilizarse material de referencia, material fortificado, material control, material ensayo de aptitud: para este fin, se debe medir un analíto de concentración conocido y se determina la diferencia en valor absoluto entre el valor conocido y la media del valor obtenido. Una diferencia sistemática importante en relación al valor de referencia aceptado se refleja en un mayor valor del sesgo, cuanto más pequeño es el sesgo, mayor veracidad indica el método.

$$S = \bar{x}_{\text{exp}} - x_{\text{ref}}$$

Ecuación (16)

\bar{x}_{exp} = Valor medio experimental o valor promedio de las lecturas obtenidas.

x_{ref} = Valor de referencia o valor esperado o valor fortificado.

El estadístico $t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$ entonces no hay evidencia de errores sistemáticos.

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{x}_{\text{exp}} - x_{\text{ref}}| \sqrt{n}}{s_{\text{exp}}}$$

Ecuación (17)

b) Porcentaje de recuperación

Es la fracción de la sustancia agregada a la muestra (muestra fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar. La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original. Por lo cual, la recuperación esta intrínsecamente relacionada a las características de la matriz de la muestra.

Se calcula de la siguiente manera:

$$R = \frac{X_e - X_o}{X_{ref}} \quad \text{o} \quad R = \frac{\bar{X}_{exp}}{X_{ref}}$$

Ecuación (18)

\bar{X}_{exp} = Valor medio experimental entre la muestra fortificada y la muestra sin fortificar.

X_{ref} = Valor de referencia o valor esperado o valor fortificado.

R= Recuperación

X_e = Es la concentración de analito en la muestra fortificada.

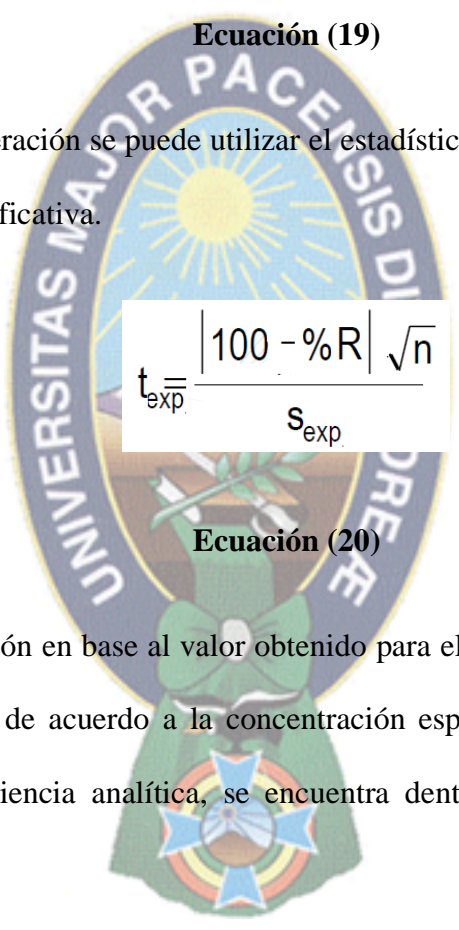
X_o = Es la concentración de analito en la muestra.

Se puede igualmente expresar en porcentaje de recuperación (%R) y se la calcula de la siguiente manera:

$$\% R = R \times 100$$

Ecuación (19)

Para evaluar la recuperación se puede utilizar el estadístico $t_{exp} < t_{crit}$ no hay diferencia estadísticamente significativa.


$$t_{exp} = \frac{|100 - \%R| \sqrt{n}}{s_{exp}}$$

Ecuación (20)

El criterio de aceptación en base al valor obtenido para el porcentaje de recuperación se debe buscar en tabla de acuerdo a la concentración esperada del analito y si él % R obtenido de la experiencia analítica, se encuentra dentro del rango de %R teóricos esperados.

2.9.9 Robustez

La robustez es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método, proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. En este sentido el objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico desarrollado

o implementado por el laboratorio, y describir bajo qué condiciones analíticas (incluidas sus tolerancias), se pueden obtener a través de estos resultados confiables. Para su determinación se puede considerar lo siguiente:

- Conocer las condiciones del medio.
- Definir las condiciones que afectan al método de ensayo.
- Seleccionar el objetivo de evaluación de la conformidad a ser utilizado, muestras referencia y las muestras a determinar.
- Realizar mediciones bajo las condiciones modificadas.

2.9.9.1 Test Younden y Steiner

Para poder determinar qué factores afectan al método se aplica el Test de Younden y Steiner, el cual permite evaluar el efecto de siete variables con sólo ocho análisis de una muestra. Inicialmente se deben identificar aquellos factores del método que posiblemente afectarían los resultados finales factores que pueden afectar: temperatura, composiciones diferentes o soluciones reactivas, pH de solución, tamaño de celda espectrofotométrica, flujo gas acarreador, Split, y otros.

Para estudiar la robustez se procede a exponer a cada factor a un estudio variable, cada variable se estudia mediante un valor alto (A, B, C) y otro bajo (a, b, c). Los factores a estudiar no deben ser necesariamente siete, puede considerarse un número menor de variables, esto no afectará el balance del diseño del experimento, pero es importante

considerar que siempre se deben llevar a cabo las ocho pruebas de ensayo indicado. Los resultados de la experiencia analítica obtenidos con las variaciones realizadas en estas ocho pruebas se representan con las letras s hasta la z.

A partir de los resultados puede calcularse el efecto de cada una de las variables haciendo la media de los cuatro análisis que contienen la variable en su valor más alto (mayúscula) y aquellas que corresponden al valor más bajo (minúscula). Así, para evaluar el efecto de la primera variable obsérvese que:

$$\frac{(s + t + u + v)}{4} = \frac{4A}{4} = A \qquad \frac{(w + x + y + z)}{4} = \frac{4a}{4} = a$$

Es decir, la media de los resultados (s + t + u + v) equivalen a “A” porque las seis restantes variables presentes en estos cuatro resultados se anulan entre sí como consecuencia de que existen siempre dos mayúsculas y dos minúsculas de cada variable. Análogamente, la media de los resultados (w + x + y + z) equivalen a “a”. Para cualquier otra variable se puede proceder de manera similar (Figura 8):

Figura 8. Prueba de Robustez de Younden y Steiner

PARAMETROS		A, a	B, b	C, c	D, d	RESULTADOS
EXPERIMENTOS	1	A	B	C	D	s
	2	A	B	c	D	t
	3	A	B	C	d	u
	4	A	b	c	d	v
	5	a	B	C	d	w
	6	a	b	c	d	x
	7	a	b	C	D	y
	8	a	b	c	D	z

Se deben establecer las siete comparaciones posibles, es decir las diferencias entre la variable de mayor valor versus la de menor valor: $(A - a)$, $(B - b)$, $(C - c)$, $(D - d)$, de este modo se puede conocer el efecto de cada variable. En este sentido, cuanto mayor sea la diferencia de los resultados entre el valor mayor y el valor menor ($\Delta = X-x$), mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico.

Para determinar si las variaciones en el parámetro A por ejemplo, tienen un efecto significativo, se compara la diferencia ($\Delta = X-x$), con, $\sqrt{2}s$ en donde s es la desviación estándar del método en condiciones de repetibilidad.

$$(X-x) < \sqrt{2} s$$

Como la diferencia es menor el parámetro modificado no tiene un efecto significativo, conclusión obtenida con un nivel de confianza del 95%

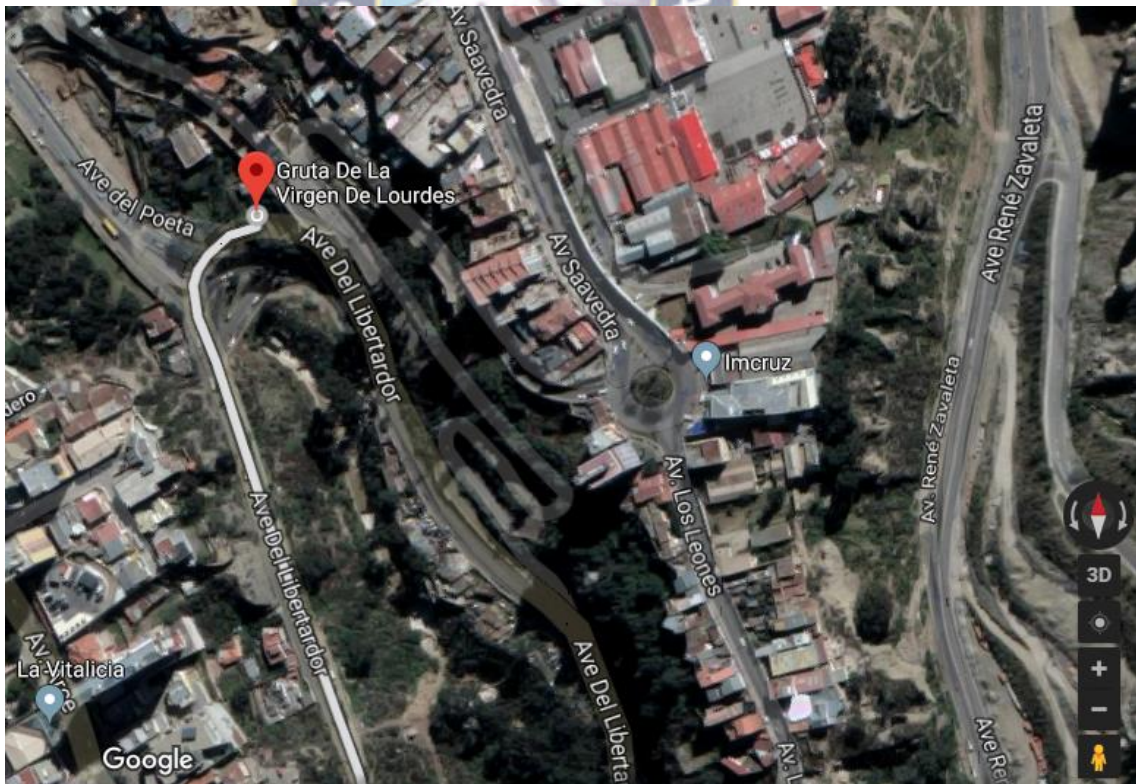
CAPITULO III

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 MUESTREO

La muestra fue recolectada de la vertiente de la gruta de la Virgen de Lourdes que se encuentra ubicada entre la avenida del Poeta y la avenida del Libertador, en la zona sur de la ciudad de La Paz a $16^{\circ}30'41.7''$ latitud Sur y $68^{\circ}07'10.0''$ longitud Oeste.

Figura 9. Zona de la toma de muestra



Fuente: Google maps

Figura 10. Punto de muestreo



Fuente: Propia

3.1.1 Tratamiento de la muestra

El protocolo de muestreo es un proceso específico, diseñado a través de nuestra experiencia del muestreo en campo y se sigue para aprovechar al máximo el tiempo de trabajo, sabiendo con anticipación lo que se va a realizar en la salida de campo y esto se realizó para tomar nuestra muestra.

El apropiado muestreo y medición de campo de ciertos parámetros fisicoquímicos son críticos para determinar resultados de alta calidad y una interpretación confiable de datos.

Antes de iniciar el muestreo se debe empacar adecuadamente todos los materiales y equipos:

- Botellas para muestras.
- Hoja para tomar datos.
- Container para las muestras
- pH- metro y conductímetro de campo.
- Etiquetas.
- Cinta adhesiva.
- GPS

La localización del sitio de muestreo debe ser registrada con tanta precisión como sea posible, usando un sistema de posicionamiento global (GPS), se debe indicar puntos de referencia cercanos al punto de muestreo, si los hay, para luego proceder a las mediciones fisicoquímicas como la conductividad, temperatura y pH.

