

2es



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“DESARROLLO DE UN METODO AUTOMATIZADO PARA LA DETERMINACION DE NITRATOS Y NITRITOS EN AGUAS, POR ANALISIS POR INYECCION EN FLUJO”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
E R I K A C A B R E R A M O L I N A



MEXICO, D. F.

1999



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## JURADO ASIGNADO

Presidente: M. en C. Humberto Ramón Gómez Ruíz.

Vocal: Q.F.B. Silvia Mendoza Arellano.

Secretario: Dra. Ma. del Pilar Cañizares Macías.

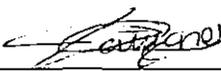
1er. Suplente: Q. Adolfo García Osuna.

2do. Suplente: Q. Lucía Hernández Garcíadiego.

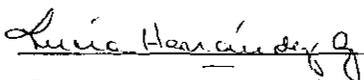
El presente trabajo se desarrolló en:

Laboratorio de Química Analítica Ambiental, Departamento de Química Analítica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA:

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. del Pilar Cañizares Macías

SUPERVISOR TÉCNICO:

  
\_\_\_\_\_  
Q. Lucía Hernández Garcíadiego

SUSTENTANTE:

  
\_\_\_\_\_  
Erika Cabrera Molina

# **AGRADECIMIENTOS**

## ***A DIOS***

Tú SEÑOR, me has iluminado y enseñado el camino correcto, me has dado muchas muestras de tu existencia, ¡GRACIAS! por estar siempre cerca de mí y por haberme dado la dicha de lograr una de mis metas, ¡GRACIAS! por haberme dado el tiempo, la confianza y los medios para obtenerlo.

## ***A MIS PAPAS***

Mis Padres, ustedes que me han visto crecer y que junto conmigo han vivido cada una de las etapas de mi vida, que con mucho esfuerzo, apoyo e impulso me han dado todo cuanto he necesitado, sin olvidar nunca que mis logros son también sus logros, todo cuanto tengo y he hecho gran parte se las debo a ustedes, ¡GRACIAS! por preocuparse por mí y por darme la mejor de las herencias, por haber hecho de mí una persona responsable y dedicada, con mis aciertos y mis errores, no me queda más que AGRADECERLES una y mil veces todo.

¡GRACIAS! por toda su comprensión, por ver reflejado en mí cada uno de sus deseos y satisfacción y por haber creído y confiado en mí. Esta felicidad que siento ahora me da mucho gusto poder compartirla con ustedes dos. LOS QUIERO MUCHO.

## **ESTHER,LYZ Y JUAN**

A pesar de ser cada uno diferente, cada uno de ustedes ocupa un lugar muy especial en mí y aunque muchas veces no se los haga extenso quiero que sepan que los amo y que siempre que necesiten algo de mí por mucha o poca distancia a la cual estemos podrán contar conmigo, como yo lo he hecho cuando he necesitado de ustedes.

¡GRACIAS! por compartir esta dicha conmigo que se que también ustedes la comparten conmigo.

Esther ¡GRACIAS! por hacerme participe de tu propia familia, **Alfonso e Issac**. Y por darme la felicidad de tener al sobrino más maravilloso y guapo, te quiero mucho **Isaac**.

A todos ustedes les reitero todo mi agradecimiento y felicidad. **LOS QUIERO MUCHO.**

## **A TI RAÚL**

Tú has vivido tan cerca de mí estos últimos años y juntos hemos logrado hacer una unión inquebrantable, te dedico este sueño, el cual como tú sabes ha sido uno de los mejores de mi vida. Ojalá que todos nuestros propósitos que nos hemos planteado los podamos llevar a cabo, ¡GRACIAS! por estar siempre cerca de mí cuando lo he necesitado y por darme tus consejos siempre deseando lo mejor para mí. **TE QUIERO MUCHO.**

## **A MIS AMIGOS**

Adriana, Guadalupe, Marcela, Laura, Regina, Sara, Héctor y Juan,  
¡GRACIAS! por todas las vivencias, aventuras, travesuras y todo lo que  
en algún momento de nuestras vidas recordaremos como algo  
inolvidable y que esta amistad que nos ha unido prevalezca por mucho  
tiempo más.

## ***LABORATORIO DE QUÍMICA ANALÍTICA AMBIENTAL***

Adolfo, Humberto, Lucía, Pilar y Silvia ¡GRACIAS! por haberme brindado toda su confianza y paciencia y sobre todo por haberme permitido que este laboratorio fuera "mi segunda casa". Ha sido muy importante para mí el poder haber contado con todo su apoyo y por haberme hospedado y hacer uso de este laboratorio gran parte de la carrera. ¡GRACIAS! a cada uno de ustedes por compartir conmigo sus conocimientos y su gran interés por hacerme participar en cada uno de sus trabajos, por haberme hecho sentir útil. ¡Y NO SE ME OLVIDA QUE TENGO UNA GRAN DEUDA CON ESTE LABORATORIO, AL CUAL APRENDÍ A QUERER Y VALORAR POR TODO LO BUENO QUE ME DIÓ!.

## ***GLAXO WELLCOME MÉXICO***

¡GRACIAS! por ser la primera empresa en la cual me estoy empezando a desarrollar profesionalmente y por darme la oportunidad de laborar de manera responsable en la Dirección Médica. Muy en especial al Área de Asuntos Regulatorios que me han dado la satisfacción de brindarme y compartir conmigo cada uno de sus conocimientos.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!.

**UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL A ALPKEM Y ABC  
INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA, POR LA DONACIÓN  
HECHA AL LABORATORIO DEL EQUIPO FIA  
AUTOMATIZADO EN EL CUAL SE HA PODIDO LLEVAR  
A CABO EL PRESENTE TRABAJO.**

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
CAPÍTULO I	5
<b>ANTECEDENTES</b>	5
1.1 Automatización	5
1.2 Técnicas en Flujo Continuo	10
1.3 Componentes básicos del FIA	15
1.4 Composición de los diversos tipos de agua	25
1.5 El Ciclo del Nitrógeno	27
1.6 Los Nitratos en el medio Ambiente	31
1.7 Efectos Fisiopatológicos	32
1.7.1 Nitratos	32
1.8 Nitritos	33
1.9 Métodos empleados para la determinación de Nitratos y Nitritos	36
1.9.1 Determinación por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión en modo de Cromatografía de Iones (HPLC, por sus siglas en inglés)	36
1.9.2 Determinaciones por ensayos enzimáticos	37
1.9.3 Determinación Espectrofotométrica	37
a) Preparación de la Sal de Diazonio	37
b) Formación del compuesto azoico	38
CAPÍTULO II	40
<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	40
2.1 Fundamento de la Reacción	40
2.2 Metodología	42
2.2.1 Reactivos	42
2.2.1.1 Disolución Amortiguadora (NH <sub>4</sub> Cl/EDTA pH 8.5)	42

2.2.1.2 Reactivo para desarrollo de Color	43
2.2.2 Cuperización de la Columna	43
2.2.3 Configuración	44
2.2.4 Condiciones óptimas de análisis	47
2.2.5 Muestras y Estándares	47
2.2.5.1 Recolección de las muestras	47
2.2.5.2 Elaboración de la curva de Calibración para $\text{N-NO}_2^-$ y $\text{N-NO}_3^-$	48
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>50</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
3.1 Optimización de la Columna de Cadmio Cuperizado	50
3.1.1 Optimización de la Columna de Cadmio Cuperizado	50
3.1.2 Condiciones iniciales	51
3.1.3 Determinación de la eficiencia de la Columna	51
3.1.4 Comprobación de la reducción de $\text{N-NO}_3^-$ a $\text{N-NO}_2^-$ en el intervalo lineal de 0.1 a 10.0 ppm	56
3.2 Determinación de $\text{N-NO}_2^-$	63
3.2.1 Condiciones iniciales	63
3.2.2 Condiciones óptimas	66
3.3 Determinación de $\text{N-NO}_3^-$	67
3.3.1 Condiciones iniciales	67
3.3.2 Condiciones óptimas	71
3.4 Repetibilidad del Método	72
3.4.1 Desviación Estándar Relativa (D.E.R.) para $\text{N-NO}_2^-$	73
3.4.2 Desviación Estándar Relativa (D.E.R.) para $\text{N-NO}_2^-$ y $\text{N-NO}_3^-$	76
3.5 Cartas Control	79
3.6 Límite de Detección	89
3.7 Resultados de Concentración encontradas en las muestras analizadas de $\text{N-NO}_2^-$ y $\text{N-NO}_3^-$	95

## INTRODUCCIÓN

Los métodos automatizados hoy en día son de gran importancia debido a su gran apoyo dentro de la química analítica, ya que permite que se tenga mayor número de resultados en el menor tiempo posible y a menor costo.

