

# VALIDACIÓN DEL MÉTODO DEL SULFATO DE BRUCINA PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO FORMA DE NITRATO EN AGUAS SUPERFICIALES

MSc. Rodisnel Perdomo-Rivera<sup>1</sup>, Dr. Mario G. Otero-Fernández<sup>1</sup>, Dra. Maricela González-Leal<sup>II</sup> 

[maricelagl@hotmail.com](mailto:maricelagl@hotmail.com), [rperdomor@udg.co.cu](mailto:rperdomor@udg.co.cu), [moterof@udg.co.cu](mailto:moterof@udg.co.cu)

<sup>1</sup>Centro de Estudios de Química Aplicada (CEQA), Facultad de Ciencias Técnicas, Universidad de Granma, Cuba, <sup>II</sup> Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, México

## ● Resumen

La investigación que se presenta, se desarrolló en los laboratorios del Centro de Estudio de Química Aplicada de la Universidad de Granma y del Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental de la Universidad Autónoma de Querétaro, México. Este inicia con un estudio documental donde se toma como fuentes principales la base de datos *Analytical Abstracts* de la Royal Society Chemistry en el periodo 1980-2009 y el Manual de Métodos Normalizados para análisis de aguas potables y residuales, que permitió seleccionar los métodos más adecuados para la determinación de nitrógeno en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en muestras de agua del río Bayamo, tomándose como parámetros de referencia: tecnología analítica requerida, costos, productividad, propiedades analíticas e impacto ambiental. Una vez seleccionado el método, se procedió a la validación sobre la base de: intervalo de trabajo, límite de detección y cuantificación, repetibilidad, reproducibilidad y exactitud. Como resultado principal se obtiene una metodología analítica confiable para la determinación de nitrógeno en forma de nitrato ( $\text{N} - \text{NO}_3^-$ ) en cuerpos de agua superficiales, recomendándose su aplicación en la red de laboratorios de recursos hidráulicos.

Palabras clave: validación de métodos analíticos, nitrógeno en forma de nitrato.

## ● Abstract

The investigation that is presented was developed in the laboratories of the Applied Chemistry of Study Center of the Granma University and of the Academic Studies Center about Environmental Contamination of the Querétaro Autonomous University of Mexico. This begins with a documental study where it takes as main sources the database *Analytical Abstracts* of the Royal Society Chemistry in the period 1980-2009 and the Manual of Normalized Methods for analysis of drinkable and residual waters that allowed to select the most appropriate methods for the nitrogen determination in nitrate form ( $\text{NO}_3^-$ ) in water samples of the Bayamo river, taking as reference parameters: Required analytic technology, Costs, Productivity, analytic Properties and environmental Impact. Once selected the method, you proceeded to the validation on the base of: work interval, detection Limit and quantification, repetibility, reproducibility and accuracy. As a result main a reliable analytic methodology is obtained for the nitrogen determination in nitrate form ( $\text{N} - \text{NO}_3^-$ ) in surface bodies of water, being recommended its application in the laboratories of Hydraulic Resources.

Keywords: validation of analytic methods, nitrogen in nitrate form.

## ● Introducción

El uso del agua por el hombre ha conllevado a la degradación de la misma, hasta el punto de ser inservible, dañina e incluso mortal en algunos lugares. La contaminación del agua consiste en una modificación de la calidad de la misma, haciéndola impropia o peligrosa para el consumo humano, la agricultura, la pesca, actividades recreativas así como para los animales o la vida natural. Las fuentes primarias de contaminación de las aguas son producidas por desechos, residuos industriales, riego y vertidos de aceite /1, 2/.

El fenómeno de la contaminación de las aguas se ha convertido en un problema cada vez más complejo debido al tipo y diversidad de los contaminantes, de modo que los sistemas convencionales de evaluación se fundamentan en indicadores que no reflejan la calidad del agua con la exactitud requerida /3/.

La contaminación del agua procedente de fuentes difusas, es el resultado de un amplio grupo de actividades humanas, donde los contaminantes no tienen un punto preciso de ingreso en los cursos de agua que los reciben; esta se presenta cuando el agua discurre sobre la superficie del terreno –escorrentía– y al percolar por el subsuelo, arrastra los contaminantes y los agrega finalmente a aguas superficiales, costeras y subterráneas, por lo que son más difíciles de identificar, medir y controlar /4, 5/.

En los últimos veinte años, científicos, gestores y autoridades públicas, han reconocido que los ecosistemas acuáticos sufren diferentes problemas ambientales, que son consecuencia de una compleja cadena de eventos que varían de un sitio a otro, y que pueden en parte, ser atribuidos al enriquecimiento de los nutrientes nitrógeno y fósforo, la escorrentía de las tierras agrícolas, actividades de engorde de animales, áreas urbanas, vertido de aguas residuales, precipitación atmosférica de compuestos liberados durante la ignición de combustibles fósiles, son actividades que entre otros contaminantes añaden nutrientes al agua. Este tipo de contaminación que altera la calidad del agua por exceso de nitrógeno y fósforo, se conoce como el *Proceso de eutrofización* /6-8/.