3.1.2 Toma de la muestra

La toma de la muestra en aguas es una operación delicada, que debe llevarse a cabo con el mayor cuidado, dado que una toma inadecuada puede alterar los resultados analíticos y su interpretación.

3.1.3 Envases para la toma de muestras

De una manera general la muestra debe ser recolectada en envases a utilizar con un tratamiento previo de limpieza y esterilización siguiendo los protocolos de laboratorio, los envases que utilizamos fueron de un litro, de material de plástico opaco que evita que la adsorción ejercida por sus paredes sea mínima sobre cualquiera de los componentes presentes en nuestra muestra además que no reacciona con el amonio, y sellamos herméticamente.

En el momento de tomar la muestra este debe ser homogéneo, los envases deben ser enjuagados tres veces con el agua a analizar y ser llenados completamente sin cámara de aire para no alterar la muestra agregando 0,8 mL de ácido sulfúrico concentrado por litro de muestra que es nuestro agente preservante para el amonio.

3.1.4 Tipos de muestras

- **Muestras simples:** Son las que se toman en un tiempo y lugar determinado para su análisis individual.
- **Muestras compuestas:** Son obtenidas por mezcla y homogenización de muestras simples recogidas en el mismo punto y diferentes tiempos.
- **Muestras integradas:** Son obtenidas por mezcla y homogenización de muestras simples recogidas en puntos diferentes y simultáneamente.

Nuestra muestra fué simple, en dos envases de un litro, medimos in situ parámetros fisicoquímicos como la conductividad 707 uS/cm, pH= 7,7 y temperatura 9,1 °C.

3.1.5 Conservación de la muestra

Los envases que se trasladan deben estar bien selladas, etiquetadas las colocamos en el container que contiene hielo para mantenerlas a temperaturas bajas, en el laboratorio deben ser guardadas en el refrigerador a 4 °C para analizar amonio máximo durante los 28 días resguardados con el agente preservante recomendado por EPA. (2006) “Criterios nacionales de calidad del agua recomendados”

3.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Esta investigación fue de tipo experimental cuantitativa y estadística.


Previamente se realizó una consulta de la teoría de la validación y de los métodos que se utilizaron para la determinación espectrofotométrica de amonio, en aguas naturales, basados en métodos normalizados Standard Methods del APHA, además de los publicados en libros estadísticos, libros de Química Instrumental, en internet, en documentos legales como la Norma Boliviana dictada bajo el amparo de la ley de Gestión Ambiental N° 1333 Requisitos Agua Potable.

Se procedió a la recolección de datos producidos por la muestra, en el Laboratorio de Calidad Ambiental (L.C.A.) y se realizaron los cálculos y tratamientos estadísticos en el programa Microsoft Excel para la elaboración de las tablas y gráficos, de esta manera se validó el método para la determinación de amonio a bajas concentraciones, espectrofotométricamente en aguas naturales e implementarlo en el laboratorio.

3.3 EQUIPOS MATERIALES Y REACTIVOS

Los equipos, Materiales y Reactivos utilizados durante el desarrollo de la investigación son los que se presentan en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Equipos y materiales utilizados



EQUIPO	CARACTERÍSTICAS	UBICACIÓN
Espectrofotómetro UV-VIS	Perkin Elmer Lambda 25	L.C.A.
Espectrofotómetro UV-VIS	CARY (1E)	L.C.A.
Balanza digital	Denver Min 0,001 g. Max 210g.	L.C.A.
Estufa	Memmert Max 110°C	L.C.A.

MATERIALES	CARACTERÍSTICAS	UBICACIÓN
2 Matraces aforados de 100 mL	Tipo A	L.C.A.
7 Matraces aforados de 10 mL	Tipo A	L.C.A.
Micro pipeta de 1000 uL	Eppendorf	L.C.A.
Micro pipeta de 100 uL	Eppendorf	L.C.A.
3 Vasos de precipitados de 50 mL	KIMAX	L.C.A.

Tabla 5. Reactivos químicos utilizados en la investigación

REACTIVOS	CARACTERÍSTICAS	APLICACIÓN
Sulfato de amonio	MERCK p.a.	Curva de calibración
Tartrato de sodio y potasio (Sal de Rochela)	Heinz Abendroth p.a.	Inhibidor de precipitaciones de iones residuales de calcio y magnesio

Hidróxido de sodio	MERCK p.a.	Para el reactivo de Nessler
Ioduro de potasio	Winkler p.a.	Para el reactivo de Nessler
Ioduro mercuríco	MERCK p.a.	Para el reactivo de Nessler

3.4 METODOLOGÍA ANALÍTICA

Para el procedimiento analítico todos los materiales de vidrio utilizados en el laboratorio fueron lavados con agua destilada, posteriormente se dejaron durante toda la noche en ácido clorhídrico al 10% (para evitar posible contaminación) y antes de ser usados se lavaron tres veces con agua destilada y tres veces con agua des-ionizada (Milli.Q), así mismo todas las soluciones fueron preparadas con agua Milli.Q.

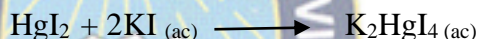
3.4.1 Determinación de amonio por espectroscopia UV-VIS

El método de nesslerización se utiliza directamente a la muestra, el reactivo de Nessler (Iodomercuriato potásico) en medio alcalino al combinarse con nitrógeno amoniacal forma un complejo de color amarillo a pardo a medida que aumenta la concentración de amonio, pero antes de utilizar este reactivo se debe agregar una solución de sal de Rochelle

a las muestras para inhibir las precipitaciones de iones residuales de calcio y magnesio, en una cubeta de 1 cm de recorrido de luz se mide con una sensibilidad aceptable a una longitud de onda de 410 nm.

3.4.1.1 Preparación del reactivo Nessler

Solución A: En un vaso de precipitado pesar 0,7 g de Ioduro de potasio (KI) y disolver completamente en 5 mL de agua Milli.Q, una vez disuelto agregar lentamente y agitando 1 g de Ioduro mercúrico (HgI_2) hasta disolverlo, la solución tiene una coloración amarilla.



El producto es el tetra Ioduro mercuriato II de potasio, el reactivo limitante en esta reacción es el Ioduro de potasio (KI) que deja una pequeña porción sin reaccionar de Ioduro mercúrico (HgI_2) estos rastros son precipitados que se separan por decantación.

Solución B: En un vaso de precipitado pesar 1,6 g de Hidróxido de sodio (NaOH) y agregar 5 mL de agua Milli.Q, la reacción es exotérmica así que agitar suavemente hasta disolver completamente, una vez disuelto dejar enfriar.

Una vez que estén preparadas ambas soluciones agregar lentamente y agitando la **Solución A** en la **Solución B**, esta nueva solución es el reactivo de Nessler que no presenta precipitados y tiene una coloración amarilla, guardar en un envase ámbar.



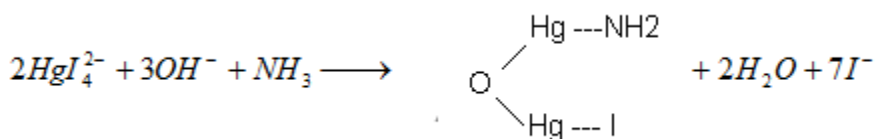
Esta reacción da el medio fuertemente alcalino del reactivo de Nessler.

3.4.1.2 Preparación de la solución de Tartrato de sodio y potasio (Sal de Rochela)

En un vaso de precipitado pesamos 5 g de Tartrato de sodio y potasio (Sal de Rochela) ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), agregamos 10 mL de agua Milli.Q, agitamos hasta disolver, y lo llevamos a calentar hasta la ebullición para eliminar cualquier residuo de nitrógeno que tuviera la sal, evaporamos 3 mL de agua, dejamos enfriar para luego aforar con agua Milli.Q a 10 mL.

3.4.1.3 Descripción de la técnica espectrofotométrica del reactivo de Nessler para la cuantificación de amonio

La técnica de Nessler se basa en la reacción coloreada producido entre el reactivo de Nessler (Iodomercuriato potásico) y el amonio en un medio alcalino generando un compuesto coloreado amarillo-naranja susceptible de medida colorimétrica cuya intensidad es proporcional a la concentración de amonio, y en grandes concentraciones se forma un precipitado de color naranja.



El espectrofotómetro UV-VIS utilizado para el método fue Perkin Elmer, la primera etapa consistió en realizar un barrido del espectro formado por el complejo entre el amonio y el reactivo de Nessler en la región de 300 – 500 nm. La longitud de onda máximo de trabajo en el cual absorbe el complejo fue de 410 nm. Utilizando la concentración intermedia de

nuestra curva de 0,6 mg/L NH_4^+ . Posteriormente se miden las absorbancias de las soluciones patrones preparados para la curva de calibración y evaluar el comportamiento lineal.

Figura 11. Barrido del espectro formado por el complejo entre el amonio y el reactivo de Nessler en la región de 300 – 500 nm



Fuente: Propia

3.4.1.4 Preparación de la solución patrón de amonio para la curva de calibración

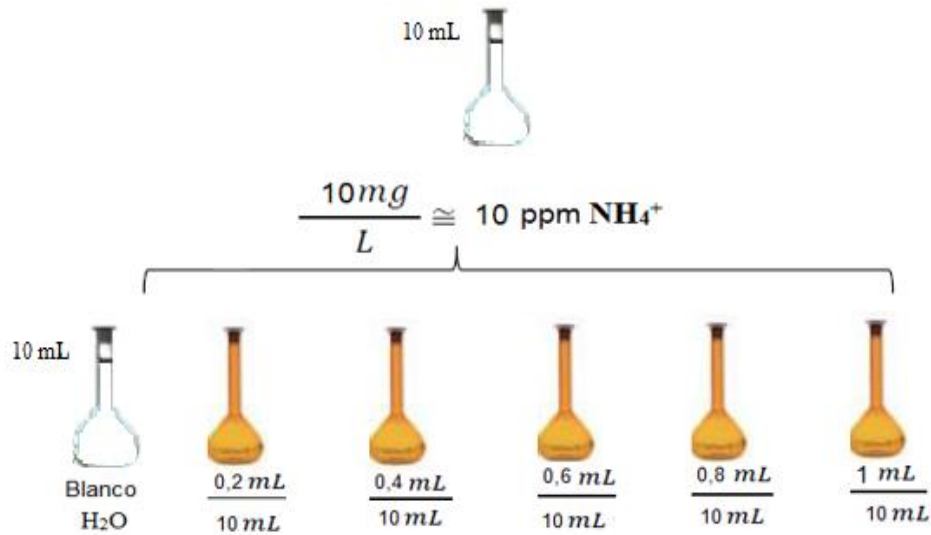
En la preparación de la solución madre de amonio se utilizó un estándar secundario de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ Merck p.a. Antes de utilizar la sal este se llevó a la estufa que se programó hasta que alcanzara 110°C , a partir de esa temperatura se mantuvo la sal por dos horas, para posteriormente sacarlo y llevarlo al desecador.

Se pesó con exactitud 0,36667 g de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ que se transfirió inmediatamente a un matraz aforado de 100 mL y se disolvió con agua Milli.Q hasta el aforo, obteniendo así una concentración madre en amonio de $1000 \text{ mg NH}_4^+ / \text{L}$ o 1000 ppm NH_4^+ .

De la solución madre se extrae 1 mL que se transfirió inmediatamente a un matraz aforado de 100 mL y se disolvió con agua Milli.Q hasta el aforo, obteniendo así una concentración en amonio de $10 \text{ mg NH}_4^+ / \text{L}$ o 10 ppm NH_4^+ .