En los equipos totalmente automatizados de análisis por inyección en flujo se están implementando diversas metodologías para análisis de aguas. Muchas de estas metodologías están basadas en artículos publicados con anterioridad en los cuales no se ha hecho un análisis muy detallado en cuanto a interferencias, reproducibilidad, repetibilidad y exactitud del mismo, lo cual es necesario cuando se trabaja en análisis de rutina ya que permite que haya un mejor manejo y control de las variables que pudiera tener el sistema, lo cual ayudaría al control de calidad.

La determinación de parámetros fisicoquímicos en agua es en la actualidad uno de los principales problemas a los que se enfrentan los laboratorios de análisis ambientales. La calidad de los resultados así como la rapidez con la que se obtienen estos es cada día más importante, por lo que se requiere de metodologías rápidas, precisas y sobre todo económicas debido principalmente a la gran demanda que en el país se tiene de este tipo de análisis.

Este trabajo tiene como finalidad desarrollar dos métodos totalmente automatizados para la determinación de nitritos y nitratos en agua.

Los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) constituyen un riesgo de contaminación potencial para las aguas subterráneas y superficiales. El límite máximo permisible actual para los nitratos para el agua potable, según la USEPA (United States Environmental Protection Agency, por sus siglas en inglés) es de 10.0 ppm y en las Normas Oficiales de Calidad del Agua es no mayor a 10.0 ppm. Concentraciones más altas pueden llevar a un envenenamiento por nitrato (metahemoglobinemia) especialmente en infantes y también pueden ocasionar cáncer.

En cuanto a los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) los dos efectos más conocidos producidos son la metahemoglobinemia y la formación de compuestos cancerígenos, como son las nitrosaminas.

Las concentraciones permitidas, según la USEPA (United States Environmental Protection Agency, por sus siglas en inglés) de los nitritos es de 1.0 ppm y en las Normas Oficiales de Calidad del Agua es no mayor a 1.0 ppm.

En este trabajo se han puesto a punto dos métodos automatizados por Análisis por Inyección en Flujo (FIA, por sus siglas en inglés), para la determinación de nitritos y nitratos en muestras de agua de distinta procedencia para que sea utilizado por laboratorios ambientales en los que el número de muestras es grande.

La determinación se basa en la reacción entre los nitritos y la sulfanilamida para formar la sal de diazonio que posteriormente reacciona con la N-1-naftiletilendiamina para obtener el compuesto azoico correspondiente, que se mide fotométricamente a 540 nm.

Esta técnica ofrece varias ventajas sobre técnicas que se usan comúnmente, como por ejemplo, la marcada disminución de costos y la rapidez para obtener un gran número de resultados por lo que hace que el control de calidad sea mejor.

El problema es llevar a cabo los análisis y que los resultados que se obtengan sean totalmente concordantes con la realidad; para ello es necesario evaluar el grado de desviación del resultado con el valor real y para ello se requieren de procesos estadísticos.

En los laboratorios de análisis la aplicación de procesos estadísticos cae dentro del campo del control y aseguramiento de la calidad de los resultados obtenidos. Sin este proceso de control y aseguramiento de la calidad no se puede afirmar que un valor es cierto y representativo de la muestra. Para ello se requiere hacer análisis por triplicado, tener siempre un blanco de referencia, llevar a cabo el manejo adecuado de reactivos y de las propias muestras, etc.

Para la determinación de nitratos se utiliza una columna de cadmio cuperizado, hecha en el laboratorio.

La muestra conteniendo los nitratos pasa a través de la columna en donde el nitrato es reducido a nitrito, y que posteriormente reaccionan con la sulfanilamida y la N-1-naftiletildiamina.

Cuando la muestra pasa a través de la columna de cadmio la señal obtenida corresponde a la concentración de nitratos más nitritos y cuando la columna no se encuentra en el sistema entonces obtenemos el valor correspondiente a nitritos.

Para calcular la concentración de nitratos se calcula primero la concentración de nitritos, en una configuración FIA diferente que no contiene la columna de cadmio cuperizado, y por diferencia con la concentración obtenida para nitratos más nitritos se obtiene la concentración de nitratos en la muestra. Cabe mencionar que para este estudio se utilizó un equipo totalmente automatizado.

## OBJETIVOS

- ❖ Desarrollar un protocolo de trabajo por Análisis por Inyección en Flujo, para la determinación de  $\text{N-NO}_2^-$  y  $\text{N-NO}_3^-$  aplicables a laboratorios de rutina de análisis de aguas.
- ❖ Demostrar que el FIA es una herramienta para solucionar problemas reales en los laboratorios ambientales.
- ❖ Desarrollar algunas metodologías automatizadas para el monitoreo de parámetros fisicoquímicos en agua por sistemas de Análisis por Inyección en Flujo.
- ❖ Optimizar los parámetros físicos y químicos para la determinación de  $\text{N-NO}_2^-$  y  $\text{N-NO}_3^-$  por FIA, en muestras de agua potable, natural y residual.
- ❖ Optimizar la determinación de  $\text{N-NO}_2^-$  y  $\text{N-NO}_3^-$  utilizando un equipo automatizado FIA.

---

# CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

### 1.1 AUTOMATIZACIÓN

Los métodos automatizados hoy en día son de gran importancia debido a su gran apoyo dentro de la química analítica, ya que permite que se tenga mayor número de resultados en el menor tiempo posible.

El término automatización se ha venido usando cada vez más desde la década de 1940 y ha preocupado a muchas personas. La idea de que las máquinas sustituirían al hombre fue motivo de temor entre los trabajadores industriales y, en realidad, la automatización ha creado nuevos empleos altamente especializados.

Los adelantos tecnológicos acarrearón mayor reducción en el esfuerzo físico mediante mecanismos automáticos para cargar y descargar las máquinas, cambiadores de herramientas y controles mecánicos, que fueron adelantos importantes en las máquinas y herramientas. Los dispositivos mecánicos como excéntricos, topes y correderas controlan operaciones específicas de una máquina. Después aparecieron los transportadores para transferir las piezas a la siguiente estación de trabajo.

En la siguiente etapa del perfeccionamiento de las máquinas aparecieron las verdaderamente automáticas, las cuales no requieren que el operario tome decisiones como ¿se debe cambiar la herramienta? ó ¿se ha logrado la dimensión correcta?. En las máquinas más modernas se utilizan sistemas de retroalimentación, con componentes que vigilan en forma continua las funciones de la máquina. Uno de estos sistemas vigila en forma continua las dimensiones de una pieza y las compara contra un valor de referencia. El sistema calcula las diferencias y retroalimenta la información a la máquina por medio de aparatos electrónicos.

La automatización es una parte de la manufactura en rápido crecimiento. Se requiere planeación cuidadosa del equipo automatizado.

No existe todavía una planta totalmente automatizada; pero ya casi se logra la automatización total. Es probable que la industria química esta más cerca de alcanzarla.

En los laboratorios analíticos hoy se requiere de realizar un número cada vez mayor de análisis y esto con mayor precisión y exactitud. Muchos de los métodos analíticos requieren de realizar muchas operaciones (medir un volumen, mezclar dos reactivos, etc.), en forma repetitiva lo cual *—por tedio—* conduce a errores. Es por ello que la automatización en los laboratorios analíticos cobra especial importancia.

La gran demanda actual de análisis en diversos campos de la química analítica, como lo son el clínico, el industrial o el farmacéutico, ha llevado a la necesidad del desarrollo de técnicas que disminuyan el costo y tiempo de los ensayos individuales, que aumenten la precisión y que posean una buena confiabilidad. Todos estos requisitos pueden ser cumplidos por técnicas automatizadas (1).

*Debido a los problemas intrínsecos que representa la automatización de ensayos en lote, se ha optado por automatizar a las operaciones en flujo, ya que en éstas se evita el uso de recipientes que frecuentemente son frágiles, y se utiliza el movimiento secuencial de líquidos a través de tubos.*

El uso de instrumentación en las instalaciones de un laboratorio ha hecho posible realizar una amplia variedad de pruebas químicas sobre una sola muestra. Los autoanalizadores se pueden utilizar para procesar rápidamente una muestra individual mediante varios análisis químicos básicos. Los resultados de estas muestras también son registrados en forma automática y *presentados para facilitar su interpretación.* Debido a la rapidez del autoanalizador y al número de pruebas que puede procesar en un período corto, se ha convertido en un método importante para la rápida obtención de datos.

Existen dos factores del desarrollo de la automatización: el primero de ellos son los avances que se han tenido en microelectrónica y microinformática, el segundo factor son las exigencias sociales que se han requerido conforme

ha aumentado el trabajo, estas a su vez se han dividido en nuevas necesidades para el caso de la química clínica, en la industria y en la ecología; y también se ha observado la disminución en costos, lo cual es un parámetro de suma importancia actual.

En cuanto a los aspectos de los cambios tecnológicos en la automatización, se han señalado dos: la actitud y las posibilidades. En el primero de ellos se puede tener una actitud correcta, donde existe un balance entre las ventajas, las necesidades y la economía; por el otro lado también se puede tener una actitud equivocada, donde se adquiera algún instrumento sin justificación alguna, es decir si se comprara algún equipo el cual su uso estuviera limitado a algo en especial y no nos pudiera ofrecer alternativas de uso. En cuanto a las posibilidades, se debe tratar de ver si se puede adquirir una nueva instrumentación que realmente haga falta dentro del laboratorio y que sea una elección adecuada; aquí también se debe tratar de adaptar la instrumentación que se tenga disponible, ya que podemos hacer que sea más funcional.