Diversos trabajos científicos han documentado la existencia de los problemas ambientales y la pérdida de la calidad del agua por el enriquecimiento de nutrientes, pero en su mayoría refieren a casos particulares de países localizados en regiones tropicales /9/.

Las formas de nitrógeno de mayor interés en las aguas naturales y residuales son, por orden decreciente de su estado de oxidación, nitrato, nitrito, amoníaco y nitrógeno orgánico. Todas estas formas del nitrógeno, lo mismo que el nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ), son interconvertibles bioquímicamente y forman parte del ciclo del nitrógeno /10/.

El nitrógeno en forma de nitrato en el agua, aparte de ser el máximo responsable del proceso de eutrofización, también es el causante de diferentes enfermedades como son la metahemoglobinemia, el cáncer de esófago y estómago. Además produce cianosis sobre todo en niños que consumen con frecuencia aguas contaminadas por este, lo que hace imprescindible un riguroso control de la calidad de las aguas respecto a este analito /4, 11, 12/.

El manejo y control de la calidad de las aguas, constituyen uno de los problemas asociados a la contaminación ambiental que requiere de la utilización de métodos confiables, que sean capaces de dar una respuesta rápida y eficaz sobre el estado del agua y su posible uso, permitiendo tomar medidas para preservar su calidad y evitar su deterioro /13/.

Los esfuerzos de la Química Analítica medioambiental deben ir encaminados hacia la mejora de los procedimientos ya existentes y al desarrollo de nuevos procedimientos que permitan adecuar los avances metodológicos y químicos a las necesidades del análisis de la calidad del agua /14/.

En la actualidad se encuentra un gran número de métodos analíticos para determinar nitrógeno en forma de nitrato en muestras de aguas superficiales, que si bien es un logro de las ciencias ambientales, también es un reto la utilización correcta de los mismos, ya que no siempre se aplican ensayos de actitud, para verificar el buen funcionamiento de estos, pudiéndose lograr a través de validaciones analíticas.

En Cuba, la mayoría de los laboratorios responsables del análisis de la calidad del agua, no validan sus métodos analíticos y, aunque los utilizados sean aprobados dentro de sus ministerios, esto por sí sólo no es suficiente para lograr resultados analíticos exactos y confiables, existiendo una gran cantidad de factores que afectan la calidad de los mismos. Por lo que deben desarrollar programas de control que aseguren la calidad de los resultados. Es por ello, que el presente trabajo tiene como objetivo, realizar la validación del método de sulfato de brucina para la determinación de nitrógeno en forma de nitrato en muestras de aguas superficiales.

### **Materiales y métodos**

Al no contar con materiales de referencia certificados, fue necesario la elaboración de un material interno preparado en el laboratorio, por adición del analito en concentraciones conocidas, para esto, se tuvo en cuenta lo planteado en la Norma Cubana como guía para la validación de métodos químicos de ensayos /15/.

En la preparación de los materiales internos, se utilizó una muestra natural del río Bayamo para aprovechar su matriz y de esta manera conocer cómo funciona el método frente a la misma.

El río Bayamo constituye un recurso natural de extraordinario valor para la población de la ciudad del mismo nombre y las comunidades que se encuentran en el entorno; nace en el Chorrerón de Guamá, en los altos de Guisa, su cauce recorre un total de 75 km hasta la presa Cauto el Paso, atravesando la ciudad de Bayamo por el sur. Posee dos afluentes principales: El arroyo Managua y El arroyo Salado.

Su cauce y profundidad fueron rectificadas en el año 2001 en un tramo de un km para la construcción de un desvío de la carretera central, además no recibe mantenimiento ni limpieza y está obstruido en algunos tramos por derrumbes de su talud provocados por la erosión. Este tramo en diferentes épocas del año está cubierto de plantas acuáticas, llamadas comúnmente Jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) que obstruye la rápida circulación de las aguas, extendiéndose a lo largo del cauce hasta su desembocadura en la presa Cauto el paso.

De lo anteriormente expuesto se puede tener una noción de las condiciones que presenta el río en todo su trayecto.

### **Descripción de la estación de muestreo**

Se estableció una sola estación de muestreo en una zona del río (El puente), que está a una altura de 45 metros sobre el nivel del mar. Ubicada a la salida del municipio Bayamo conocido el lugar como El Lavadero del Puente (20°25' de latitud norte, 76°39' de longitud oeste), visitado en época aún de lluvia en la primera quincena de septiembre del 2006, realizándose el muestreo en una zona de profundidad de 35 cm para el remanso; con fondo característico fangoso-pedregoso, piedras medianas y pequeñas; vegetación arbustiva mayoritariamente, árboles aislados, con mucha vegetación de fondo (fam. *Cyperaceae* y fam. *Hydrocoritaceae*); la temperatura fue de 24 °C; velocidad promedio de la corriente de 0,9 m/s para el rabión y 0,28m/s para el remanso.