Luego se preparó a partir de la solución de $10 \text{ mg NH}_4^+ / \text{L}$, las cinco concentraciones para la curva de calibración, siendo de 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - $1,0 \text{ mg NH}_4^+ / \text{L}$. Estas soluciones fueron aforadas en matraces de 10 mL con agua Milli.Q, y se agitaron en forma manual por 2 minutos, posteriormente se agregan 20 uL de sal de Rochelle a las soluciones de amonio y se agitan por 1 minuto, finalmente se agrega a las soluciones 300 uL del reactivo de Nessler se agita en forma manual se espera unos 10 minutos para que desarrolle el color amarillo y se lee en el espectrofotómetro en sentido creciente de concentración por duplicado a una longitud de onda de 410 nm.

Figura 12. Esquema de la preparación de la curva de calibración de amonio



3.4.2 Determinación de la linealidad

Para determinar la linealidad del método se realizan los siguientes pasos:

- Se preparan curvas de calibración de un rango de concentración (0 – 1 mg/L de NH₄⁺), con el objetivo de obtener un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,999.
- Utilizando los criterios de parámetros de validación - linealidad, se realizan 20 lecturas de cada concentración por duplicado preparadas de forma independiente.
- Se calcula el coeficiente de correlación, intercepto, pendiente Test de Cochran's, Test de Grubbs y correlación lineal significativa (t_r).

3.4.3 Determinación del límite de detección y cuantificación

Para determinar el límite de detección y de cuantificación del método espectrofotométrico empleado se realizaron las determinaciones de la regresión lineal y se calculó a partir de los datos de estudio de linealidad, usaremos las ecuaciones (12) y (13).

3.4.4 Determinación de la selectividad

Para determinar la selectividad, probamos si es selectivo el método para la determinación de amonio en presencia de varios componentes de la matriz.

- Preparamos un grupo de muestra que contiene la matriz con la misma adición de amonio para cada nivel de concentración que se preparó para la linealidad del sistema.
- Preparamos otro grupo de muestra que no contiene la matriz con la misma adición de amonio para cada nivel de concentración que se preparó para la linealidad del sistema.
- Se realizaron tres replicas por nivel de concentración en cada grupo.
- La selectividad es validada por la comparación de inclinaciones de las curvas de adición de patrón.
- Los cálculos que realizamos es la t- Student para igualdad de inclinaciones.

3.4.5 Determinación de la precisión

Para la determinación de la precisión se realizó en función de la repetibilidad.

- Se determinó la concentración de la muestra realizando diez replicas en dos diferentes días.
- Considerar para la repetibilidad la misma muestra, el mismo laboratorio, el mismo material, los mismos reactivos, las mismas condiciones ambientales y el mismo analista.
- Los cálculos que realizamos es la prueba de Fischer usada para comparar las varianzas.

3.4.6 Determinación de la exactitud

Para determinar la exactitud lo realizamos en función de la precisión más la veracidad.

- Preparamos un grupo de muestra que contiene la matriz y determinamos su concentración realizando diez replicas.
- Preparamos un grupo de muestra que contiene la matriz y fortificamos con 0,6 mg/L de NH_4^+ realizando diez replicas y determinamos sus concentraciones.
- Calculamos el porcentaje de recuperación.

3.4.7 Determinación de la robustez

Para el estudio de la robustez se procede a exponer a cada factor a un estudio de cuatro variables, es decir se expone a una variación respecto a la establecida en el método analítico con ocho pruebas de ensayo para cada variable, para esta determinación se aplica el Test de Younden y Steiner y determinamos si las diferencias tienen un efecto

significativo, con $\sqrt{2s}$ en donde s es la desviación estándar del método en condiciones de repetibilidad. Para la selección de las variables de estudio, se toma en cuenta:

- Volumen del estabilizador [uL]
- Volumen del revelador [uL]
- Tiempo de revelado [min]
- Diferente equipo espectrofotométrico UV-Vis



CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Evaluamos los puntos de la recta, veinte replicas por duplicado para cada concentración con el test de Grubbs (G) ecuación (10) que detectan valores discrepantes de su valor medio y con el Test de Cochran's (C) ecuación (11) evaluamos la prueba de homogeneidad de varianzas.

4.1 EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DE LOS PUNTOS DE CALIBRACIÓN USANDO EL ESTADISTICO TEST DE GRUBBS (G) Y TEST DE COCHRAN'S (C)

Para el test de Grubbs (G) utilizamos la ecuación (10)

$$G_{1,1} = \frac{\bar{X} - X_1}{s} \quad \text{ó} \quad G_{1,n} = \frac{X_n - \bar{X}}{s}$$

Se calcula un valor G_1 para el valor más bajo X_1 o más alto de la serie X_n .

Para el test de Cochran's (C) Utilizamos la ecuación (11)

$$C = \frac{S_{ij}^2 \max}{\sum_{i=1}^n S_{ij}^2}$$

Prueba de homogeneidad de varianzas.

Tabla 6. Datos experimentales de absorbancia de 0,20 mg NH₄⁺/L. Cálculo del estadístico (G) y el estadístico (C)

1	DATOS EXPERIMENTALES DE ABSORBANCIA				PROMEDIO DE LAS FILAS	G GRUBBS ecuación 10	G TABLAS 95%	EVALUACION $G_{cal} < G_{tab}$
	0,20 mg de NH ₄ ⁺ /L	0,0311	0,0308	0,0395	0,0390	0,03510	0,896	1,481
0,0310		0,0310	0,0393	0,0389	0,03505	0,865	1,481	ACEPTADO
0,0398		0,0353	0,0314	0,0355	0,035	1,192	1,481	ACEPTADO
0,0396		0,0352	0,0314	0,0353	0,03538	1,186	1,481	ACEPTADO
0,0350		0,0353	0,0351	0,0352	0,0352	1,162	1,481	ACEPTADO
PROMEDIO FINAL					0,03523			
DESVIACION ESTANDAR					0,0001905			

1	DATOS EXPERIMENTALES DE ABSORBANCIA				D.S. S	D.S. S ²	C Cochran's ecuación 11	C TABLA 95 %	EVALUACIÓN $C_{cal} < C_{tab}$
	0,20 mg de NH ₄ ⁺ /L	0,0311	0,0308	0,0395	0,0390	0,00480	0,000023	0,3388	0,6287
0,0310		0,0310	0,0393	0,0389	0,00468	0,000022			
0,0398		0,0353	0,0314	0,0355	0,00343	0,000012			
0,0396		0,0352	0,0314	0,0353	0,00335	0,000011			
0,0350		0,0353	0,0351	0,0352	0,00013	2E ⁻⁸			
SUMA					6,794E ⁻⁵				

Tabla 7. Datos experimentales de absorbancia de 0,40 mg NH₄⁺/L. Cálculo del estadístico

(G) y el estadístico (C)

2	DATOS EXPERIMENTALES DE ABSORBANCIA				PROMEDIO DE LAS FILAS	G GRUBBS ecuación 10	G TABLAS 95%	EVALUACION $G_{Ca} < G_{tab}$
	0,40 mg de NH ₄ ⁺ /L	0,0642	0,0640	0,0700	0,0685	0,0667	0,881	1,481
0,0641		0,0642	0,0698	0,0686	0,0667	0,871	1,481	ACEPTADO
0,0690		0,0676	0,0680	0,0680	0,0682	0,885	1,481	ACEPTADO
0,0690		0,0676	0,0678	0,0681	0,0681	0,849	1,481	ACEPTADO
0,0686		0,0685	0,0684	0,0684	0,0685	0,783	1,481	ACEPTADO
PROMEDIO FINAL					0,0676			
DESVIACION ESTANDAR					0,0009			



2	DATOS EXPERIMENTALES DE ABSORBANCIA				D.S. S	D.S. S ²	C Cochran's Ecuación ecuación 11	C TABLA 95%	EVALUACION $C_{Ca} < C_{tab}$
	0,40 mg de NH ₄ ⁺ /L	0,0642	0,0640	0,0700	0,0685	0,00304	9E ⁻⁶	0,4891	0,6287
0,0641		0,0642	0,0698	0,0686	0,00296	8,7E ⁻⁶			
0,0690		0,0676	0,0680	0,0680	0,00058	3,4E ⁻⁷			
0,0690		0,0676	0,0678	0,0681	0,00062	3,8E ⁻⁷			
0,0686		0,0685	0,0684	0,0684	0,00010	9,2E ⁻⁹			
SUMA						1,84E ⁻⁵			

Tabla 8. Datos experimentales de absorbancia de 0,60 mg NH₄⁺/L. Cálculo del estadístico

(G) y el estadístico (C)

3	DATOS EXPERIMENTALES DE ABSORBANCIA				PROMEDIO DE LAS FILAS	G GRUBBS ecuación 10	G TABLAS 95%	EVALUACION G _{Ca} I<G _{tab}
0,60 mg de NH ₄ ⁺ /L	0,1001	0,0998	0,1087	0,1050	0,1034	0,845	1,481	ACEPTADO
	0,1000	0,1000	0,1088	0,1049	0,1034	0,803	1,481	ACEPTADO
	0,1050	0,1021	0,1001	0,1001	0,1018	0,744	1,481	ACEPTADO
	0,1048	0,1021	0,1000	0,1002	0,1018	0,798	1,481	ACEPTADO
	0,1000	0,1001	0,1001	0,1002	0,1001	1,225	1,481	ACEPTADO
PROMEDIO FINAL					0,1021			
DESVIACION ESTANDAR					0,0014			

3	DATOS EXPERIMENTALES DE ABSORBANCIA				D.S. S	D.S. S ²	C Cochran's ecuación 11	C TABLA 95%	EVALUACION C _{Ca} I<C _{tab}
0,60 mg de NH ₄ ⁺ /L	0,1001	0,0998	0,1087	0,1050	0,00426	1,82E ⁻⁵	0,3889	0,6287	ACEPTADO
	0,1000	0,1000	0,1088	0,1049	0,00426	1,82E ⁻⁵			
	0,1050	0,1021	0,1001	0,1001	0,00232	5,4E ⁻⁶			
	0,1048	0,1021	0,1000	0,1002	0,00223	5,0E ⁻⁶			
	0,1000	0,1001	0,1001	0,1002	0,00008	6,7E ⁻⁹			
SUMA						4,68E ⁻⁵			

Tabla 9. Datos experimentales de absorbancia de 0,80 mg NH₄⁺/L. Cálculo del estadístico

(G) y el estadístico (C)

4	DATOS EXPERIMENTALES DE ABSORBANCIA				PROMEDIO DE LAS FILAS	G GRUBBS ecuación 10	G TABLAS 95%	EVALUACION $G_{Ca} < G_{tab}$
	0,80 mg de NH ₄ ⁺ /L	0,1366	0,1348	0,1380	0,1385	0,1366	0,912	1,481
0,1367		0,1350	0,1381	0,1384	0,1367	0,891	1,481	ACEPTADO
0,1360		0,1358	0,1366	0,1366	0,1360	1,295	1,481	ACEPTADO
0,1360		0,1358	0,1365	0,1365	0,1360	1,296	1,481	ACEPTADO
0,1338		0,1335	0,1341	0,1336	0,1338	1,019	1,481	ACEPTADO
PROMEDIO FINAL					0,1358			
DESVIACION ESTANDAR					0,0012			



4	DATOS EXPERIMENTALES DE ABSORBANCIA				D.S. S	D.S. S ²	C Cochran's Ecuación ecuación 11	C TABLA 95%	EVALUACION $C_{Ca} < C_{tab}$
	0,80 mg de NH ₄ ⁺ /L	0,1350	0,1348	0,1380	0,1385	0,00195	3,82E ⁻⁶	0,4101	0,6287
0,1351		0,1350	0,1381	0,1384	0,00185	3,4E ⁻⁶			
0,1350		0,1358	0,1366	0,1366	0,00077	5,9E ⁻⁷			
0,1352		0,1358	0,1365	0,1365	0,00062	3,9E ⁻⁷			
0,1340		0,1335	0,1341	0,1336	0,00029	8,7E ⁻⁸			
SUMA						8,29E ⁻⁶			