Se debe tomar en cuenta que la automatización dentro del laboratorio se divide en tres etapas: la primera de ellas es la automatización parcial de la gestión, aquí se hace la identificación de las muestras, como también se debe tener el control de los equipos; la segunda es la automatización de los procesos analíticos, aquí se toma en cuenta todas las etapas del proceso analítico desde la recepción de la muestra hasta lo que va a ser analizado, y los protocolos que van a ser implementados. Por último en la automatización integrada y total, se engloban todas las condiciones óptimas de trabajo a las cuales se va a someter la muestra, una vez que se han revisado y seleccionado las metodologías adecuadas.

Los objetivos de la automatización en Química Analítica se enlistan a continuación:

1. reducción de la intervención humana, lo cual nos conduce a evitar errores, reducir riesgos y reducir los costos.
- 2.- procesar un número de muestras elevado.

- 3.- hacer factible una técnica o un método analítico.
- 4.- aumentar la sensibilidad, la selectividad, la precisión y el campo de aplicación.
- 5.- reducir el consumo de reactivos.

Estos objetivos se encuentran relacionados con varios aspectos de la automatización en Química Analítica, como lo son: las muestras (estas pueden ser muchas o pocas), los analitos, reactivos, precisión, rapidez, economía, generación de datos, tratamiento de datos y técnica o método analítico. Todo esto debe tomarse en cuenta para que los datos obtenidos cumplan con lo que se ha establecido para el análisis.

Existen varios tipos de sistemas analíticos: los manuales (estos los realiza un operador y donde existe el riesgo de un mayor error), los mecánicos (estos sustituyen al operador por una máquina, que puede ser, por ejemplo, un *agitador magnético* o un *titulador automático*), los automáticos (estos implican programación de equipos y por lo tanto hay reducción en el trabajo humano) y los que son automatizados (estos disminuyen casi en su totalidad el desempeño humano y por lo tanto el error disminuye en forma muy pronunciada). Este último sistema es el que hoy día ha sido de gran ayuda en laboratorios donde se hacen análisis de rutina.

En este punto es importante diferenciar entre sistema automático y sistema *automatizado*, ya que existe gran confusión entre estos dos términos: los sistemas automáticos, son aquellos que originan unas acciones previamente requeridas (programadas) para ser llevadas a cabo en unos momentos determinados del proceso sin la intervención humana. Aquí el sistema no toma decisiones por sí mismo; sigue siempre la misma secuencia de operación y no tiene incorporado sistema de retroalimentación. Mientras que los sistemas automatizados, son aquellos que originan la acción de *automatizar*, un sistema de retroalimentación que les permite tomar decisiones en determinados momentos del proceso sin intervención humana.

En este caso el sistema se autocontrola y se autoajusta; la secuencia de operaciones puede ser distinta para cada situación (muestra) y se denominan a veces "completamente automáticos". En la figura 1.1.1 se simplifica lo anteriormente dicho (2).

Dentro de los sistemas automáticos (y en algunos casos automatizados) se encuentran las técnicas de flujo continuo.

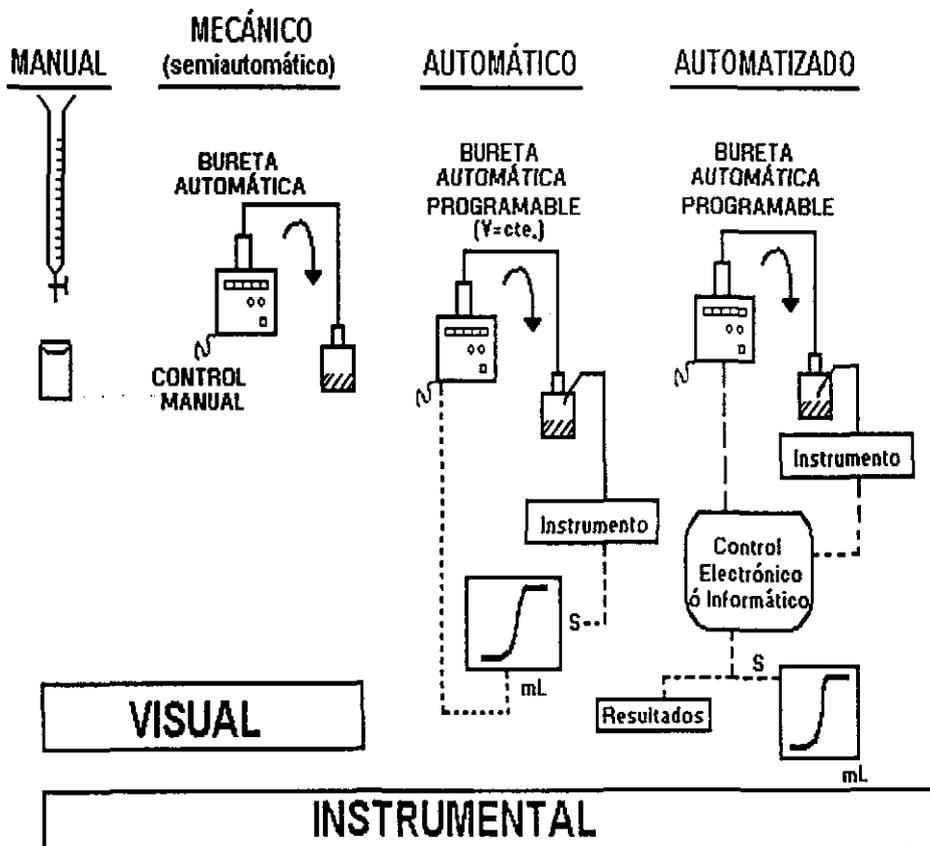


Figura 1.1.1 Diferentes tipos de sistemas.

## 1.2 TÉCNICAS EN FLUJO CONTÍNUO

En la década de los 70's se desarrolló una técnica de análisis en continuo que permite la posibilidad de automatizar un método. Teniendo como antecedente el análisis por flujo segmentado (SFA) se desarrolló el Análisis por Inyección en Flujo (FIA). Esta técnica tiene como ventaja sobre el SFA el no requerir de una etapa de lavado y poder hacer la detección en base a una dispersión controlada sin necesidad de llegar al equilibrio, con lo que el número de análisis por unidad de tiempo se ve incrementado de sobremanera. Es así como esta técnica da origen a resultados altamente reproducibles, incluso cuando la reacción química no alcanza el equilibrio, ya que se basa en una combinación de: inyección de la muestra, dispersión parcial controlada y medida precisa del tiempo que transcurre entre la inyección de la muestra y la detección del analito o de un producto de su reacción con el reactivo adecuado. Por otra parte, la técnica FIA utiliza volúmenes de muestras y de reactivos del orden de microlitros por lo que la cantidad de desechos, producto del análisis, se ve también disminuido.

De acuerdo a lo anterior, la técnica FIA tiene varias ventajas sobre la SFA, como se observa en la siguiente tabla (3):

PARÁMETROS	SFA	FIA
Introducción de la muestra	Aspiración	Inyección
Volúmen de muestra	0.2-2.0 mL	10-100 $\mu$ L
Tiempo de respuesta	2-30 min.	3-60 seg.
Diámetro interno del tubo	2.0 mm.	0.5-0.7 mm.
Detección realizada	en régimen de equilibrio	dispersión controlada
Capacidad	80 muestras/hora	300 muestras/hora
Precisión	1 a 2 %	1 a 2 %
Gasto de reactivos	elevado	bajo
Ciclo de lavado	esencial	no esencial
Análisis cinético continuo	no es posible	flujo detenido
Valoraciones	no	si
Datos suministrados	altura del pico	altura, ancho, área del pico

Dada su trascendencia en la calidad analítica, la automatización de las etapas del proceso analítico, que conectan la muestra con el instrumento, es una de las metas más importantes de la química analítica contemporánea. Sin embargo la automatización de estas etapas no es una tarea fácil. Por esta razón, es que aun continúan en uso metodologías manuales en la gran mayoría de los laboratorios analíticos de control.

Paralelamente se ha ido demostrando en los últimos años, que para la automatización de las etapas preliminares del proceso analítico, las técnicas continuas, particularmente el Análisis por Inyección en Flujo, es la forma más versátil, flexible y de menor costo para realizar una gran cantidad de operaciones del proceso analítico (4).

En la introducción de la muestra, dilución, calentamiento, mezclas, adición de reactivos (operaciones que igualmente se pueden realizar con analizadores discontinuos en discreto), con FIA además se pueden realizar procesos de diálisis, pervaporación, destilación, extracción con disolvente y otras separaciones con un alto grado de precisión, exactitud y rapidez.