La conservación de las muestras es un problema de interés analítico porque la completa estabilidad de cada constituyente nunca puede ser conseguida.

Después de la toma de muestra la conservación simplemente retarda los cambios químicos y biológicos /16/. Cuando las muestras se almacenan sin acidificar y sin congelar tienen lugar procesos de adsorción sobre las paredes de los recipientes, de modo que para preservar la distribución original de las especies, las muestras deben almacenarse sin acidificar pero congeladas /17/.

Para esta determinación de nitrógeno en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ - N), las muestras fueron conservadas en frascos de vidrio de 1000 mL de capacidad, acidulándolas con ácido sulfúrico concentrado 98,3 % (Pa) hasta un pH < 2 y manteniéndolas a 4 °C, con estas condiciones la muestra puede permanecer estable un período de 14 días.

### **Análisis y selección del método de análisis**

Para el análisis del nitrógeno en forma de nitrato en muestras de agua existe una gran variedad de métodos analíticos. Como objeto de estudio de esta investigación se tomaron los informados por el Manual

de métodos normalizados para el análisis de agua potable y residuales /10/, sobre la base de los siguientes aspectos:

- a) Tecnología analítica requerida.
- b) Costos.
- c) Productividad.
- d) Propiedades analíticas.
- e) Impacto ambiental.

### **Selección del método más adecuado para determinar nitrógeno en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ -N)**

Métodos propuestos:

1. De sulfato de brucina.
2. Cromatográfico de iones.
3. Del electrodo de nitrato.
4. De reducción de cadmio.
5. Automatizado de reducción de cadmio.
6. De reducción de cloruro de titanio (III).
7. Automatizado de reducción de hidracina.

### **Tecnología analítica requerida**

Con excepción del método 1, los demás requieren condiciones y tecnología analítica que encarecen la determinación y no está disponible en el laboratorio. Esto determina que solo sea considerado el primer método.

### **Costos**

La aplicación del método colorimétrico, es relativamente económico en comparación con el resto de los descritos debido a que instrumentalmente requiere de un espectrofotómetro que permita realizar lectura a 410 nm, un baño de agua adecuado para usarse a 92 °C y un agitador magnético, sin necesidad de utilizar alguna cristalería específica que no sea la que se utiliza normalmente para métodos colorimétricos.

### **Productividad**

La determinación de nitrógeno en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ -N) es difícil debido a los procedimientos relativamente complejos que se precisan, a la elevada probabilidad de que existan sustancias interferentes y a los rangos limitados de concentración de las diferentes técnicas. Es por esto que el método de sulfato de brucina requiere de una serie de pasos que le da mayor confiabilidad a sus resultados, hacen un tanto lenta su determinación, disminuyendo así su nivel de productividad, aunque se llega a analizar un gran número de muestras en una jornada de trabajo, pues permite su manipulación de forma paralela.

### **Propiedades analíticas**

El método de sulfato de brucina, ha sido al que se le ha realizado modificaciones en las diferentes ediciones del manual de métodos normalizados para aguas potables y residuales, con el objetivo de lograr una mayor confiabilidad de los resultados hasta este con el cual se trabaja, que es muy selectivo y capaz de generar resultados confiables, llegando a una sensibilidad de 0,03 mg/L.

### **Impacto ambiental**

En este método se generan residuales muy peligrosos por su alto contenido de ácido sulfúrico, más la presencia de arseniato de sodio y del reactivo desarrollador de color que contiene sulfato de brucina que son sustancias tóxicas con las cuales hay que tener bastante cuidado al trabajar con ellas.

### **Conclusión parcial**

Dada la complejidad de la determinación del nitrógeno en forma de nitrato, se consideró que el método de sulfato de brucina es el apropiado para su determinación.

### **Diseño metodológico para la validación del método de sulfato de brucina**

Para la validación de la metodologías analíticas se siguió el procedimiento descrito en la Norma Cubana como guía de validación de métodos químicos de ensayos /18/, cuyo objetivo es obtener de forma experimental y para las condiciones particulares del

laboratorio, parámetros que servirán como criterios de confianza de los métodos analíticos; estos parámetros son: exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y zona de mínimo error del método.

Es importante destacar que el método validado es colorimétrico, por lo que la etapa inicial para llevar a cabo dicho proceso fue la realización de una curva de calibración.

### Intervalo de trabajo del método

Con el objetivo de seleccionar la zona de mínimo error del método y con ello determinar el intervalo de trabajo de este, que garantice una mayor confianza de los resultados que se generan, fue necesario el desarrollo de la Curva de Ringbom /18/.

La curva de Ringbom, se logra a partir de los datos experimentales que se obtuvieron para la curva de calibración, graficando por ciento de absorbancia calculado (% Ab) Vs logaritmo de las concentraciones (Log C).

$$\% Ab = P\% \cdot 100 - \% T$$

donde % T: por ciento de transmitancia.