Tabla 10. Datos experimentales de absorbancia de 1,0 mg NH₄⁺/L. Cálculo del estadístico

(G) y el estadístico (C)

5	DATOS EXPERIMENTALES DE ABSORBANCIA				PROMEDIO DE LAS FILAS	G		EVALUACION $G_{Ca} < G_{tab}$
						GRUBBS ecuación 10	TABLAS 95%	
1,0 mg de NH ₄ ⁺ /L	0,1692	0,1689	0,1699	0,1690	0,1692	0,640	1,481	ACEPTADO
	0,1692	0,1690	0,1698	0,1689	0,1692	0,806	1,481	ACEPTADO
	0,1701	0,1691	0,1723	0,1700	0,1701	0,726	1,481	ACEPTADO
	0,1700	0,1691	0,1720	0,1698	0,1700	0,655	1,481	ACEPTADO
	0,1671	0,1670	0,1670	0,1671	0,1671	0,866	1,481	ACEPTADO
PROMEDIO FINAL					0,1691			
DESVIACION ESTANDAR					0,00123			



5	DATOS EXPERIMENTALES DE ABSORBANCIA				D.S.		C		EVALUACION $C_{Ca} < C_{tab}$
					S	S ²	Cochran's ecuación 11	TABLA 95%	
1,0 mg de NH ₄ ⁺ /L	0,1690	0,1689	0,1699	0,1690	0,000469	2,2E ⁻⁷	0,4148	0,6287	ACEPTADO
	0,1692	0,1690	0,1698	0,1689	0,000403	1,6E ⁻⁷			
	0,1690	0,1691	0,1723	0,1700	0,001527	2,3E ⁻⁶			
	0,1691	0,1691	0,1720	0,1698	0,001374	1,9E ⁻⁶			
	0,1671	0,1670	0,1670	0,1671	0,000058	3,3E ⁻⁹			
SUMA					4,58E ⁻⁶				

La evaluación del estadístico (**G**) (Tabla 6 – 10) test de Grubbs $G_{cal} < G_{tab}$ indica que el conjunto de datos individuales para la construcción de la recta de calibración no detecta valores discrepantes o alejados de su valor medio, por lo tanto son aceptados y pertenecen al conjunto de la muestra estadística.

La evaluación del estadístico (**C**) (Tabla 6 – 10) test de Cochran's $C_{cal} < C_{tab}$ indica que los residuos tienen una misma varianza independientemente del valor de nuestra concentración, esta condición de varianza uniforme indica que nuestro método tiene homocedasticidad.

4.2 EVALUACIÓN DE DATOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD

Para la evaluación de la linealidad se prepararon soluciones de cinco concentraciones (0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 -1,0) a cinco replicas por cada concentración, se agregan 20 uL de sal de Rochelle a las soluciones de amonio y se agitan por 1 minuto, finalmente se agrega a las soluciones 300 uL del reactivo de Nessler se agita en forma manual se espera unos 10 minutos para leer a una longitud de onda de 410 nm.

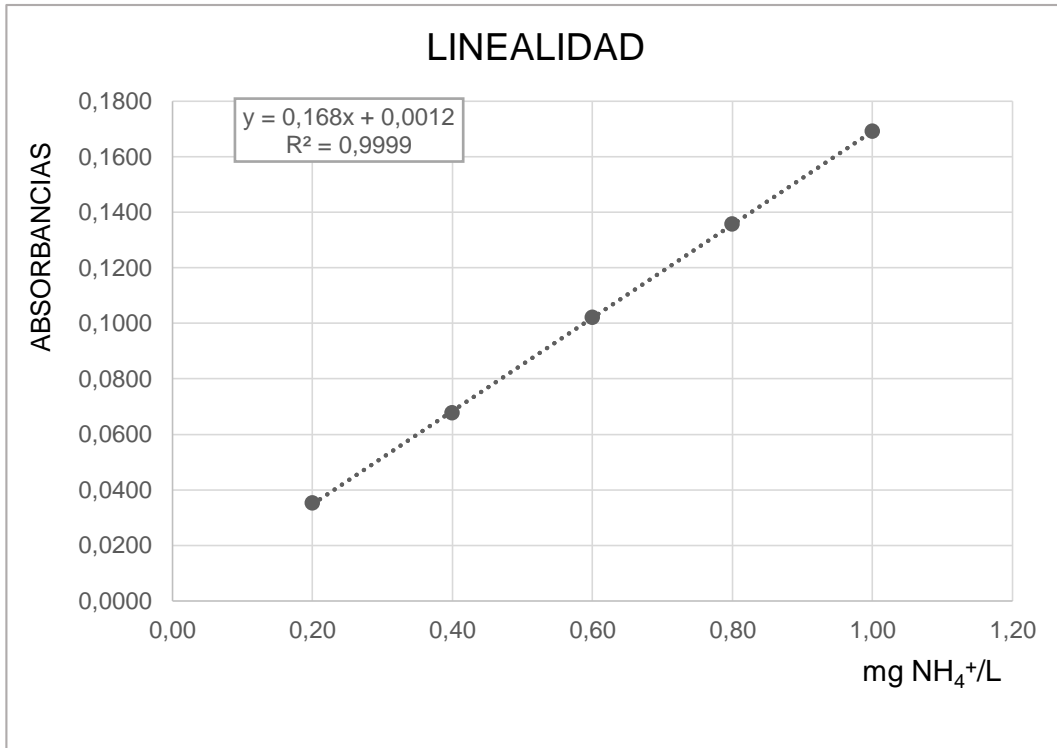
Obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 11. Datos experimentales para la determinación de la linealidad del sistema

NIVEL	CONCENTRACIÓN	ABSORBANCIA
	mg NH ₄ ⁺ /L	
	X	Y
1	0,2	0,0352
2	0,4	0,0676
3	0,6	0,1021
4	0,8	0,1358
5	1,0	0,1691
PENDIENTE b		0,1680
INTERCEPTO a		0,0012
COEFICIENTE DE CORRELACION r		0,9999

Fuente: Elaboración Propia

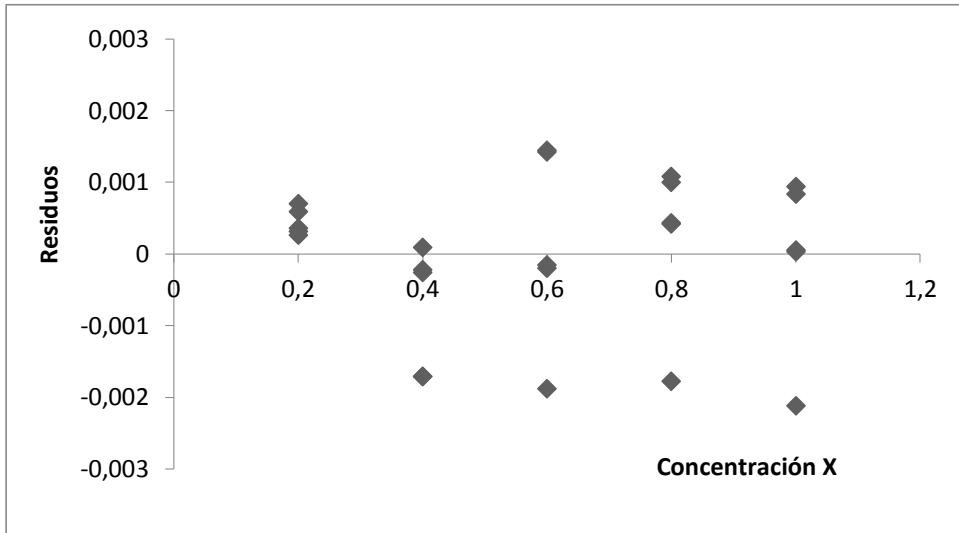
Figura 13. Linealidad de los estándares vs. Absorbancia



Por lo tanto, la ecuación de la curva de calibración, se expresa de la siguiente manera $Y=0,1680x+0.0012$ con $r= 0,9995$ y $r^2 = 0.9995$.

Se utilizó el método de los mínimos cuadrados (Tabla 12), que consiste en ajustar estos parámetros para minimizar la suma de los cuadrados de los residuales y obtener funciones lineales (Figura 14).

Figura 14. Residuos vs. Concentración de la curva de calibración



Fuente: Elaboración Propia

La distribución de los puntos es aleatoria y no refleja ningún patrón demostrando que son independientes o no correlacionados (Figura 14), a partir de residuales se aprecia que para el método analítico por espectrofotometría UV-visible se ajusta bien a los datos, por lo tanto, el sistema es válido.

Tabla 12. Análisis de los mínimos cuadrados de los datos de la linealidad del sistema

CONCENTRACIÓN mg NH ₄ ⁺ /L Xi	ABSORBANCIA Yi	$(X_i - \bar{X})^2$	$(Y_i - \bar{Y})^2$	$(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})$	X_i^2
0,2	0,0351	0,16	0,0045	0,0268	0,04
0,2	0,0351	0,16	0,0045	0,0268	0,04
0,2	0,0355	0,16	0,0044	0,0266	0,04
0,2	0,0354	0,16	0,0044	0,0266	0,04
0,2	0,0352	0,16	0,0045	0,0267	0,04
0,4	0,0667	0,04	0,0012	0,0071	0,16
0,4	0,0667	0,04	0,0012	0,0071	0,16
0,4	0,0682	0,04	0,0011	0,0068	0,16
0,4	0,0681	0,04	0,0011	0,0068	0,16
0,4	0,0685	0,04	0,0011	0,0067	0,16
0,6	0,1034	0	0,0000	0,0000	0,36
0,6	0,1034	0	0,0000	0,0000	0,36
0,6	0,1018	0	0,0000	0,0000	0,36
0,6	0,1018	0	0,0000	0,0000	0,36
0,6	0,1001	0	0,0000	0,0000	0,36
0,8	0,1366	0,04	0,0012	0,0069	0,64

0,8	0,1367	0,04	0,0012	0,0069	0,64
0,8	0,1360	0,04	0,0012	0,0068	0,64
0,8	0,1360	0,04	0,0012	0,0068	0,64
0,8	0,1338	0,04	0,0010	0,0064	0,64
1	0,1692	0,16	0,0045	0,0269	1
1	0,1692	0,16	0,0045	0,0269	1
1	0,1701	0,16	0,0046	0,0273	1
1	0,1700	0,16	0,0046	0,0272	1
1	0,1671	0,16	0,0042	0,0260	1
\bar{X}	\bar{Y}	$\sum (X_i - \bar{X})^2$	$\sum (Y_i - \bar{Y})^2$	$\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})$	$\sum X_i^2$
		Sxx	Syy	Sxy	
0,6	0,1020	2	0,0565	0,3360	11
$\sum X_i$	$\sum Y_i$				
15	2,5494				
$(\sum X_i)^2$	$(\sum Y_i)^2$				
225	6,4995				

Fuente: Elaboración Propia

4.2.1 Test de t-student para la pendiente (b) en el sistema de UV-visible

Para demostrar que existe una pendiente significativamente distinta de cero se aplicó la prueba de t-student, para n-2 grados de libertad = 23 en un nivel de confianza del 95% a dos colas con un grado de significación $\alpha = 0.05$, el valor crítico en la tabla de la distribución t-student es $t_{crit}=2,0687$

Hipótesis:

Ho: $b = 0$ Si $t_{exp} < t_{crit}$

H1: $b \neq 0$ Si $t_{exp} > t_{crit}$

En primer lugar, se debe calcular el estadístico $S_{y/x}$ (Error típico o desviación estándar residual o de la regresión) que estima los errores aleatorios en la dirección de Y, utilizando la ecuación 6 y los valores de la tabla 12.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - a - b \cdot x_i)^2}{n-2}}$$

$S_{y/x} = 0,00107$

Calculamos la desviación estándar de la pendiente (S_b) utilizando la ecuación 7 y los valores de la tabla 12.