También es importante destacar que, además de involucrar costos muchísimo menores que los analizadores discontinuos en discreto, tienen mayor compatibilidad con diferentes detectores (potenciométricos, amperométricos, espectrofotométricos, etc.).

Por lo tanto, se puede afirmar que la altísima relación eficiencia/costo que proporcionan las técnicas FIA para realizar procesos automáticos, lo hace altamente rentable y la sitúa como una alternativa idónea en el análisis de rutina.

A pesar del que el FIA es una de las técnicas continuas más recientes, se han desarrollado numerosas aplicaciones en los ámbitos industrial, clínico, medioambiental y biotecnológico. Estas aplicaciones se han descrito en cerca de 4000 publicaciones.

En este contexto, las metodologías FIA en el análisis de agua ofrecen muchas ventajas. Se han propuesto varias configuraciones para la determinación automática FIA de especies inorgánicas y orgánicas en matrices

de interés medioambiental, sin embargo aplicaciones reales a matrices de agua son limitadas (5-13). Cuando se determinan especies químicas en matrices medioambientales, se requieren métodos que además de ser sensibles y selectivos, aseguren o garanticen una alta precisión y exactitud en la determinación, el Análisis por Inyección en Flujo cumple con todos estos requisitos.

Este tipo de determinaciones por lo general son laboriosas y/o muy costosas por lo que la necesidad de desarrollar las metodologías rápidas y económicas es de vital importancia, sobre todo si se toma en cuenta el número elevado de muestras que es necesario analizar en laboratorios de análisis ambientales.

- Generalidades de la Técnica FIA:

El concepto básico de la técnica FIA es la inyección de un volumen medido de muestra en un flujo portador, al cual se le pueden incorporar o no diferentes reactivos antes de su llegada al detector. No se alcanza el equilibrio, por lo que la medición es en la parte cinética (3). En la figura 1.2.1 se muestra un esquema general de un sistema FIA.

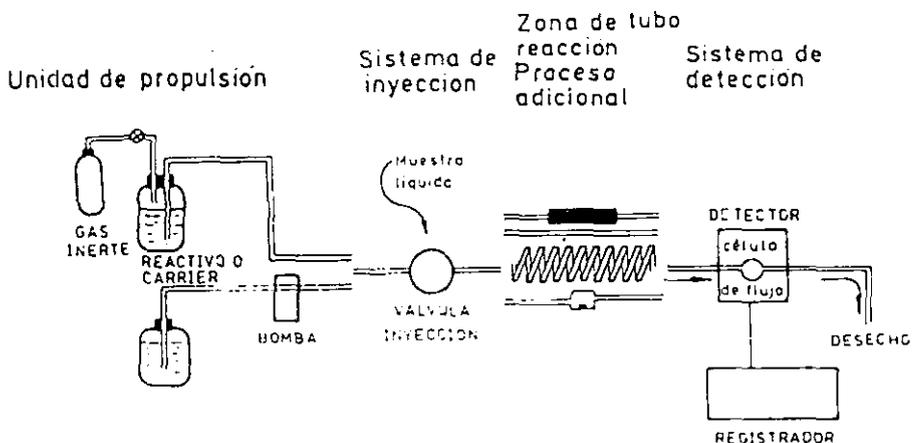


Figura 1.2.1 Esquema general de un sistema FIA

---

El FIA se basa principalmente en la reproducibilidad del volumen de inyección y en la dispersión controlada del volumen de muestra inyectado (2).

La técnica FIA presenta las siguientes características esenciales:

- 1.- El flujo es no segmentado.
- 2.- La muestra se inserta o se inyecta directamente al flujo.
- 3.- El bolo inyectado es acarreado a través del sistema. Durante este transporte puede ocurrir un proceso fisicoquímico, una reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.
- 4.- La dispersión parcial controlada o la dilución del analito se puede manipular a través de la operación de transporte controlando las características geométricas e hidrodinámicas del sistema.
- 5.- Un sistema sensor continuo da una señal transitoria la cual es registrada.
- 6.- Cuando se registra la señal, aun no se ha llegado a un equilibrio químico (finalización de la reacción) o a un equilibrio físico (homogenización de una porción del flujo).
- 7.- La técnica FIA es altamente reproducible a pesar de que se trabaja en condiciones de no equilibrio. Esto se debe a que cada inyección de muestra en el sistema recorre la misma distancia desde su inyección hasta su detección en el sistema sensor, pues la velocidad es constante (15).

El concepto de FIA fue diseñado originalmente para automatizar ensayos seriados y ha emergido como una técnica de manipulación de disoluciones y de generación de datos (14).

- Características y ventajas de los sistemas FIA:

**SENSIBILIDAD:** Los sistemas FIA son menos sensibles que sus contrapartes manuales y SFA por dos razones principales: la primera es que no se llega al equilibrio, esto es debido a que el tiempo de reacción es corto y por otro lado la dispersión física o dilución de la muestra en la disolución portadora resulta en una señal de menor intensidad a la que se obtendría con el bolo sin diluir.

Aquí se pueden cambiar las configuraciones propuestas con la finalidad de aumentar la sensibilidad. Se ha visto que la implementación de sistemas de separación continuos, incorporados a la configuración FIA, aumentan la sensibilidad. Otra forma de aumentar la sensibilidad, es usando la técnica de flujo detenido, sin que se aumente el grado de dilución, esta técnica está basada en el continuo monitoreo de la señal, mientras que el flujo permanece detenido una vez que se llega al detector.

**PRECISIÓN:** La reproducibilidad que ofrece la técnica FIA puede ser comparada con la que se observa con los métodos continuos en flujo segmentado, ya que ésta se basa en la dispersión controlada del volumen de muestra inyectado.

**RAPIDEZ:** Es una de las características por la cual esta técnica es usada, ya que permite hacer un trabajo rápido en comparación a métodos manuales, al igual que la frecuencia de análisis, ya que ésta es mucho mayor. Otros factores como son el volumen de muestra, la velocidad del flujo y el volumen interno del reactor, también influyen en la frecuencia de análisis.

**ECONOMÍA:** Esta técnica se caracteriza también por su bajo costo, ya que los volúmenes de reactivos y muestras son mínimos. También se caracteriza por su potencial para la creación de configuraciones sencillas y económicas (16).

### 1.3 COMPONENTES BASICOS DEL FIA.

Las condiciones ideales de un analizador de inyección en flujo son las siguientes (32):

- 1.- *La corriente portadora debe fluir de forma libre de impulsos a través de un tubo estrecho de diámetro estrictamente uniforme, incluyendo las secciones de inyección y detector.*
- 2.- *El volumen de disolución de muestra ( $\mu\text{L}$ ) debe inyectarse de forma reproducible, como un bolo, en el flujo del portador sin crear perturbaciones en el mismo. El volumen de muestra debe ser ajustable a voluntad.*
- 3.- *La trayectoria del flujo debe ser fácilmente reprogramable para realizar una amplia variedad de ensayos y además los laterales de la corriente deben conectarse al flujo principal de forma fácil y reproducible.*
- 4.- *El flujo a través del detector debe dar una respuesta instantánea y reproducible del analito que contiene, con señal de máximo rendimiento.*

Las partes básicas de que indefectiblemente debe constar un equipo FIA, son las siguientes:

- a) *Un sistema propulsor* de la corriente portadora a lo largo de las diferentes unidades elementales, que debe suministrar un flujo constante y regular en el sistema, ausente de impulsos y perfectamente reproducible.
- b) *Un sistema de inyección o inserción* dentro de la corriente portadora de volúmenes de muestra muy precisos, reproducibles y variables dentro de un amplio rango.
- c) *Un sistema de transporte* de la disolución que tiene como misiones fundamentales conectar entre si los diferentes elementos y conseguir en el transcurso de los fluidos a su través un adecuado grado de dispersión o mezcla de la muestra con la corriente portadora. En los casos en que el grado de dispersión no es el idóneo para el análisis, se requiera una reacción o una división adicional de la corriente, se puede intercalar en el mismo algún(os) accesorio(s) con este fin, tales como cámaras de mezcla, reactores en sus diferentes tipos, divisores del flujo, etc.

- d) *Un sistema de detección*, que permita la medida continua de una propiedad de la muestra o de su producto de reacción proporcionando información cuali y cuantitativa sobre la misma.

**SISTEMAS DE PROPULSION:** El sistema utilizado para impulsar el fluido a lo largo de un montaje FIA debe cumplir una serie de requisitos que vienen impuestos por las características de la técnica: El caudal o flujo que proporcione el sistema de propulsión ha de ser constante y perfectamente *reproducibile, con objeto de que el tiempo de residencia de la muestra en el reactor también lo sea* y de que la dispersión, directamente influenciada por el caudal se mantenga inalterada a lo largo de un estudio, permitiendo la constancia en cada punto del sistema. Una característica de la técnica FIA es la baja presión de trabajo necesaria para obtener los caudales adecuados, que generalmente oscilan entre 0.4 y 4.0 mL/min. Solo en casos excepcionales (FIA capilar o divisiones de flujo) el caudal exigido al sistema propulsor se sitúa por debajo o encima, respectivamente, de este rango.