Esta curva, según plantea P. Bermejo /18/, es prácticamente una recta en la zona central, comprendida por el intervalo de 20–60 %T, y desviándose de esta recta para valores por encima y por debajo de este intervalo. Es decir, los valores óptimos de absorción para realizar medidas se encuentran situados hacia la zona media de la escala, y el intervalo óptimo de concentraciones para conseguirlo está limitado por los valores de Log C correspondientes a los límites de la zona de la recta de la gráfica.

### Límite de detección y de cuantificación

Una de las ventajas de utilizar métodos instrumentales de análisis es que son capaces de detectar y determinar cantidades del analito mucho más pequeñas que en los métodos de análisis clásicos.

El límite de detección  $L_D$ , es la concentración del analito que da una señal que es tres veces la desviación típica del blanco y puede expresarse como:

$$L_D = 3S_B / m$$

donde m: pendiente de la curva de calibración

$S_B$  : desviación típica del blanco.

Científicamente es cuestionable la determinación de  $S_B$ , por la gran pérdida de tiempo que esto implica y el gasto de reactivos en realizar múltiples determinaciones del blanco /19/. Es más idóneo el cálculo del  $L_D$ , usando los resultados obtenidos de la curva de calibración y teniendo en cuenta una suposición básica del método de los mínimos cuadrados no ponderados, donde cada punto en la representación gráfica (incluido el punto que representa el blanco o fondo) tiene una variación distribuida normalmente (sólo en la dirección de y) con una desviación estándar estimada por  $S_{y/x}$ . Es, por tanto, adecuado utilizar  $S_{y/x}$  en lugar de  $S_B$  en la estimación del límite de detección.

Por tanto, el límite de detección se calcula teniendo en cuenta la siguiente expresión analítica:

$$L_D = 3 S_{y/x} / m$$

$S_{y/x}$  : estima los errores en la dirección de las absorbancias y se calcula por la siguiente expresión.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

donde:

$y_i$  : es el valor de absorbancia obtenido para cada punto de concentración de los patrones para la obtención de la curva de calibración.

$\hat{y}_i$  : es el valor de absorbancia corregido a partir de la ecuación de la recta en la curva de calibración para cada patrón.

$n - 2$ : es el grado de libertad, conociendo que n en este caso, es el número de determinaciones, es decir la cantidad de puntos de concentraciones tenidas en cuenta para la curva de calibración.

El límite de cuantificación (o límite de determinación), es considerado como el límite más bajo para mediciones cuantitativamente precisas, y se define como la concentración del analito que da

una señal que es diez veces la desviación típica del blanco.

$$L_c = 10S_B / m$$

Lo anteriormente planteado para el límite de detección, es también válido para el límite de cuantificación, por lo que este se calculó a través de la siguiente expresión analítica:

$$L_c = 10 S_{y/x} / m$$

A la región de concentración comprendida entre  $L_c$  y  $L_D$  se le denomina región de detección y la región de determinación, o cuantificación comienza con el valor de  $L_c$ .

### **Precisión del método analítico**

Teniendo en cuenta que la precisión depende solamente de la distribución de los errores aleatorios, que no está asociada con el valor verdadero y se expresa generalmente como la desviación típica del resultado analítico. Fue necesario determinar esta, según plantea la Norma Cubana como guía de validación de métodos químicos de ensayo /15/, en el que se tiene en cuenta la repetibilidad y la reproducibilidad de los métodos.

Una estimación de la repetibilidad de un método se obtiene cuando los resultados analíticos provienen de idénticas porciones de ensayo, en el mismo laboratorio, obtenidos por el mismo analista, utilizando el mismo equipo y dentro de un corto intervalo de tiempo /15/.

La reproducibilidad del método puede estimarse bajo las mismas condiciones que la repetibilidad, pero variando al menos una de las condiciones de trabajo, en este caso se hizo variando el momento de ejecución, es decir desarrollándolo en días diferentes.

Es importante señalar, que tanto para la repetibilidad como para la reproducibilidad del método, no se usaron materiales de referencia, por sus elevados costos, por lo que fue necesario preparar materiales de control interno, a partir de muestras naturales del río Bayamo y por adiciones de una cantidad conocida del analito a determinar.

Para cada método, la precisión se determinó por medio de diez repeticiones en los tres niveles de concentración en estudio bajo, medio y alto. Luego se

calculó el coeficiente de variación por medio de la expresión analítica que aparece a continuación:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} 100$$

donde:

S: desviación estándar

$\bar{X}$ : media de las determinaciones.

### **Exactitud de los métodos analíticos**

Al no disponer de un material de referencia certificado, se procedió a la obtención de un material interno preparado de forma muy cuidadosa en nuestro laboratorio, añadiendo cantidades conocidas de la especie de nitrógeno a estudiar, utilizando una muestra natural del río Bayamo, para aprovechar su matriz.