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_b = 0,00076$$

Calculamos el estadístico t-student experimental con la fórmula: $t_{exp} = \frac{b}{S_b}$

$$t_{exp} = 221,942001$$

Como $t_{exp} = 221,942001 > t_{crit} = 2,0687$ aceptamos la hipótesis nula comprobando estadísticamente que existe una pendiente diferente de cero, lo que demuestra que existe diferencias significativas.

El intervalo de confianza (IC) para la pendiente se calcula:

$$IC_b = b \pm t_{crit} * S_b \quad IC_b = 0,1680 \pm (2,0687 * 0,00076) \quad IC_b = 0,1696 \text{ a } 0,1664$$

El intervalo de confianza de la pendiente demostrando que no pasa por cero

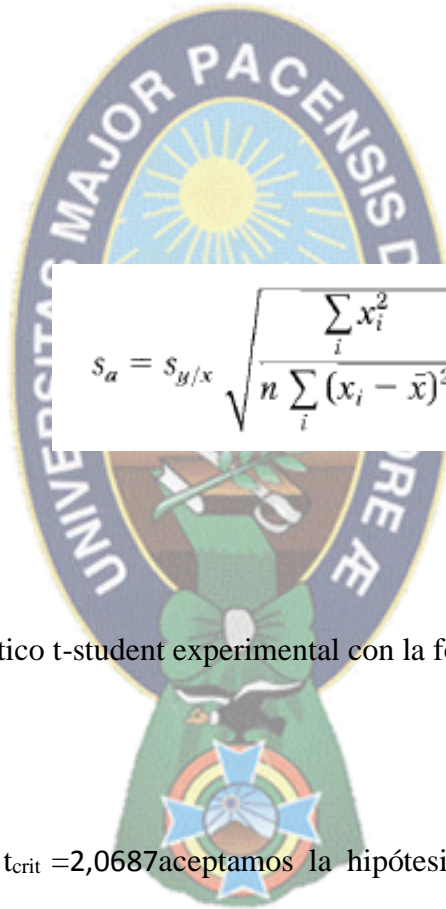
4.2.2 Test de t-student para el intercepto (a) test de proporcionalidad en el sistema

UV-visible

Mediante este test se evaluó que la recta pasa por el origen de coordenadas, determinando que la variable independiente (x) es significativamente distinta de cero y el intercepto pasa por cero. Calculamos el estadístico t-student crítico para n-2 grados de

libertad = 23 en un nivel de confianza del 95% a dos colas y con un grado de significación $\alpha = 0.05$, el valor crítico en la tabla de la distribución t-student es $t_{crit} = 2,0687$.

Hipótesis:



$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$S_a = 0,000502$

Calculamos el estadístico t-student experimental con la fórmula: $t_{exp} = \frac{a}{S_a}$

$t_{exp} = 2,4265$

Como $t_{exp} = 2,4265 > t_{crit} = 2,0687$ aceptamos la hipótesis alterna, comprobando que la variable independiente (x) es significativamente distinta de cero y el intercepto no pasa por cero, la recta no pasa por el origen de coordenadas.

El intervalo de confianza (IC) para el intercepto se calcula:

$IC_a = a \pm t_{crit} * S_a$ $IC_a = 0,0012 \pm (2,0687 * 0,000502)$ $IC_a = 0,00224$ a $0,00016$

El intervalo de confianza confirma lo demostrado por el test de Student donde el intercepto no pasa por cero.

4.2.3 Test de t-student para el coeficiente de correlación (r) test de grado de relación entre la concentración y la respuesta, en el sistema UV-visible

Los valores máximos que puede alcanzar son de -1 y 1, el valor máximo de 1 indica una correlación positiva perfecta (entre x e y). Realizamos una evaluación estadística de prueba t-student, que es un contraste estadístico para ver si el coeficiente de correlación es realmente significativo, para n-2 grados de libertad = 23 en un nivel de confianza del 95% y con un grado de significación $\alpha=0.05$, el valor crítico en la tabla de la distribución t-student es $t_{crit}=2,0687$

Hipótesis:

$H_0: r=0$ No existe correlación entre X y Y Si $t_{exp} < t_{crit}$

$H_1: r \neq 0$ Existe correlación entre X y Y Si $t_{exp} > t_{crit}$

Calculamos el estadístico t-student experimental con la ecuación 3.

$$t_{exp} = \frac{|r| \sqrt{P-2}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

$P=5$ depende de los niveles de concentración (número de puntos usados en su cálculo).

$t_{exp}=79,88$

Como $t_{exp}=79,88 > t_{crit}=2,0687$ aceptamos la hipótesis alterna, comprobando que existe correlación entre **X** y **Y**.

4.3 EVALUACIÓN DEL LIMITE DE DETECCIÓN Y LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

La evaluación del límite de detección y cuantificación se trabajó a partir de los valores:

Tabla 11. Datos experimentales para la determinación de la linealidad del sistema.

NIVEL	CONCENTRACIÓN	ABSORBANCIA
	mg NH ₄ ⁺ /L	
	X	Y
1	0,2	0,0352
2	0,4	0,0676
3	0,6	0,1021
4	0,8	0,1358
5	1,0	0,1691
PENDIENTE b		0,1680
INTERCEPTO a		0,0012
COEFICIENTE DE CORRELACION r		0,9999
DESVIACIÓN ESTANDAR DEL INTERCEPTO Sa		0,000502

Fuente: Elaboración Propia

El límite de detección (LoD) se determina a partir de la pendiente de la recta de calibración y de la desviación estándar de la respuesta (S_a) utilizamos la ecuación 12.

$$L_{oD} = 3,3 \frac{S_a}{b}$$

$$LoD = 3,3 * \frac{0,000502}{0,1680}$$

$$LoD = 0,010$$

Nos indica que la concentración mínima detectable que es de 0,01 mg NH_4^+ /L. Mientras que el límite de cuantificación (LoQ) se determina a partir de la pendiente de la recta de calibración y de la desviación estándar de la respuesta (S_a) utilizamos la ecuación 13.

$$L_{oQ} = 10 \frac{S_a}{b}$$

$$LoQ = 10 * \frac{0,000502}{0,1680}$$

$$LoQ = 0,030$$

Que indica que la concentración más baja del analito que puede ser determinada a un nivel aceptable de precisión y repetibilidad es 0,030 mg NH_4^+ /L.

4.4 EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DEL MÉTODO

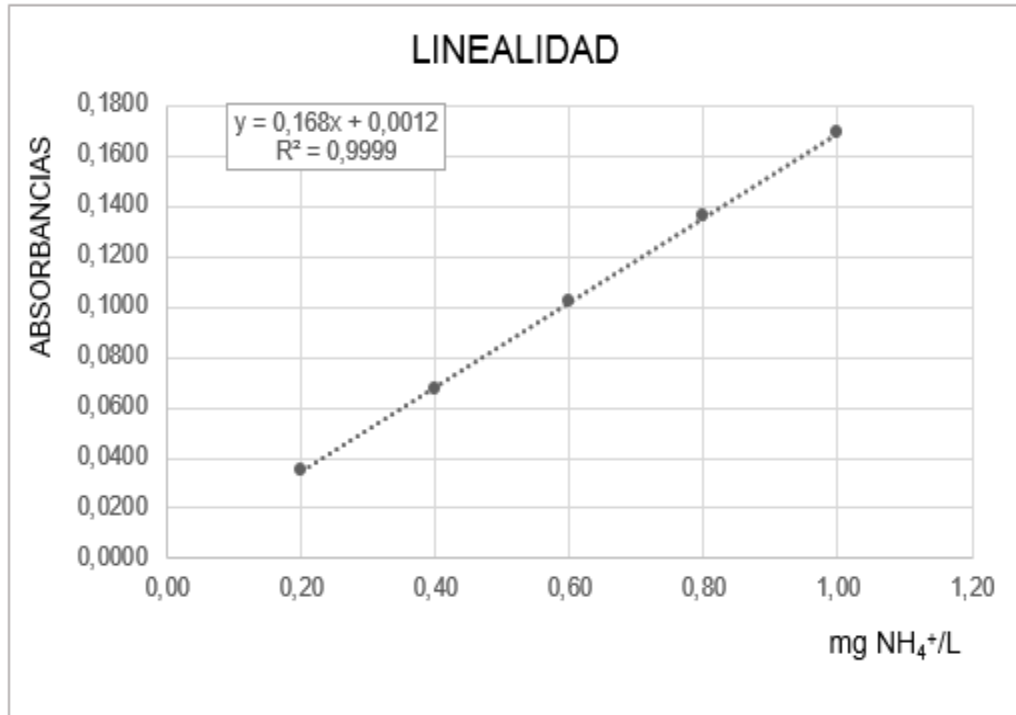
Para la evaluación de la selectividad preparamos dos grupos de muestra uno que tiene la matriz y otro que no contiene la matriz, adicionando la misma concentración de amonio que se utilizó para la linealidad del sistema.

Tabla 13. Análisis de los mínimos cuadrados de datos de la muestra sin matriz

CONCENTRACIÓN mg NH ₄ ⁺ /L	ABSORBANCIA A AGUA + PATRÓN Y _i	CONCENTRACIÓN REAL X _i	(X _i - \bar{X}) ²	\hat{Y}	(Y _i - \hat{Y}) ²
0,2	0,0352	0,2026	0,1579	0,0348	1,8778E-07
0,2	0,0351	0,2020	0,1584	0,0348	1,1111E-07
0,2	0,0353	0,2032	0,1575	0,0348	2,8444E-07
0,4	0,0676	0,3954	0,0419	0,0684	5,9290E-07
0,4	0,0678	0,3966	0,0414	0,0684	3,2490E-07
0,4	0,0675	0,3948	0,0421	0,0684	7,5690E-07
0,6	0,1021	0,6008	0,0000	0,1020	1,6044E-08
0,6	0,1018	0,5990	0,0000	0,1020	3,0044E-08
0,6	0,1024	0,6025	0,0000	0,1020	1,8204E-07
0,8	0,1358	0,8013	0,0405	0,1356	4,9878E-08
0,8	0,136	0,8025	0,0410	0,1356	1,7921E-07
0,8	0,1356	0,8001	0,0401	0,1356	5,4444E-10
1,0	0,1691	0,9995	0,1596	0,1692	6,4000E-09
1,0	0,1705	1,0079	0,1663	0,1692	1,7424E-06
1,0	0,1678	0,9918	0,1535	0,1692	1,9044E-06
INTERCEPTO a	PENDIENTE b1	\bar{X}	$\Sigma (X_i - \bar{X})^2$ calibrado S _{xx}		$\Sigma (Y_i - \hat{Y})^2$ S _{yy}
0,0012	0,1680	0,6000	1,2002		6,3690E-06

Fuente: Elaboración Propia

Figura 15 Linealidad de la muestra sin matriz.