***Bombas Peristálticas:*** Es el tipo más común y utilizado en FIA. Consta de un tambor con una serie de rodillos cuyo número y diámetro depende del modelo y sobre los cuales se comprimen los tubos flexibles, en el interior de los cuales circularán las disoluciones al ser comprimidos los tubos entre cada dos rodillos por el movimiento del tambor. Estas bombas proporcionan un flujo a impulsos, tanto mayores cuanto mayor es el diámetro de los rodillos. *Un esquema de esta unidad se encuentra en la figura 1.3.1.*

El número de canales (tubos) en los que pueden impulsarse fluidos al mismo tiempo en función de la longitud de los rodillos y varia generalmente entre 1 y 16, siendo el modelo más común el de cuatro canales.

# BOMBA PERISTÁLTICA

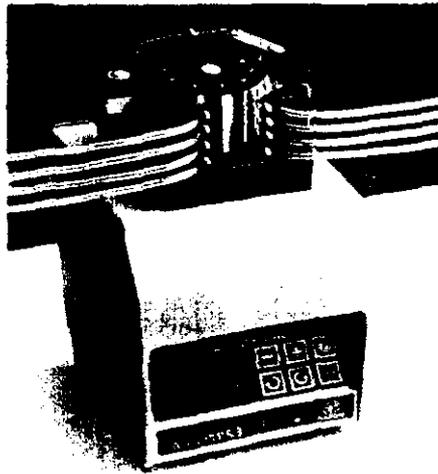


Figura 1.3.1 Bomba Peristáltica

Los tubos de bomba se fabrican en distintos materiales, cada uno de los cuales posee unas características que lo hacen adecuado para la impulsión de un determinado tipo de fluidos. En la tabla 1.3.2 se recogen los tipos de disoluciones tanto orgánicas como inorgánicas y el material de tubo más adecuado. El ataque de estos tubos por diversas disoluciones puede ser inadecuado su uso, según los casos. Así los tubos de PVC, solvaflex, tygon y goma de silicona no resultan convenientes para disoluciones muy ácidas o para disolventes orgánicos puros; mientras que el tipo acidflex es especialmente inadecuado para la impulsión de cetonas. Cada casa comercial de las que suministran este tipo de material posee un código de colores en función del diámetro del tubo, que ofrece una orientación del caudal a suministrar por cada color; caudal que es necesario verificar para cada determinada experiencia después de mantener la bomba en funcionamiento durante unos minuto.

	TIPOS	MATERIAL DE TUBO ADECUADO (Nombre comercial)
<b>DISOLUCIONES INORGANICAS</b>	- Dis. acuosas	PVC, Tygon
	- Dis. etanólicas diluidas	PVC, Tygon
	- Acidos y bases diluidos	PVC, Tygon, Goma de silicona
	- Acidos y bases concentrados	Fluoroplastos (Acidflex de Technicon)
	- Alcoholes	PVC modificado (Solvaflex, Technicon)
	- Alcoholes de bajo peso molecular	Goma de silicona
	- Formaldehído, acetaldehído	PVC, Tygon
<b>DISOLUCIONES ORGANICAS</b>	- Acetona	Goma de silicona
	- Acido y anhídrido acéticos	Goma de silicona
	- Hidrocarburos alifáticos	PVC modificado (Solvaflex, Technicon)
	- Hidrocarburos aromáticos	Fluoroplastos (Acidflex Technicon)
	- Cloroformo	Fluoroplastos (Acidflex de Technicon)
	- Tetracloruro de carbono	PVC modificado (Solvaflex, Technicon)

Tabla 1.3.2 Tubos de Bomba Peristáltica

---

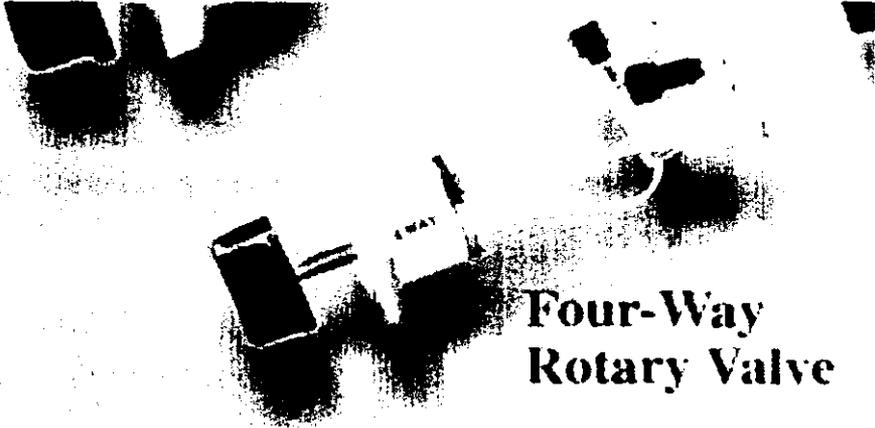
**SISTEMAS DE INYECCION:** Tienen como objeto situar una zona bien definida de muestra dentro de la corriente de fluido portador, continuamente en movimiento.

Un componente de este tipo para un sistema FIA ha de cumplir una serie de requisitos que emanan de las características intrínsecas de la técnica, siendo las más importantes las siguientes:

- a) Ha de insertar volúmenes exactos y perfectamente reproducibles de la disolución problema. Es deseable que estos volúmenes puedan variarse dentro de un amplio rango; lo que hará más versátil el sistema.
- b) La intercalación de la muestra en el flujo portador se ha de producir de forma que no se creen perturbaciones en el mismo.
- c) Su manejo ha de ser fácil, cómodo y rápido, de forma que se consiga una alta frecuencia de muestreo, además de permitir su control mediante un motor eléctrico para automatizar la técnica.

**Válvula de Inyección Rotatoria:** Dentro de este tipo se va a describir el sistema más comúnmente usado, que es la llamada válvula hexagonal. Consta, según se muestra en la figura 1.3.3 (a), de seis orificios, tres de entrada y tres de salida, pudiendo adquirir dos posiciones: en la posición de llenado la muestra entra en la válvula por el orificio 2 llenando el bucle (orificios 1 y 4) y saliendo continuamente por el desecho (orificio 3); en tanto la corriente portadora entra en la válvula por el orificio 6 saliendo hacia el reactor por el 5. En la posición de vaciado el orificio 6 de entrada de carrier en la válvula conecta internamente por el 1 arrastrando el bolo de muestra a través de 4 y 5 hacia el reactor, mientras la muestra penetra en la válvula por el 2 saliendo por 3 hacia el desecho, ver figura 1.3.3 (b).

(A)



(B)

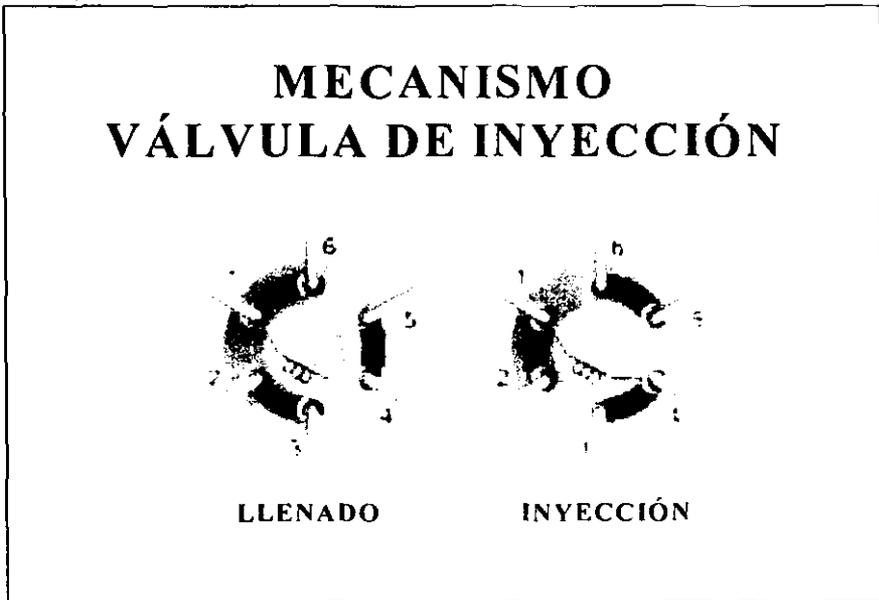


Figura 1.3.3 (A) Válvula de Inyección Rotatoria  
(B) Mecanismo de la Válvula de Inyección

**SISTEMAS DE TRANSPORTE Y REACCION:** Estos componentes tienen como objetivo, además del primordial de trasladar la corriente de fluido a lo largo del manifold, permitiendo, si ha lugar, que la reacción transcurra en su interior en la proporción adecuada, el de servir como nexo de unión de las diversas partes que constituyen el sistema de trabajo.