Este estudio, al igual que el de precisión se realizó haciendo diez repeticiones a tres niveles de concentración, bajo, medio y alto. Para estos niveles se calculó el por ciento de recuperación y se comparó estadísticamente con el 100 % para ver si existían diferencias significativas.

El por ciento de recuperación del analito añadido se calcula como cien veces la diferencia entre las medias de las series dividida entre la cantidad del analito añadida:

$$\% \text{ recuperación} = \left[ \frac{cr}{ca} \right] * 100$$

donde:

cr: cantidad recuperada del analito

ca: cantidad de analito añadido.

### **Determinación de nitrógeno de nitrato ( $NO_3^-$ - N) en aguas superficiales**

Este método se basa en la reacción de los iones nitrato presentes en una muestra de agua, con sulfato de brucina en presencia de ácido sulfúrico, formándose un complejo de color amarillo medible a una longitud de onda de 410 nm en un espectrofotómetro visible-ultravioleta. La medida de la intensidad de color es proporcional a la concentración del ión nitrato presente en la muestra.

## **Técnica analítica**

### **Procedimiento:**

· Colocar el número suficiente de tubos de reacción en la gradilla metálica cuidando que cada tubo esté rodeado por espacios libres. El calentamiento de los tubos debe ser uniforme.

· Si es necesario, corregir el color debido a la materia orgánica disuelta, la cual causa color en el calentamiento, es necesario correr duplicados de muestras con todos los reactivos, pero sin agregar el reactivo desarrollador de color ácido sulfanílico-brucina.

· Tomar una alícuota de 10 mL de la muestra en un tubo de ensayo.

· Vertir de forma independiente, en diferentes tubos de ensayo, 10 mL de los patrones preparados, siempre llevando un blanco de reactivo, obtenido a partir de agua destilada.

· Colocar los tubos en un baño de agua fría (0 - 10 °C).

· Añadir 2 mL de cloruro de sodio al 30 % (m/v) al blanco de reactivos, estándares y muestras. Mezcle el contenido de los tubos.

· Añadir 10 mL de la disolución de ácido sulfúrico 98,3 % en cada tubo y mezcle. Permitir que los tubos alcancen el equilibrio térmico en el baño frío. Asegurarse que las temperaturas de todos los tubos están en equilibrio antes de continuar.

· Añadir 0,5 mL del reactivo desarrollador de color ácido sulfanílico-brucina a cada tubo (excepto a los tubos de control de interferencias).

· Mezclar cuidadosamente. Si al mezclar se observa una coloración rosa o amarilla, hacer una dilución mayor de la muestra antes de continuar.

· Calentar los tubos, en Baño María a 92 °C, exactamente 20 min.

· Remover los tubos del Baño María, sumergirlos en un baño de agua fría, y esperar a que alcancen el equilibrio térmico a temperatura ambiente.

· Transferir una alícuota de cada patrón en la celda de 1.0 cm y mida la absorbancia a 410 nm con un espectrofotómetro.

### **Cálculo**

$$C = \frac{A-N}{m}$$

donde:

C- concentración de la muestra

A.- Absorbancia de la muestra

N- intercepto de la curva de calibración

m- pendiente de la curva de calibración.

Los resultados se expresan en mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N /L.

### **Reactivos utilizados**

La tabla 1 muestra los reactivos utilizados para el desarrollo de esta investigación así como las casas comerciales que los suministran y los riesgos que estos pueden provocar.

### **Instrumentación**

· Espectrofotómetro uv-visible Lambda 2 Perkin Elmer. Recorrido de luz de 1 cm.

· Balanza analítica SARTORIUS.CP2250. Germany 14209551.CE. Con precisión de d= 0,01 mg/L (80 g) 0,1 mg/L (220G).

· pH-metro 220 ATC."3 en 1" combinación de electrodo con compensación automática de temperatura. Rango de pH: 0-14; rango de temperatura: 0 - 100 °C; punto cero: pH= 7,0 ± 0,5; temperatura ± 0,2 °C hasta 25 °C.

· Tubos Nessler, de 50 mL. P.K y forma alta.

· Termostato

· Termómetro.

Toda la cristalería utilizada es calibrada de clase A.

TABLA 1. LISTADOS DE REACTIVOS UTILIZADOS

Reactivos	Casa comercial	Pureza	Irritante	Nocivo	Tóxico	Cancerígeno	Inflamable	Corrosivo	Oxidante
Ácido clorhídrico	Panreac	37,1 %						X	
Ácido sulfúrico	FERMONT	98,3 % Pa						X	
Ácido sulfanílico monohidratado	BAKER	98 % Pa							
Arsenito de sodio	BAKER	99 % Pa			X				
Cloroformo	Burdick y Jackson mat	HPLC		X					
Cloruro de sodio	BAKER	99,6 %							
Hidróxido de sodio	MERCK	97,8 % Pa						X	
Nitrato de potasio	Panreac	99 % Pa							
Sulfato de brucina	BAKER	98 % Pa			X				

● Resultados y discusión

*Intervalo de trabajo del método*

*Validación del método de sulfato de brucina para la determinación de nitrógeno en forma de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>- N)*

El análisis de los resultados obtenidos en la validación del método químicos analíticos seleccionado, para la determinación del nitrógeno forma de nitrato en aguas superficiales, a partir de datos primarios que fueron procesados por el programa estadístico Minitab, versión 13.2 /20/.