Fuente: Elaboración Propia

Calculamos la desviación estándar relativa (RSD1) con los valores de la tabla 13 y la ecuación:

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

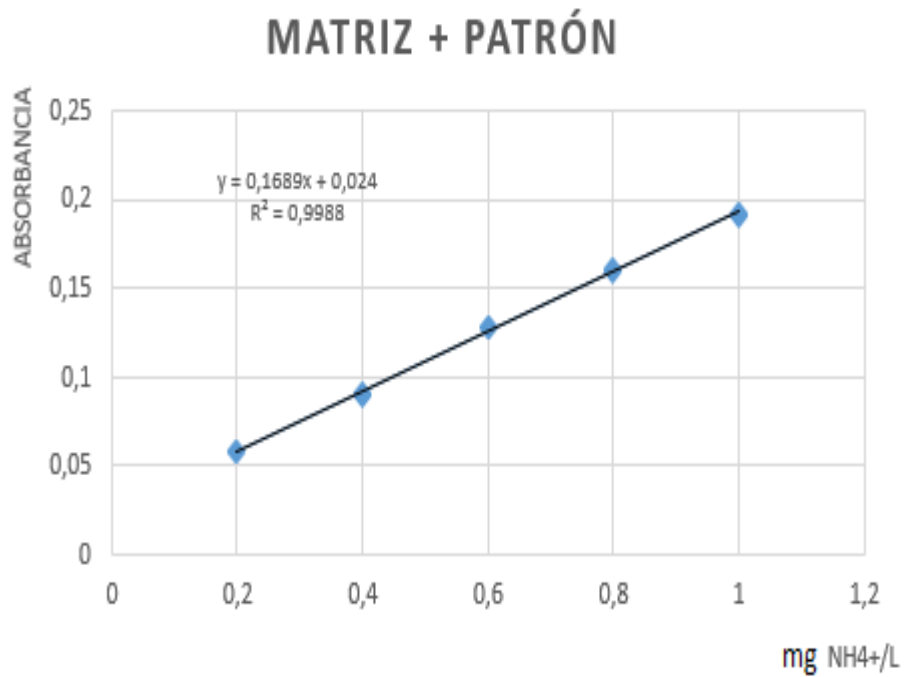
RSD1= 0,0007

Tabla 14. Análisis de los mínimos cuadrados de datos de la muestra con matriz

CONCENTRACIÓN mg NH ₄ /L	ABSORBANCIA MATRIZ + PATRÓN Y _i	CONCENTRACION REAL X _i	(X _i - \bar{X}) ²	\hat{Y}	(Y _i - \hat{Y}) ²
0,2	0,0575	0,1983	0,1614	0,0578	8,2178E-08
0,2	0,0579	0,2007	0,1595	0,0578	1,2844E-08
0,2	0,0572	0,1965	0,1628	0,0578	3,4418E-07
0,4	0,0899	0,3901	0,0441	0,0916	2,7889E-06
0,4	0,0909	0,3960	0,0416	0,0916	4,4890E-07
0,4	0,0888	0,3836	0,0468	0,0916	7,6729E-06
0,6	0,128	0,6157	0,0002	0,1254	7,0048E-06
0,6	0,1283	0,6174	0,0003	0,1254	8,6828E-06
0,6	0,1278	0,6145	0,0002	0,1254	5,9862E-06
0,8	0,1599	0,8045	0,0418	0,1591	5,8268E-07
0,8	0,1596	0,8027	0,0411	0,1591	2,1468E-07
0,8	0,1602	0,8063	0,0426	0,1591	1,1307E-06
1,0	0,1914	0,9910	0,1529	0,1929	2,3104E-06
1,0	0,1918	0,9934	0,1547	0,1929	1,2544E-06
1,0	0,1911	0,9892	0,1515	0,1929	3,3124E-06
INTERCEPTO a	PENDIENTE b2	\bar{X}	$\Sigma (X_i - \bar{X})^2$ adición patrón Sxx		$\Sigma (Y_i - \hat{Y})^2$ Syy
0,0240	0,1689	0,6000	1,2015		4,1829E-05

Fuente: Elaboración Propia

Figura 16. Linealidad de la muestra con matriz.



Fuente: Elaboración Propia

Calculamos la desviación estándar relativa (RSD2) con los valores de la tabla 14 y la ecuación:

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

RSD2= 0,0018

El error estándar (ESD) es calculada a partir del RSD de cada curva con la ecuación:

$$ESD = \sqrt{\frac{GL_1 (RSD_1)^2 + GL_2 (RSD_2)^2}{GL_1 + GL_2}}$$

GL= Grados de libertad

ESD= 0,0014

La selectividad es evaluada por la comparación de las inclinaciones de las curvas de adición patrón, los cálculos que realizamos es la t- Student para igualdad de inclinaciones.

Para demostrar que existe igualdad de inclinaciones se aplicó la prueba de t-student, para $n_1=15$ y $n_2=15$ con datos totales $n_T= 30$ y los grados de libertad $(n-2)$ $GL_1= 13$ y $GL_2= 13$ con grados de libertad totales $GL_T= 26$ en un nivel de confianza del 95% y con un grado de significación $\alpha = 0.05$, el valor crítico en la tabla de la distribución t-student es $t_{crit} = 2,0555$

Hipótesis:

$H_0: b_1 = b_2$ Si $t_{exp} < t_{crit}$

$H_1: b_1 \neq b_2$ Si $t_{exp} > t_{crit}$

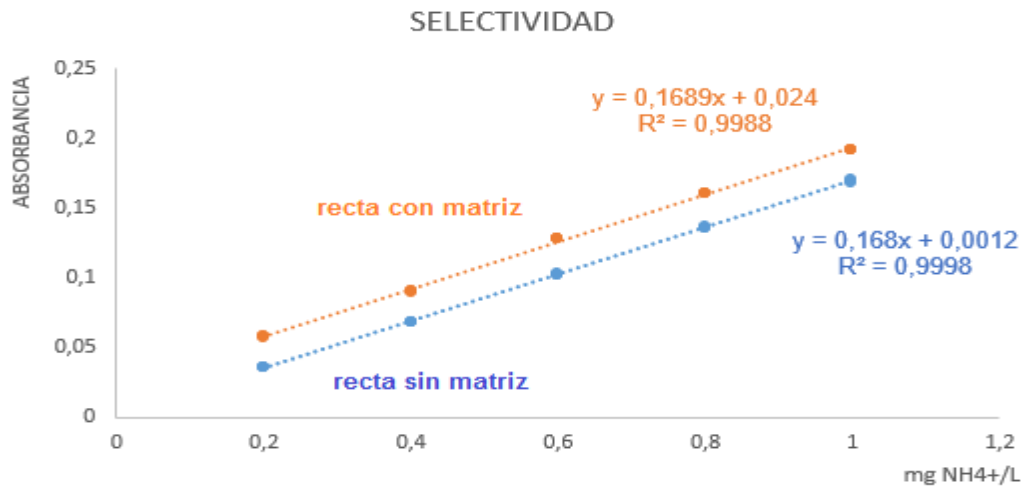
Determinamos el t_{exp} con la siguiente ecuación:

$$t_{exp} = \frac{|b_1 - b_2|}{ESD \sqrt{\frac{1}{S_{xx}(\text{calibrado})} + \frac{1}{S_{xx}(\text{adicion patron})}}$$

$$t_{exp} = 0,5122$$

Como $t_{exp} = 0,5122 < t_{crit} = 2,0555$ aceptamos la hipótesis nula, comprobando que las pendientes son iguales, que no hay efecto de matriz y el método es selectivo.

Figura 17. Selectividad del método de determinación de amonio



Fuente: Elaboración Propia

4.5 EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN

La precisión se evaluará en términos de la repetibilidad, se determinó la concentración de la muestra utilizando la linealidad del sistema, en dos días diferentes a diez replicas.

Tabla 15. Análisis de la repetibilidad determinando la concentración de la muestra

N°	DÍA 1		DÍA 2	
	ABSORBANCIA	mg NH ₄ ⁺ /L	ABSORBANCIA	mg NH ₄ ⁺ /L
1	0,0223	0,1257	0,0224	0,1263
2	0,0224	0,1263	0,0231	0,1304
3	0,0230	0,1298	0,0232	0,1310
4	0,0232	0,1310	0,023	0,1298
5	0,0224	0,1263	0,0224	0,1263
6	0,0231	0,1304	0,0232	0,1310
7	0,0232	0,1310	0,0234	0,1322
8	0,0224	0,1263	0,0232	0,1310
9	0,0223	0,1257	0,0231	0,1304
10	0,0233	0,1316	0,0231	0,1304
		PROMEDIO		PROMEDIO
		0,1284		0,1299
		DESVIACION ESTANDAR S1		DESVIACION ESTANDAR S2
		0,0026		0,0020

Fuente: Elaboración Propia


Para demostrar si existe una diferencia de varianzas entre las series de muestras se aplicó la prueba de Fischer, para $n-1$ grados de libertad = 9 en un nivel de confianza del 95% y con un grado de significación $\alpha = 0.05$, el valor crítico en la tabla de la distribución es $F_{crit} = 3,1789$

Hipótesis:

$H_0: S^2_1 = S^2_2$ Si $F_{exp} < F_{crit}$

$H_1: S^2_1 \neq S^2_2$ Si $F_{exp} > F_{crit}$

Calculamos el F_{exp} con los datos de la tabla 15 y la ecuación:


$$F_{exp} = \frac{S^2_1}{S^2_2}$$

$F_{exp} = 1,6171$

Como $F_{exp} = 1,6171 < t_{crit} = 3,1789$ aceptamos la hipótesis nula, comprobando que las varianzas no son significativamente diferentes.

Como las varianzas son homogéneas se puede determinar la desviación estándar de la repetibilidad combinando ambas desviaciones con la fórmula:

$$S_r = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$$S_r = 0,0024$$

Calculamos la Desviación estándar para la concentración de la muestra.

Tabla 16. Utilizamos los datos de la curva patrón y la curva de la muestra

CURVA PATRÓN					CURVA DE LA MUESTRA	
NIVEL	[mgNH ₄ ⁺ /L] Xi	ABSORBANCIA Yi	(Xi - \bar{X})	(Xi - \bar{X}) ²	ABSORBANCIA	[mg NH ₄ ⁺ /L]
1	0,2	0,0351	-0,4	0,16	0,0223	0,1255
2	0,2	0,0351	-0,4	0,16	0,0224	0,1261
3	0,2	0,0355	-0,4	0,16	0,023	0,1297
4	0,2	0,0354	-0,4	0,16	0,0232	0,1309
5	0,2	0,0352	-0,4	0,16	0,0224	0,1261
6	0,4	0,0667	-0,2	0,04	0,0231	0,1303
7	0,4	0,0667	-0,2	0,04	0,0232	0,1309

8	0,4	0,0682	-0,2	0,04	0,0224	0,1261
9	0,4	0,0681	-0,2	0,04	0,0223	0,1255
10	0,4	0,0685	-0,2	0,04	0,0233	0,1315
11	0,6	0,1034	0	0		
12	0,6	0,1034	0	0		
13	0,6	0,1018	0	0		
14	0,6	0,1018	0	0		
15	0,6	0,1001	0	0		
16	0,8	0,1366	0,2	0,04		
17	0,8	0,1367	0,2	0,04		
18	0,8	0,136	0,2	0,04		
19	0,8	0,136	0,2	0,04		
20	0,8	0,1338	0,2	0,04		
21	1	0,1692	0,4	0,16		
22	1	0,1692	0,4	0,16		
23	1	0,1701	0,4	0,16		

24	1	0,17	0,4	0,16		
25	1	0,1671	0,4	0,16		
	PROMEDIO	PROMEDIO		$\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2$	PROMEDIO	PROMEDIO
	$\bar{X} = 0,6$	$\bar{Y} = 0,10199$		2	$Y_0 = 0,02276$	$X_0 = 0,1284$

Fuente: Elaboración Propia

$$m = 10 \quad n = 25 \quad S_{x/y} = 0,00107 \quad b = 0,1680 \quad t_{crit} = 2,0687$$

La Desviación estándar para la concentración de la muestra se calcula con la ecuación (9)

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_{x_0} = 0,0032$$

El intervalo de confianza para la muestra se calculan como $X_0 \pm t_{crit} * S_{X_0}$.

I.C. de la muestra es $0,1284 \pm 0,01 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$

I.C. es $0,1384 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$ a $0,1184 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$

4.6 EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD

Para evaluar la exactitud del método implica una combinación de componentes de errores sistemáticos (veracidad) y errores aleatorios (precisión).