**Tubos:** Los sistemas de transporte son tubos de pequeño diámetro 0.1 a 2.0 mm, siendo comúnmente utilizado el de 0.5 mm cuando la dispersión requerida es media, mientras que cuando se necesita que ésta tenga un valor inferior o superior al medio, se suelen usar diámetros de 0.3 y 0.7 mm, respectivamente. Diámetros superiores son de poca utilidad puesto que los restantes componentes no están diseñados al efecto; las expansiones –tubo- y compresiones –otros componentes- producen irregularidades que modifican notablemente la dispersión.

Para la construcción de estos tubos se requieren materiales de alta inercia química e inalterables a los cambios de temperatura dentro de un amplio rango. Los materiales más comúnmente usados son teflón, polietileno y polipropileno, que son bastante permeables al oxígeno, lo que supone un problema aún no resuelto cuando se trabaja con reductores fuertes o en la comprobación de oxidaciones atmosféricas catalizadas.

La longitud de los tubos, función del sistema en estudio (sin o con reacción química), es muy variable y puede oscilar desde pocos centímetros hasta 40 metros o incluso más.

La unión de los tubos entre si y con las diversas partes del sistema se realiza por medio de conectores. La conexión ha de llevarse a cabo de manera cuidadosa para que no se produzcan volúmenes muertos ni dé lugar a pérdidas de disolución o entrada de burbujas de aire.

**Conectores:** Existe una amplia gama de conectores ya sea de perspex o de teflón, que se adaptan a las necesidades de cada sistema en particular y que, considerados en orden de complejidad creciente son: doble, triple y cuádruple, existiendo dentro de ellas diversas configuraciones. Las uniones dobles pueden estar en prolongación o en V.

La distancia entre los extremos de ambos tubos en el conector doble tipo debe ser tan pequeña como sea posible, con objeto de hacer mínimo el volumen muerto en este punto, ya que este actúa como una minicámara de mezcla con el consiguiente aumento de la cola del pico. La distancia perfectamente determinada, entre ambos extremos de tubo hace que este tipo se utilice cuando se requiere un punto de mezcla, de forma más o menos efectiva en función de la velocidad de flujo del sistema.

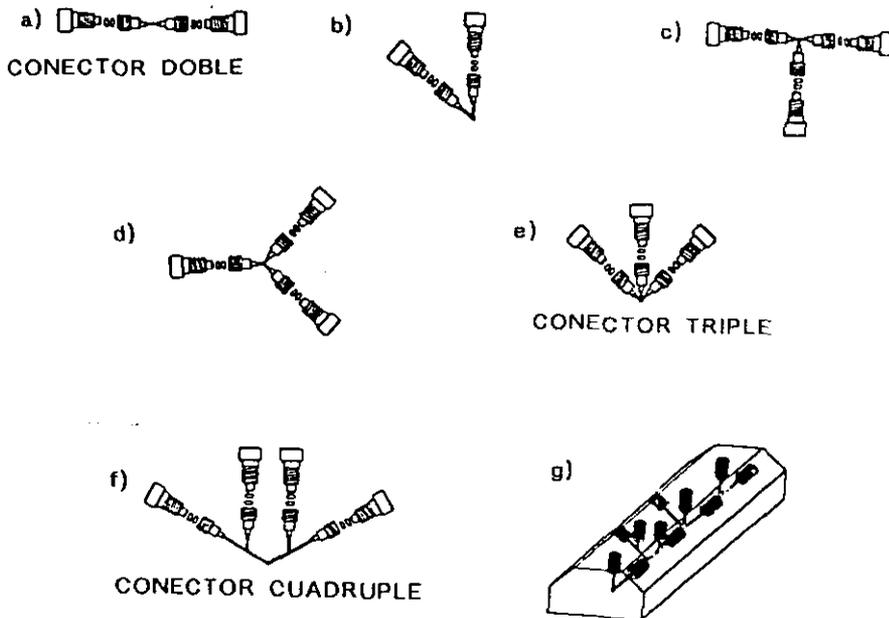


Figura 1.3.4 Diversos tipos de Conectores

- a) y b) Conectores dobles sin y con punto de mezcla respectivamente
- c), d) y e) distintas configuraciones de conector triple
- f) conector cuádruple
- g) Chemifold tipo IV que incluye doble, triple y cuádruple conector.

**Reactores:** Son unidades dentro del sistema de transporte que actúan sobre el tiempo de residencia y perfil del bolo de muestra de forma que a su paso por la unidad de detección éste posea las características adecuadas para la medida. Pueden responder a diferentes tipos en función de las necesidades de cada sistema:

**Tubos abiertos:** Reciben este nombre los reactores constituidos por un tubo recto de diámetro y longitud variable, que se encuentra situado en el sistema de inyección y el detección.

**Serpentines:** Consisten en tubos de los considerados para el transporte que se enrollan helicoidalmente en torno a un cilindro rígido del diámetro deseado. La longitud de este tubo es función del tiempo de residencia requerido para la mezcla más adecuada de portador o reactivo y muestra. El diámetro del serpentín modifica la dispersión de la muestra.

**Reactores empaquetados:** Están constituidos por una zona de tubo rellena de un material inerte o activo químicamente. Su uso en FIA no está muy extendido debido a los problemas que plantea, ya que un relleno de tamaño grueso produce irregularidades insalvables en el flujo, en tanto el uso de un tamaño de grano pequeño, que produce un flujo más regular, da lugar a una mayor compacidad del reactor, lo que se traduce en una oposición al flujo que hace necesario el uso de presiones altas, lo que esta en franca contradicción con las peculiaridades de la técnica. Los reactores empaquetados que más atención han recibido en FIA han sido los químicamente activos, tales como los de cambio iónico, redox y enzimáticos.

**Single-bead string reactor (SBSR):** Cuyo nombre español podría ser -reactor de bolitas en cadena simple (RBCS)-. Consiste en un tubo de longitud variable relleno de bolitas de vidrio o de un polímero químicamente inerte, cuyo diámetro es un 60-80% del diámetro del tubo, de forma que en cualquier sección del mismo existe una única bolita. El volumen no ocupado por el relleno es grande, por lo que el flujo no encuentra mucha resistencia a su paso. El uso de este reactor presenta una serie de ventajas, como son: aumento del tiempo de residencia, disminución ostensible de la dispersión y alisamiento de

la línea de base en relación con los tubos abiertos, probablemente debido a que las bolitas actúan como supresoras de impulsos. El tiempo de retorno a la línea de base permanece razonablemente constante para diferentes longitudes del SBSR.

*Cámaras de mezcla:* Se utilizan cuando se precisa un mayor grado de mezcla (punto de confluencia o minicámara sin agitación) o una total homogeneización de muestra y reactivo (minicámara con agitación). Generalmente se requiere un mayor grado de mezcla cuando se utiliza un sistema eléctrico de detección y cuando las diferencias de viscosidad, gravedad específica, temperatura, contenido en detergentes, etc. entre el carrier y la muestra son muy grandes (33). También se emplean para llevar a cabo las denominadas -valoraciones FIA- (34).

La zona de confluencia en el conector constituye en mayor o menor proporción un punto de mezcla. El efecto de mezclado es más patente en el caso del conector triple o cuádruple, en el cual generalmente confluyen dos o más flujos diferentes. No obstante, una minicámara de mezcla propiamente dicha está constituida por una porción más ensanchada incluida en el reactor (35).

## 1.4 COMPOSICIÓN DE LOS DIVERSOS TIPOS DE AGUA

De los océanos, el agua se evapora y es transportada sobre las masas territoriales, donde se puede depositar por una u otra forma de precipitación (lluvia, nieve, granizo, etc.). Durante su paso del océano a la superficie terrestre, el agua atraviesa la parte inferior de la atmósfera. Debido a esto, tiene la posibilidad de equilibrarse con los gases en la atmósfera.

La composición promedio de estos en la atmósfera inferior se encuentra en la tabla 1.3.1. Es necesario darse cuenta que la composición promedio de estos gases en la atmósfera está sujeta a variaciones considerables, especialmente en los niveles de ciertos constituyentes menores como son CO<sub>2</sub>, CO, SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, etc., que son productos de los procesos de combustión y están asociados con la contaminación atmosférica que hay en las comunidades urbanas-industriales (17).