Con el objetivo de identificar la zona de trabajo de mayor exactitud del método, se desarrolló una curva de calibración que tomara en cuenta el intervalo de concentración según la 20 edición del manual de métodos normalizados para análisis de agua y aguas residuales (0,1 – 1,0 mg/L). Además se incluyen valores de concentración por encima y por debajo de este intervalo, obteniéndose la curva representada en el gráfico 1.

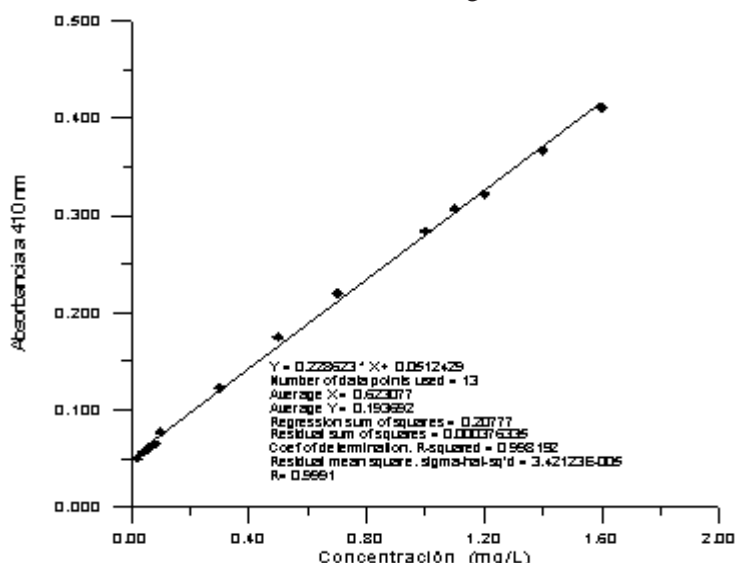
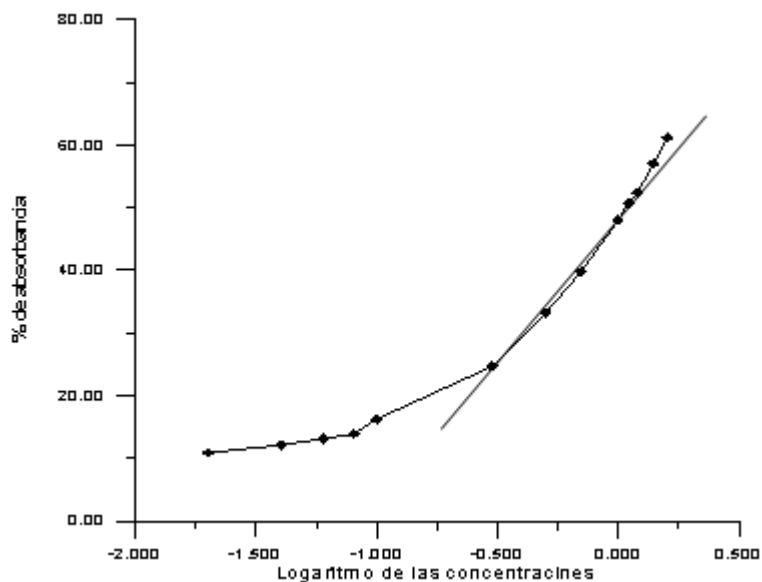


Gráfico 1. Curva de calibración ampliada para determinar nitrógeno en forma de nitrato.



Como se puede apreciar, esta curva de calibración presenta un alto coeficiente de correlación  $r = 0,9991$ , lo que se corresponde con una alta linealidad, aun cuando se ha trabajado

un intervalo de concentración mayor al recomendado. Con el propósito de tener más elementos confirmatorios, se recurrió al desarrollo de la curva de Ringbom /18/ (ver gráfico 2).



**Gráfico 2. Curva de Ringbom. Zona de mínimo error en la determinación de nitrógeno en forma de nitrato.**

En este gráfico se observa, que en la zona de altas y bajas absorciones existe una desviación de la línea recta que debería esperarse, manteniéndose prácticamente recta en la zona central del mismo, lo que significa que el intervalo de trabajo más confiable del método se encuentra entre 0,3 y 1,2 mg/L de nitrógeno en forma de nitrato ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ), que sería a su vez el intervalo donde se comete el mínimo de error.