4.6.1 Veracidad

Para determinar la exactitud lo realizamos en función de la precisión más la veracidad.

- Preparamos un grupo de muestra que contiene la matriz y determinamos su concentración realizando diez replicas.
- Preparamos un grupo de muestra que contiene la matriz y fortificamos con 0,6 mg/L de NH_4^+ (X_{ref}) realizando diez replicas y determinamos sus concentraciones.
- Calculamos el porcentaje de recuperación.

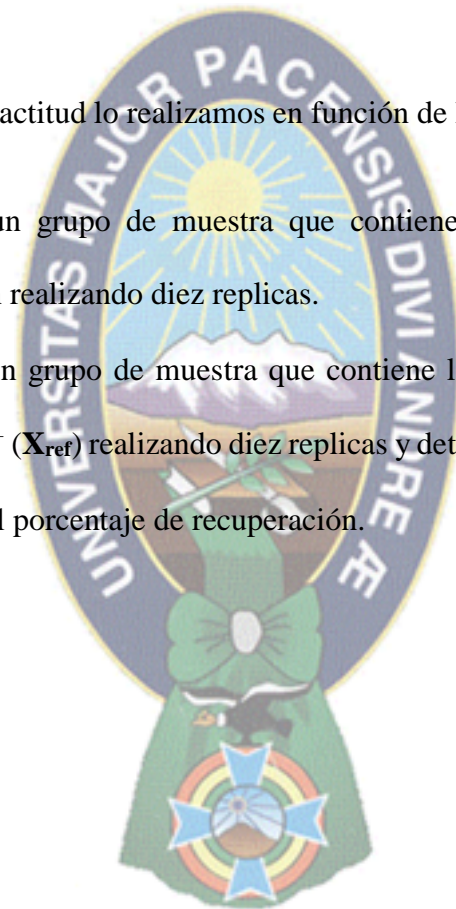


Tabla 17. Análisis de la muestra fortificada $X_{ref} = 0,6 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$

Nº	MUESTRA (M)		MUESTRA FORTIFICADA (F)		DIFERENCIA DE CONCENTRACIÓN $\text{mg NH}_4^+/\text{L}$ (F-M)
	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN $\text{mg NH}_4^+/\text{L}$	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN $\text{mg NH}_4^+/\text{L}$	
1	0,0223	0,1257	0,128	0,7549	0,6265
2	0,0224	0,1263	0,1277	0,7531	0,6247
3	0,023	0,1298	0,128	0,7549	0,6265
4	0,0232	0,1310	0,1279	0,7543	0,6259
5	0,0224	0,1263	0,1278	0,7537	0,6253
6	0,0231	0,1304	0,1279	0,7543	0,6259
7	0,0232	0,1310	0,1281	0,7555	0,6271
8	0,0224	0,1263	0,1278	0,7537	0,6253
9	0,0223	0,1257	0,1279	0,7543	0,6259
10	0,0233	0,1316	0,1279	0,7543	0,6259
		PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL X_0		PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN FORTIFICADA X_e	PROMEDIO x_t
		0,1284		0,7543	0,6259
					DESVIACION ESTANDAR s
					0,0007

Fuente: Elaboración Propia

El criterio de aceptación para el porcentaje de recuperación para métodos espectrofotométricos en mg/L es del 90 - 110 %

Para determinar el porcentaje de recuperación utilizamos la siguiente ecuación:

$$\% R = \left(\frac{X_e - X_o}{X_{ref}} \right) \times 100 \%$$

Donde:

X_e= Concentración del analito en la muestra fortificada

X_o= Concentración del analito en la muestra

X_{ref} = Concentración del analito adicionado en la muestra fortificada

Utilizando la tabla 16 el porcentaje de recuperación es %R= 104,3211%

Como el porcentaje está en el intervalo de confianza del 90 - 110 % hay veracidad del método.

4.6.2 Precisión

El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados para esto utilizamos la ecuación de Horwitz que observó que el coeficiente de variación o desviación estándar relativa (RSD_h) de los valores medios aumentaba a medida que disminuía la concentración del analito.

La ecuación de Horwitz teórico intralaboratorio está definida como:

$$RSD_h = \frac{2}{3} \times 2^{(1 - 0,5 \cdot \log C)}$$

Donde la concentración (c) es de amonio fortificado y está en potencia de diez ($0,6 \times 10^{-6}$) y el resultado nos da en porcentaje, de la ecuación el $RSD_h = 11,52 \%$

Hipótesis:

H₀: La dispersión en la muestra fortificada es adecuada a $0,6 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$

Si $\% RSD_{exp} < RSD_h$

H₁: La dispersión en la muestra fortificada NO es adecuada a $0,6 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$

Si $\% RSD_{exp} > RSD_h$

Determinamos el RSD_{exp} para esto utilizamos los valores de la tabla 16 la diferencia de concentración en $\text{mg NH}_4^+/\text{L}$ y la ecuación:

$$RSD_{exp} = \frac{S}{X_t} * 100\%$$

$RSD_{exp} = 0,1098 \%$


Como $RSD_{exp} = 0,1098 \% < RSD_h = 11,52 \%$ aceptamos la hipótesis nula, la dispersión en la muestra fortificada es adecuada a $0,6 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$. Por lo tanto, el método tiene precisión y veracidad entonces tiene exactitud.

4.7 EVALUACIÓN DE LA ROBUSTEZ

Para poder determinar factores que afectan al método aplicamos el Test de Younden y Steiner, el cual permite evaluar el efecto de cuatro variables con sólo ocho análisis de la muestra, desafiando al método, realizamos variaciones en nuestro proceso analítico.

Se evaluaron los efectos producidos por las siguientes variaciones realizadas en la determinación de la concentración de la muestra:

Tabla 18. Variaciones del proceso analítico



	PARAMETRO	VALOR			
A	Volumen del estabilizador [uL]	A	20	a	60
B	Volumen del revelador [uL]	B	300	b	100
C	Tiempo de revelado [min]	C	10	c	40
D	Diferente equipo espectrofotométrico UV-Vis	D	Perkin Elmer Lambda 25	d	CARY (1E)



Fuente: Elaboración Propia

Los cuatro parámetros a evaluar son (A, B, C y D) cada parámetro se realizó por triplicado y es medido en dos niveles por ejemplo para el parámetro A, “A” es el parámetro sin modificar en el método y “a” es el parámetro modificado en el método.

Tabla 19. Tabla de Younden y Steiner para la evaluación de la robustez

PARAMETRO		Volumen del estabilizador [uL]	Volumen del revelador [uL]	Tiempo de revelado [min]	Diferente equipo espectrofotométrico UV-Vis	RESULTADOS mg NH ₄ ⁺ /L
E X P E R I M E N T O S	1	20	300	10	Perkin Elmer	s = 0,1284
	2	20	300	40	Perkin Elmer	t = 0,1285
	3	20	300	10	CARY (1E)	u = 0,1003
	4	20	100	40	CARY (1E)	v = 0,1199
	5	60	300	10	CARY (1E)	w = 0,1084
	6	60	100	40	CARY (1E)	x = 0,1005
	7	60	100	10	Perkin Elmer	y = 0,1284
	8	60	100	40	Perkin Elmer	z = 0,1285



Fuente: Elaboración Propia

Los efectos producidos por las variaciones en los parámetros se estiman de la siguiente forma:

$$\delta_A = \left(\frac{s+t+u+v}{4} \right) - \left(\frac{w+x+y+z}{4} \right) \quad \delta_B = \left(\frac{s+t+u+w}{4} \right) - \left(\frac{v+x+y+z}{4} \right)$$

$$\delta_C = \left(\frac{s+u+w+y}{4} \right) - \left(\frac{t+v+x+z}{4} \right) \quad \delta_D = \left(\frac{s+t+y+z}{4} \right) - \left(\frac{u+v+w+x}{4} \right)$$

Para determinar si las variaciones tienen un efecto significativo se compara estas diferencias (δ) con $\sqrt{2} * S_r$ en donde S_r es la desviación estándar en condiciones de repetibilidad de nuestro método.

$$|\delta_i| < \sqrt{2} \cdot s_r$$

Si se cumple que la diferencia en el parámetro es menor a raíz de dos por la desviación estándar de la repetibilidad el parámetro modificado no tiene un efecto significativo a un nivel de confianza del 95%. Por lo tanto, la desviación estándar de la repetibilidad de nuestro método es $S_r = 0,0024$

Tabla 20. Evaluación de la robustez

PARAMETRO		δ		$\sqrt{2} * S_r$	¿LAS MODIFICACIONES SON SIGNIFICATIVAS? (nivel de confianza 95%)
A	Volumen del estabilizador [uL]	0,0028	<	0,0033	No sensible a variable, no significativa
B	Volumen del revelador [uL]	0,0029	<	0,0033	No sensible a variable, no significativa
C	Tiempo de revelado [min]	0,0030	<	0,0033	No sensible a variable, no significativa
D	Diferente equipo espectrofotométrico UV-Vis	0,0212	>	0,0033	Sensible a variable, si significativa

Fuente: Elaboración Propia



CAPITULO V

5. CONCLUSIONES

Este trabajo con los resultados experimentales obtenidos en el Laboratorio de Calidad Ambiental (L.C.A.) ha demostrado la validez del método espectrofotométrico ultravioleta – visible (UV-VIS) para la determinación de amonio en aguas naturales, utilizando el reactivo de Nessler, en un rango de trabajo de 0,2 mg NH₄⁺/L a 1 mg NH₄⁺/L con un análisis estadístico de los resultados obtenidos, ha permitido evaluar los parámetros de validación y permite afirmar que:

El método es lineal y tiene la ecuación $Y=0,1680x+0.0012$, demostrando que tiene una pendiente diferente de cero con un test de t-student donde $t_{exp}= 221,942001 > t_{crit} =2,0687$, que la recta NO pasa por el origen del eje de coordenadas esto con un intercepto que NO incluye al cero en un intervalo de confianza $IC_a = 0,00224$ a $0,00016$, comprobando que existe una correlación entre los ejes X, Y de la linealidad con un test de student del coeficiente de correlación $r = 0,9995$ de $t_{exp}= 79,88 > t_{crit}=2,0687$.

El límite de detección (LoD) se determinó a partir de la pendiente de la recta de calibración y de la desviación estándar de la respuesta (S_a) que nos indica que la concentración mínima detectable que es de 0,01 mg NH₄⁺/L.

El límite de cuantificación (LoQ) se determinó a partir de la pendiente de la recta de calibración y de la desviación estándar de la respuesta (S_a) Que indica que la

concentración más baja del analito que puede ser determinada a un nivel aceptable de precisión y repetibilidad es $0,030 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$.

El método es selectivo, se evaluó por la comparación de las inclinaciones de las curvas de adición patrón, los cálculos que realizamos es la t- Student para igualdad de inclinaciones, se aplicó la prueba de t-student $t_{\text{exp}} = 0,5122 < t_{\text{crit}} = 2,0555$ comprobando que las pendientes son iguales, que no hay efecto de matriz y el método es selectivo.

El método tiene veracidad, se evaluó calculando el porcentaje de recuperación $104,3211\%$ que se encuentra en el intervalo de confianza para métodos espectrofotométricos de $90 - 110 \%$ concluyendo que hay veracidad del método.

El método tiene precisión, se evaluó determinando las desviaciones estándar relativa experimental $RSD_{\text{exp}} = 0,1098 \%$ que es menor a la desviación estándar relativa de Horwitz $RSD_{\text{h}} = 11,52 \%$ para una concentración de $0,6 \times 10^{-6}$ de amonio, aceptando que la dispersión en la muestra fortificada es adecuada a $0,6 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$. Concluyendo que el método tiene veracidad y precisión entonces tiene exactitud.