**TABLA 1.3.1: Composición media de la atmósfera.**

Gas	Porcentaje en volumen	Presión parcial (atm)
N <sub>2</sub>	78.1	0.781
O <sub>2</sub>	20.9	0.209
Ar	0.93	0.0093
H <sub>2</sub> O	0.1-2.8	0.028
CO <sub>2</sub>	0.03	0.0003
Ne	1.8 X 10 <sup>-3</sup>	1.8 X 10 <sup>-5</sup>
He	5.2 X 10 <sup>-4</sup>	5.2 X 10 <sup>-6</sup>
CH <sub>4</sub>	1.5 X 10 <sup>-4</sup>	1.5 X 10 <sup>-6</sup>
Kr	1.1 X 10 <sup>-4</sup>	1.1 X 10 <sup>-6</sup>
CO	(0.06-1) X 10 <sup>-4</sup>	(0.06-1) X 10 <sup>-6</sup>
SO <sub>2</sub>	1 X 10 <sup>-4</sup>	1 X 10 <sup>-6</sup>
N <sub>2</sub> O	5 X 10 <sup>-5</sup>	5 X 10 <sup>-7</sup>
H <sub>2</sub>	5 X 10 <sup>-5</sup>	5 X 10 <sup>-7</sup>
O <sub>3</sub>	(0.1-1.0) X 10 <sup>-5</sup>	(0.1-1.0) X 10 <sup>-7</sup>
Xe	8.7 X 10 <sup>-6</sup>	8.7 X 10 <sup>-8</sup>
NO <sub>2</sub>	(0.05-2) X 10 <sup>-5</sup>	(0.05-2) X 10 <sup>-8</sup>
Rn	6 X 10 <sup>-18</sup>	6 X 10 <sup>-20</sup>

En una tierra que no este poblada por organismos vivos, las aguas naturales formadas por las interacciones agua-aire-tierra fluirían de nuevo hasta el océano llevando los diversos constituyentes disueltos, así como partículas suspendidas de arcilla y arena.

Las actividades del hombre pueden influir en la calidad del agua en muy diversas formas incluyendo la descarga de desechos municipales, industriales y agrícolas a las aguas superficiales y subterráneas. Los desechos domésticos aumentan el contenido de materia mineral y orgánica de las aguas naturales.

El agua de desecho tanto de la industria como de fuentes agrícolas y domésticas, contiene una gran variedad de compuestos orgánicos. La presencia de compuestos orgánicos persistentes (no biodegradables) en aguas de desecho afecta el agua dependiendo de la naturaleza de dichos materiales. Por ejemplo, los productos de la degradación microbiana (materiales húmicos) pueden dar a el agua un color café y modificar el comportamiento de los iones metálicos. Los materiales tóxicos (tanto inorgánicos como orgánicos) pueden modificar o eliminar los procesos biológicos que se llevan a cabo en el agua natural. Los compuestos orgánicos de origen industrial pueden causar sabores y olores, o bien pueden tener efectos indeseables sobre la salud si no se les elimina durante la purificación para obtener agua potable. Los compuestos orgánicos de todos tipos pueden reaccionar con los productos químicos en el *tratamiento del agua y así producirse nuevos compuestos orgánicos con efectos indeseables.*

Las aguas naturales en sí nunca están libres de organismos. Aún el agua tratada por desinfección para el suministro público contiene microorganismos. La importancia de estos en el agua natural se relaciona con los tipos de transformaciones químicas que catalizan. El crecimiento de algas en un agua natural puede agotar casi por completo las concentraciones de fósforo y nitrógeno en ella; de hecho, esta situación se da donde la cantidad y la rapidez de crecimiento de los organismos acuáticos fotosintéticos están controladas por las concentraciones de nutrientes como nitrógeno ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) y fósforo ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).

## 1.5 EL CICLO DEL NITRÓGENO

La forma en que el nitrógeno circula sobre la superficie de la tierra y en su atmósfera por lo general se representa como el ciclo del nitrógeno (fig. 1.4.1). Muchas de las reacciones del ciclo del nitrógeno son reacciones redox catalizadas por microorganismos. Estas son la oxidación de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_2^-$  y después a  $\text{NO}_3^-$  (nitrificación), la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  y posteriormente a  $\text{NH}_4^+$  (reducción del nitrato), la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$  (g) (desnitrificación) y la reducción de  $\text{N}_2$  (g) a  $\text{NH}_4^+$  (fijación del nitrógeno). La incorporación de  $\text{NH}_4^+$  a la materia orgánica que contiene nitrógeno (aminación) o su desprendimiento (desaminación o amonificación) es la única reacción del ciclo del nitrógeno en que se verifica una transformación de este elemento y que no corresponde al tipo de oxidación-reducción (17).

A menudo, los procesos bioquímicos del nitrógeno se estudian en términos de los microorganismos que llevan a cabo muchas de las etapas de oxidación y de reducción. Los microbios y las enzimas son catalizadores, y únicamente llevan a cabo las reacciones redox que permite la disponibilidad de electrones.

El nitrógeno tiene muchos estados de oxidación que podrían ser estables dentro del rango de estabilidad redox del agua. Se pueden seleccionar los estados de oxidación estables, si se comparan los potenciales de electrodo de todas las parejas redox posibles. Por ejemplo, el nitrato se reduce a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) a  $E^\circ = 0.95 \text{ V}$  y a  $\text{N}_2$  a  $E^\circ = 1.25 \text{ V}$ . Si se agrega un reductor a una disolución de nitrato y si la reacción redox es reversible, entonces todo el nitrato deberá reducirse a  $\text{N}_2$  antes de que el potencial de electrodo disminuya lo suficiente como para reducir el nitrato a nitrito. En consecuencia, los iones de nitrito son inestables y se descomponen de manera espontánea para formar  $\text{N}_2$ . En realidad las disoluciones de nitrito son inestables, pero se descomponen sólo de manera lenta.

Los estados de oxidación estables del nitrógeno dentro de los límites de estabilidad del agua, son los correspondientes al nitrato,  $\text{N}_2$  y al amoníaco.

En la figura 1.4.2 se muestran sus relaciones de oxidación y reducción. La zona de estabilidad está dominada por el  $N_2$ . El nitrato es estable sólo a condiciones oxidantes a un  $pH > 3$ . El amoniaco es estable sólo en condiciones reductoras. Las zonas de estabilidad del  $NO_3^-$  y del  $NH_3$ , depende de la concentración y se incrementan levemente al disminuir las concentraciones de la disolución correspondiente.

El nitrito y el óxido nitroso pueden estar presentes sólo en concentraciones muy bajas en el equilibrio. Concentraciones más altas de estos compuestos (y de  $NO$ ,  $NO_2^-$ ,  $N_2O_4$ ) son inestables, es decir, tenderán a convertirse en  $NH_4^+$ ,  $N_2$  o  $NO_3^-$  (18).