**Límite de detección y cuantificación**

Por medio de las expresiones analíticas referidas en materiales y métodos y a los resultados obtenidos para la curva de calibración, se pudo hacer la determinación del límite de detección ( $L_D$ ) y límite de cuantificación ( $L_C$ ) del procedimiento analítico, a partir del cálculo de los errores aleatorios en el eje de las absorbancias ( $S_{y/x}$ ), el cual fue de  $5,8232 \cdot 10^{-3}$

$$L_D = 0,076 \text{ mg/L}$$

$$L_C = 0,255 \text{ mg/L}$$

Por tanto, las muestras que se analicen por este método, deben presentar una concentración de nitrógeno en forma de nitrato superior a 0,255 mg/L, que es la mínima concentración de este analito que puede llegar a ser cuantificada de manera confiable por el mismo.

La zona de detección del método está comprendida entre los valores del límite de detección y límite de cuantificación, es decir entre 0,076 y 0,255 mg/L.

**Precisión del método**

La precisión del método se analizó a través de la determinación del coeficiente de variación (CV) para tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) que abarcaron el intervalo de trabajo de este, en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad tal y como aparecen en las tablas 2 y 3, respectivamente.

**Repetibilidad**

**TABLA 2. EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD PARA DETERMINAR NITRÓGENO EN FORMA DE NITRATO (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)**

Niveles de concentración	Concentración teórica (mg/L)	$\bar{x}$ (mg/L)	S	CV (%)	Sesgo
Nivel bajo	0,400	0,398	$5,762\ 9 \cdot 10^{-3}$	1,45	-0,002
Nivel medio	0,700	0,696	$8,822\ 3 \cdot 10^{-3}$	1,27	-0,004
Nivel alto	0,900	0,897	$1,204\ 7 \cdot 10^{-2}$	1,34	-0,003

En la tabla 2 se percibe una baja dispersión de los datos generados por este método en los tres niveles de concentración, a través de los pequeños valores de la desviación estándar; además, lo más significativo está en que los coeficientes de variación son inferiores al 3 % establecido como valor crítico para los métodos

espectrofotométricos /21/, lo que corrobora la adecuada precisión del mismo.

**Reproducibilidad**

Para comprobar la reproducibilidad del método, este se aplicó en días diferentes, desarrollando diez mediciones para cada uno de los tres niveles de concentración.

**TABLA 3. EVALUACIÓN DE REPRODUCIBILIDAD EN LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO EN FORMA DE NITRATO (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)**

Niveles de concentración	Concentración teórica (mg/L)	$\bar{x}$ (mg/L)	S	CV (%)	Sesgo
Nivel bajo	0,400	0,397	$7,479\ 1 \cdot 10^{-3}$	1,88	-0,003
Nivel medio	0,700	0,697	$9,144\ 5 \cdot 10^{-3}$	1,31	-0,003
Nivel alto	0,900	0,897	$1,271\ 6 \cdot 10^{-2}$	1,42	-0,003

La variable estadística más significativa con la que se debe evaluar la precisión teniendo en cuenta la reproducibilidad, es el coeficiente de variación de la mezcla de todos los resultados en los tres niveles de concentración, que como puede observarse en la tabla 3, presenta valores muy pequeños al ser comparados con el 3 % como valor crítico para este tipo de método /21/, lo que demuestra su alta reproducibilidad que es corroborado además por los pequeños

valores de sesgo calculado para cada grupo de datos.

**Exactitud del método**

Para evaluar la exactitud del método, se realizó un ensayo de recuperación a tres niveles de concentración, por adición de cantidades conocidas del analito en cuestión, sobre una muestra natural del río Bayamo, obteniéndose datos que fueron procesados tal y como se muestra en la tabla 4.

**TABLA 4. RESULTADO DEL ESTUDIO DE EXACTITUD DEL MÉTODO DE SULFATO DE BRUCINA**

Cantidad Añadida (mg/L)	Cantidad Recuperada (mg/L)	Recuperado (%)	Resultado del <i>test de Student</i>
0,400	0,395	98,83	$t_{exp.} = 1,64 < t_{tab} = 2,10$
0,700	0,698	99,67	$t_{exp.} = 0,75 < t_{tab} = 2,10$
0,900	0,897	99,70	$t_{exp.} = 0,61 < t_{tab} = 2,10$

Los resultados expresados como por ciento de recuperación y cantidad recuperada son las medias de diez determinaciones realizadas en cada nivel de concentración.

Para los valores obtenidos de forma independiente, se desarrolló un test de Student (t) con datos pareados, donde se compararon las medias de recobrado para cada nivel de concentración con respecto al 100 % de recobrado (teórico), teniendo como resultado la no existencia de diferencias significativas para un 95 % de confianza como aparece en la tabla 4, lo que demuestra su alta exactitud. Además, la media de los porcentajes de recuperación está dentro del intervalo establecido como criterio de aceptación de buena exactitud para métodos espectrofotométricos (98 %-102 %), según M. Herrera, *et al.* /22/.