El método es robusto en nuestro proceso analítico si variamos el volumen del estabilizador, el volumen del revelador y el tiempo de revelado y es sensible a diferente equipo espectrofotométrico.

En nuestra muestra la concentración amonio es de $0,1284 \pm 0,01 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$. Con un nivel de confianza de $0,1384 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$ a $0,1184 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$ estando por debajo de

0,2 mg NH₄⁺/L que es el Límite Máximo Permisible de amonio en aguas superficiales naturales, destinadas a mantener la vida natural de los ecosistemas.

CAPITULO VI

6. RECOMENDACIONES

Una característica importante de los analistas en su habilidad para obtener resultados confiables son que los materiales y equipos se deben calibrar, los materiales volumétricos (matraces aforados) y los instrumentos del laboratorio (micro pipetas, balanzas y el equipo espectrofotométrico UV-VIS) a fin de minimizar errores sistemáticos.

Desafiar al método realizando variaciones en la preparación de las muestras a diferente pH y temperatura, para ampliar la robustez del método.

Para una exactitud mayor del método se debe utilizar un material de referencia de amonio.

Se debe de considerar que el método validado se encuentre controlado por el laboratorio, el mismo que deberá establecer cada que tiempo se revalida los procedimientos técnicos analíticos.

Cuando el laboratorio quiera acreditar el método, se debe realizar la incertidumbre de los resultados que es un requerimiento de la Norma ISO 17025 para que el método sea apto para el fin propuesto.

CAPITULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, D. (2002). Lixiviación de Nitrogeno en funcion del espaciamiento entre drenes subterranos . Redalyc.or, 13.

Acevedo, D. C. (2002). Lixiviación de nitrogeno en función del espaciamiento entre drenes subterranos. Redalyc.org, 13.

Anderson, D. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication. *Estuaries*, 22.

Asociacion Española de ecología terrestre. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuaticos. *Cientifica y tecnica de ecologia y medio ambiente*, 13.

Camargo, J. (2005). Nitrate Toxity to aquatic animals. *CERSA ediciones*, 12.

Camargo, J. (2005). Nitrate Toxity to aquatic animals. *CERSA ediciones*, 12.

Campbell, N. W. (1991). The effects of acidification on the geochemistry of Al, Cd, Pb and Hg in freshwater. *review*, 39.

Chambi Tapia, M. I. (2017). VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES EN SUELOS POR LA TÉCNICA DE FLUORESCENCIA DE RAYOS X. La Paz.

Diaz, N. A. (2005). Espectrofotometría espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Departamento de bioquímica y Biología molecular.

Dodds W.K., J. J. (1998). Suggested classification of stream trophic state: total nitrogen and phosphorus. *Water Res.*32, 7.

Environment. (2001). Priority substances assessment report ammonia in the aquatic environment. Minister of public works .

EPA. (2006). National recommended water quality criteria. *Environ Health Perspect*, 8.

Gessner, D. O. (2004). Impacts of stream acidification on litter breakdown, implications for assessing ecosystem. *Science*, 13.

Health, E. (1989). Resumen de los efectos sobre la salud asociados con el amoníaco. Agencia de protección ambiental de los E.E.U.U .

Jaffe, D. (1992). The Global Cycle. *GLOBAL BIOGEOCHEMICAL CYCLES*, 20.

Llenera, J. V. (2007). Evaluación de la actividad enzimática a partir del desecho de quinua por UV-VIS. Centro de investigación e Innovación Tecnológica .

Martinez, J. M. (1995). Estudio de la calidad de las aguas superficiales del río San Pedro. *Investigación y ciencia*, 13.

Pérez, D. S. (2003). DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AMONIO EN EL AGUA DE LLUVIA DE HAMBURGO. Hamburg University of applied Sciences, 110.

Pidwirny, M. (Lunes de Enero de 2001). Department of Geography. Obtenido de <http://www.geog.ouc.bc.ac/>

Pinay, G. (1993). Spatial and temporal patterns of denitrification in a riparian forest. *Journal of Applied Ecology*, 10.

Ramos, O. R. (2002). Perdidas del nitrogeno del bosque de neblina en la subcuena de san alberto, Oxapampa. Oxapampa .

Rodriguez, B. (2010). Aspectos generales de la validación. Santiago.

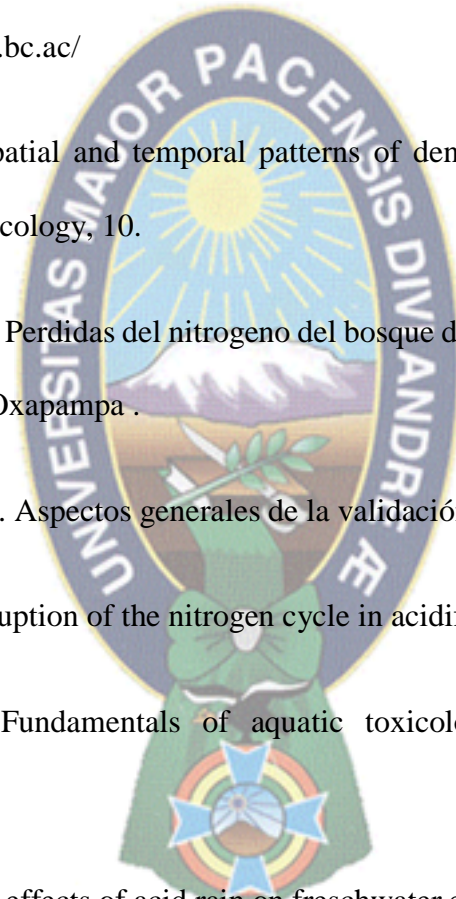
Rudd, J. (1998). Disruption of the nitrogen cycle in acidified lakes. *Science*, 2.

Russo, R. (1985). *Fundamentals of aquatic toxicology* . Hemisphere Publishing Coporation, 16.

Schindler, D. (1998). effects of acid rain on freschwater ecosystems. *Science* , 8.

Smith, V. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems. *Environ*, 13.

Townsend A. R., H. (2003). Human health effects of a changing globalnitrogen cycle. *Environ*, 6.



Young, B. (Lunes de Enero de 2001). Obtenido de <http://www.Biogas.byu.edu/>

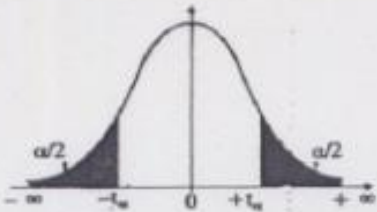


ANEXOS

ANEXO 1

Tabla. Valores críticos para la distribución de t-student

Distribución t de Student



α g.l	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.001
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	636.619
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	31.598
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	12.929
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	8.610
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	6.869
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	5.408
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.587
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.437
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	4.221
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.140
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	4.015
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.965
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.883
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.850
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.819
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.767
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.745
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.707

ANEXO 2

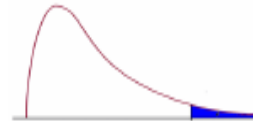
Tabla. Valores críticos para la distribución de test de F

Distribución F 0.05

En las columnas se encuentran los valores F que corresponden al área 0.05 a la derecha

En las columnas se encuentran los grados de libertad del numerador

En los renglones se encuentran los grados de libertad del denominador.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	24	30	40	60	120
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.0	243.9	245.9	248.0	249.1	250.1	251.1	252.2	253.3
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.98	5.94	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.08	4.03	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.60	2.54	2.49	2.46	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.34	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.31	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.26	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.24	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.22	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.17	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.15	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.14	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.13	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.04	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.95	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.87	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35

Para calcular el valor F en excel, se utiliza la función de la distribución F inversa

=distr.f.inv(0.05; gl num; gl den)

ANEXO 3

Tabla. Valores críticos para la distribución de test de Grubbs

Valores críticos para el test de Grubbs						
n	G_1 (95%)	G_2 (95%)	G_3 (95%)	G_1 (99%)	G_2 (99%)	G_3 (99%)
3	1.153	1.993	-	1.155	2.000	-
4	1.463	2.429	0.0008	1.492	2.445	0.0000
5	1.672	2.755	0.0183	1.749	2.803	0.0035
6	1.822	3.012	0.0564	1.944	3.095	0.0186
7	1.938	3.222	0.1020	2.097	3.338	0.0440
8	2.032	3.399	0.1478	2.221	3.543	0.0750
9	2.110	3.552	0.1909	2.323	3.720	0.1082
10	2.176	3.685	0.2305	2.410	3.875	0.1414
11	2.234	3.803	0.2667	2.485	4.012	0.1736
12	2.285	3.909	0.2996	2.550	4.134	0.2043
13	2.331	4.005	0.3295	2.607	4.244	0.2333
14	2.371	4.093	0.3568	2.659	4.344	0.2605
15	2.409	4.173	0.3818	2.705	4.435	0.2859
16	2.443	4.247	0.4048	2.747	4.519	0.3098
17	2.475	4.316	0.4259	2.785	4.597	0.3321
18	2.504	4.380	0.4455	2.821	4.669	0.3530
19	2.532	4.440	0.4636	2.854	4.737	0.3725
20	2.557	4.496	0.4804	2.884	4.800	0.3909

NOTA: TENER EN CUENTA QUE PARA EL CASO DE G_3 EL TEST ES SIGNIFICATIVO CUANDO EL VALOR CALCULADO ES MENOR QUE EL VALOR TABULADO.

ANEXO 4

Fotos de los equipos utilizados:



Espectrofotómetro: Perkin Elmer lambda 25



Espectrofotómetro: CARY (1E)



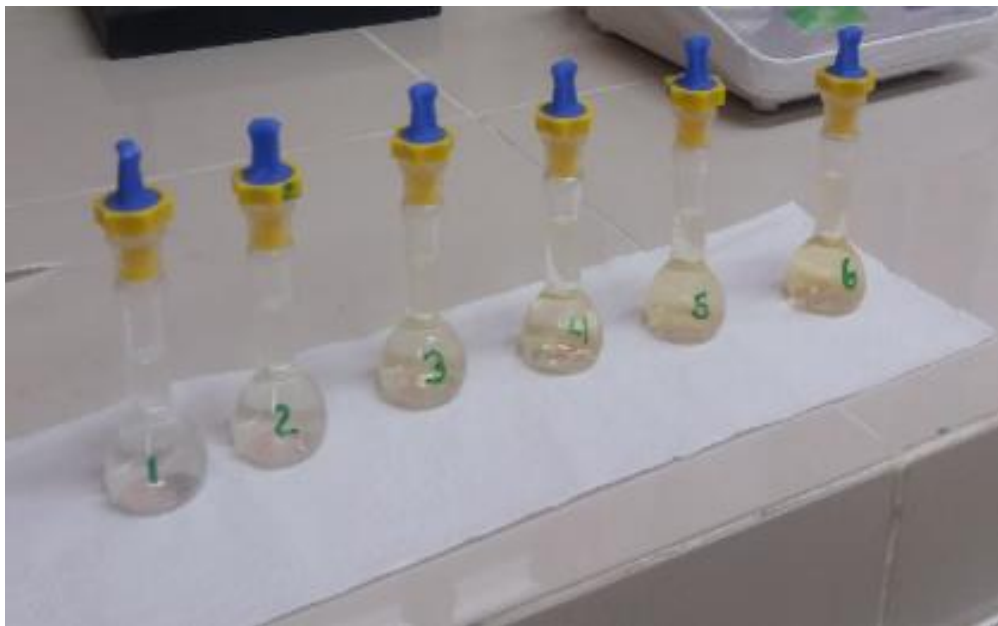
Estufa: Memmert Max 110°C



Balanza digital: Denver Min 0,001 g. Max 210g.



Micro pipetas:Eppendorf



Curva de calibración