## Conclusiones

✓ *Se identificaron los métodos de mayor reconocimiento científico para la determinación de nitrógeno en forma de nitrato en muestras de aguas superficiales, a través de una investigación bibliográfica.*

✓ *Se seleccionó el método de sulfato de brucina como más adecuados para la determinación de nitrógeno en forma de nitrato en aguas superficiales, a través de un análisis teórico bibliográfico.*

✓ *El método de sulfato de brucina, fue validado, obteniéndose una metodología analítica confiable en la determinación de nitrógeno en forma de nitrato en aguas superficiales.*



## Bibliografías

- NICKSON, R. T.; J. M. MCARTHUR; B. SHRESTHA; T. O. K MYINT; D. LOWRY. *Applied Geochemistry* 20, 2005, 55p.
- CHEEVAPON, V.; P. MENASUETA. *Marine Pollution Bulletin* 47, 2003, 43p.
- MOLINER, Y.; C. Molins; P. CAMPÍNS. *Talanta*, 62 (2004) 373p.
- DE JONGE, V. C.; M. ELLIOTT ORIVE; E. CAUSES. Historical Development, Effects and Future Challenges of a Common Environmental Problem: Eutrophication. *Hydrobiologia*. (2002) 475/476p.
- ONGLEY, E. D. Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos. FAO. Canada Centre for Inland Waters. Burlington Canada. (1997) 55,68pp.
- NRC (National Research Council). Clean Coastal Waters. Understanding and Reducing the Effects of Nutrient Pollution. National Academy of Science. *National Academic Press*. Washington, D. C. USA. (2000), 405p.
- VALIELA, I.; M. GEIST; J. MCCLELLAND; G. P. TOMASKY. Nitrogen Loading from Watersheds to Estuaries: Verification of the Waquoit Bay Nitrogen Loading Model. *Biogeochemistry*, 49 (2000) 277-293pp.
- US-EPA. Nutrient Criteria Technical Guidance Manual. Estuarine and Coastal Marine Waters. In U.S. Environmental Protection Agency. Office of Water 4304. EPA-822-B-01-003, 2001.
- TETT, P.; L. GILPIN; H. SVENDSEN; C. P. ERLANDSSON; U. LARSSON; S. KRATZER; E. FOUILLAND; C. JANZEN; J. LEE; C. GRENZ; A. NEWTON; J. GOMES FERREIRA; T. FERNANDES; S. SCORY. Eutrophication and some European waters of restricted exchange. *Continental Shelf Research*, 23 (2003) 1635-1671pp.
- APHA, A. WWA, WPCF. 1997. *Manual de métodos normalizados para análisis de aguas potables y residuales*. 20th ed, Madrid, España. (1997) 4-126 - 4-167 pp.
- LOVEJOY, F. H.; C. H. LINDEN. *Intoxicación aguda y sobredosis medicamentosa*. A Harrison. *Principios de Medicina Interna*. McGraw-Hill-Interamericana de España. 12 ediciones. Vol II Problemas ambientales y profesionales (1991).
- MAYER, R. J. Neoplasias del esófago y del estómago. A Harrison. *Principios de Medicina Interna*. McGraw-Hill-Interamericana de España. 12 edición. Vol II. Enfermedades del aparato gastrointestinal. 1991.
- PÉREZ, N. B.; L. CREACH; A. MARAÑÓN; A. FERNÁNDEZ; H. I. GUERRA DÍAZ. Evaluación de la calidad de las aguas del río los Guaos de la provincia de Santiago de Cuba. *Revista Cubana de Química*. Vol. XI, No 1 (1999).
- MOLINER, Y. Aportaciones de la química analítica a la resolución de diversos problemas medioambientales. TESIS DOCTORAL. Universidad de Valencia. España. (2005) 33-72 pp.
- NCTS 368:04. Guía para la validación de métodos de ensayos químicos. Vigente desde 2004.
- BURKE, P. M.; S. HILL; N. IRICANIN; C. DOUGLAS; P. ESSEX; D. THARIN. Evaluation of Preservation Methods for Nutrient Species Collected by Automatic Samplers. *Environmental Monitoring and Assessment*, 80 (2002) 149-173 pp.
- STOEPPLER, M. *Sampling and Sample Preparation*. Elsevier. Berlin, (1997) 34-142 pp.
- BERMEJO, P. *Los Cálculos Numéricos en la Química Analítica*. 6ª edición. TÓRCULO. (1998) 418- 423 pp.
- MILLER JAMES, N.; C. MILLER JANES. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Editorial Prentice Hall, 4ª Edición, (2002) 119 -126 pp.
- MINITAB, versión 13.2. 2009.
- GARCÍA, A.; E. SOBERÓN; M. CORTÉS; R. RODRÍGUEZ; J. HERRERA; A. ALARCÓN. Guía de validación. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. (2002).
- HERRERA, S, M, T.; P, C, M. GARCÍA; J, G. MÉNDEZ. "Desarrollo y validación de un método analítico aplicable al control de la calidad de gotas orales del picosulfato de sodio". *Revista Cubana Farmacia*. Vol. 42, núm. 2. Ciudad de la Habana. Mayo-agosto, (2008).