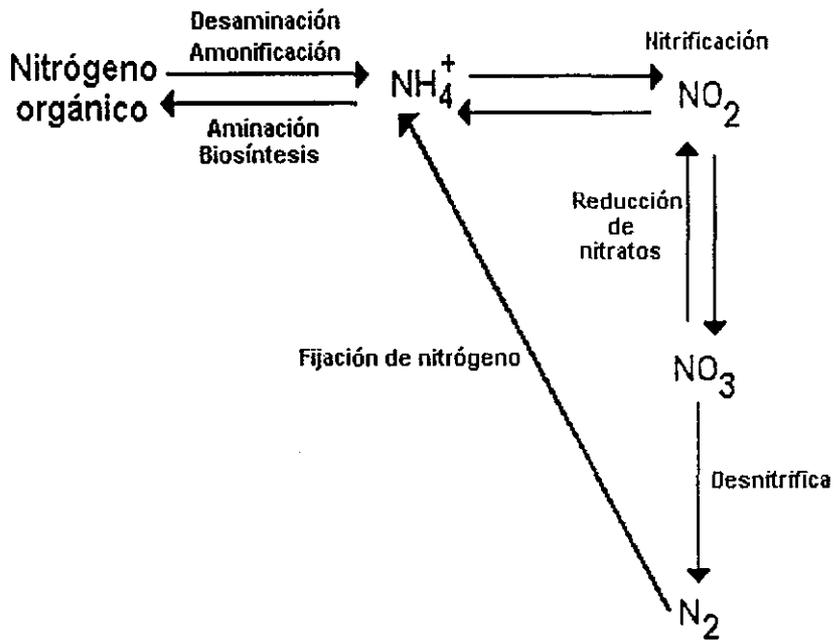


Figura 1.4.1 El ciclo del nitrógeno

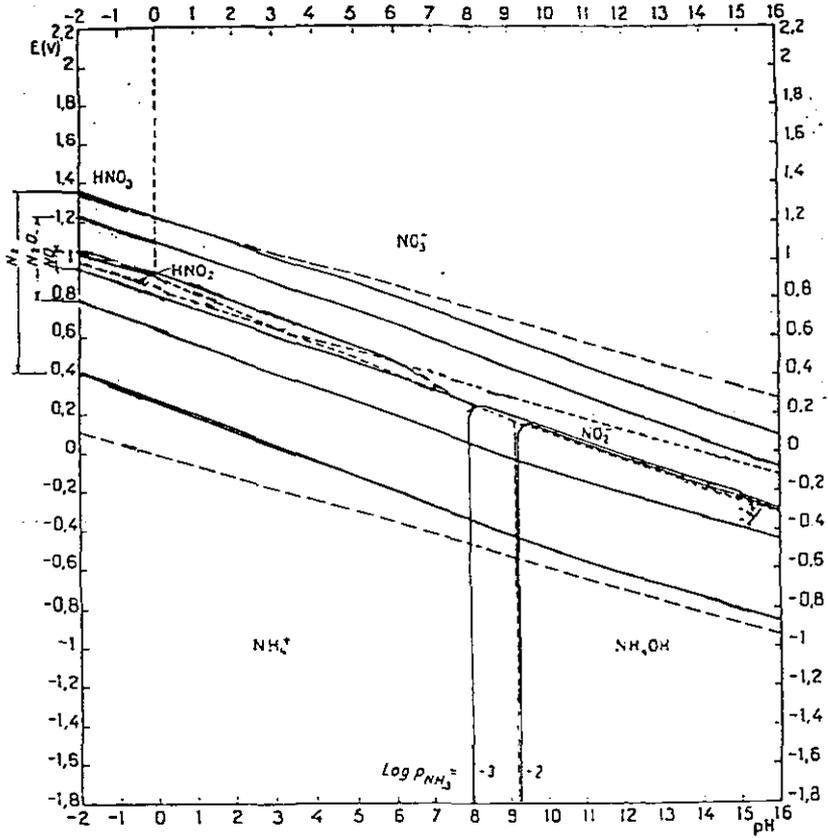


Figura 1.4.2 Diagrama de potencial para el nitrógeno

## 1.6 LOS NITRATOS EN EL MEDIO AMBIENTE

El agua potable es una primera opción para consumo de nitratos, ciertas aguas de aducción presentan contenidos en nitratos altos. Estos nitratos provienen principalmente de la agroquímica, los abonos nitrogenados constituyen un factor clave de la producción agrícola, permitiendo al mismo tiempo evaluaciones de los rendimientos por unidad de superficie o la posibilidad de crecimiento de especies seleccionadas de alto rendimiento (19).

Bajo condiciones favorables de crecimiento, el nitrógeno que entra en la raíz como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) es pronto convertido a algún aminoácido que son los principales constituyentes de proteínas.

Los nitratos no son normalmente acumulados en tejidos de plantas excepto bajo condiciones de estrés tal como tiempo nublado, sequía y escasez de nutrientes (excepto nitrógeno), donde se acumularían, especialmente en la porción del tallo, en niveles que son tóxicos para el ganado (20).

El tracto digestivo humano es incapaz de utilizar alguno de los iones básicos -nitrato, nitrito o amonio-. Esta capacidad está limitada a las plantas inferiores, especialmente bacterias. Dichas bacterias pasan al tracto digestivo de rumiantes, de este modo estos pueden utilizar los iones individuales y también la urea (20).

El agua superficial contiene solo pequeñas cantidades de nitratos porque los sistemas son siempre marginalmente deficientes en nitrógeno disponible. Históricamente el hombre ha aumentado el contenido de nitratos en agua superficial por destrucción de la vegetación, cultivo de suelo y más recientemente por adicionar fertilizantes que contengan nitrógeno.

La primera preocupación por el nitrógeno como factor ambiental estuvo enfocado al riesgo en la salud por exceso de nitratos en el agua potable. Los nitratos son encontrados en cantidades variables en muchos alimentos, aunque la mayor parte se encuentran en agua potable y en lagos (20).

## 1.7 EFECTOS FISIOPATOLÓGICOS

### 1.7.1 NITRATOS

Los nitratos se consideran no tóxicos, se ha comprobado por medio de animales de laboratorio que pueden ingerir crónicamente dosis elevadas de nitratos sin sufrir daños importantes. El único síntoma característico es su carácter diurético. El modo de acción diurético es de tipo osmótico: el ión nitrato desplaza una importante fracción de ión cloruro y provoca paralelamente una importante pérdida de sodio, y por lo tanto de agua; los cationes empleados ( $K^+$  y  $Na^+$ ) participan también en esta acción diurética, determinando también una excreción incrementada de sodio y de agua. Actualmente, el nitrato de potasio se utiliza en terapéutica para combatir las alteraciones debidas a una hipocalcemia; el ion nitrato, asociado al ion potasio, induce diuresis y elimina las carencias potásicas.

Sólo en dos condiciones podemos tener una toxicidad por nitratos: en primer lugar si tiene una ingestión realmente masiva de estos compuestos y en segundo lugar si los nitratos se transforman en nitritos por la microflora digestiva.

Ingerimos esencialmente nitratos y cantidades traza de nitritos, en una alimentación equilibrada, su ingestión en forma de aditivos alimentarios es relativamente puntual: embutidos, etc. La ingestión potencial principal de nitratos es debida, principalmente, a las verduras, más que al agua potable (19).

Se ha considerado que el nivel tolerable de nitratos contenidos en agua potable, está directamente relacionado a la cantidad de agua consumida.

El nitrato es totalmente reducido por microorganismos y absorbido como nitrito. La dosis letal de  $N-NO_3^-$  para humanos es cerca de 20 mg/kg. Una quinta parte de la dosis letal es la máxima cantidad diaria de  $N-NO_3^-$  que puede ser tolerada sin causar síntomas tóxicos (20).

## 1.8 NITRITOS

Los dos efectos más conocidos producidos por los nitritos son la metahemoglobinemia y la formación de compuestos cancerígenos, las nitrosaminas.

### 1.8.1 Metahemoglobinemia

La metahemoglobinemia constituye el efecto directo más grave.

La importancia vital de la hemoglobina es bien conocida; representa un modelo molecular ideal, es una heteroproteína eritrocitaria, formada por una parte proteica, la globulina (con 4 cadenas de composición variable, estas distintas cadenas caracterizan las diversas hemoglobinas) y de un grupo prostético, el grupo hemo. Para que la hemoglobina pueda desarrollar su función vital como pigmento respiratorio (es decir, siguiendo el ritmo permanente de ventilación pulmonar, fijar el oxígeno atmosférico y cederlo posteriormente a los tejidos, con la correspondiente pérdida de anhídrido carbónico), el hierro del grupo hemo debe estar obligatoriamente en estado ferroso ( $Fe^{**}$ ).

La metahemoglobinemia puede definirse como una acumulación anormal, en el glóbulo rojo, de metahemoglobina, una forma de hemoglobina no funcional, con el hierro del hemo en estado férrico ( $Fe^{***}$ ). Esta forma oxidada es reversible; en el hombre, en condiciones normales, hay aproximadamente un 0.8% de hemoglobina total en forma de metahemoglobina. Esta metahemoglobina se forma espontáneamente, los mecanismos que la originan son poco conocidos; probablemente deriva de fenómenos complejos de autooxidación y sus niveles se estabilizan gracias a sistemas enzimáticos reductores contenidos en los eritrocitos.

Podemos distinguir varios tipos de metahemoglobinemia. Las formas más graves son de tipo molecular: provienen de una conformación anormal de una de las cadenas proteicas de la globina o de una deficiencia de los sistemas enzimáticos eritrocitarios de protección. Puede ocurrir también que estos últimos sistemas estén saturados por la acción de agentes tóxicos que oxidan el hierro del hemo.

Los nitritos son un ejemplo de venenos metahemoglobinizantes, entre otros posibles tóxicos como anilinas, derivados aromáticos nitrosados, medicamentos (fenacetina, nitrito de amilo, trinitina, etc.). También aquí observamos que solo los nitritos son agentes methemoglobinizantes directos; los nitratos son agentes indirectos, necesitan una previa reducción a nitritos.

Se han observado varios casos de metahemoglobinemias por nitritos en diversas condiciones:

- sobredosis en los embutidos,
- ingestión accidental, en alimentos y bebidas contaminadas.

En la ingestión anormal de nitratos también se han detectado numerosos ejemplos:

- por ingestión de verduras (espinacas, zanahorias, etc.), o de aguas excesivamente ricas en nitratos,
- por sobredosis de medicamentos de nitrato de potasio o de subnitrato de bismuto, con la presencia subyacente de una flora reductora nitritógena activa, en los alimentos, en el agua potable o en el tubo digestivo.

La sintomatología tiene como rasgo característico la cianosis, que se hace perceptible cuando la metahemoglobinemia excede aproximadamente el 10% de la población de glóbulos rojos. La coloración de la piel y mucosas, especialmente en la cara y en las extremidades, toma matices grisáceos que se vuelven negruzcos en las formas avanzadas. Cuando la metahemoglobinemia sobrepasa el 20% aparecen los signos clínicos efectivos: cefaleas, vértigos, polipneas, taquicardia, astenia general. Por encima del 60%, se presentan alteraciones del conocimiento junto con diversos signos neurológicos: rigidez, curvaturas, síndrome piramidal, alteraciones oculares, etc. Por encima del 70%, la intoxicación puede resultar mortal.

En las formas leves o moderadas se administran dosis elevadas de ácido ascórbico (1-4 g por vía intravenosa). En los casos límite, donde el tratamiento con ácido ascórbico es insuficiente, se administra lentamente, por vía intravenosa, azul de metileno.

Los casos mortales de metahemoglobinemia son relativamente raros en el hombre, por tres razones esenciales: primero, la acidez gástrica limita la actividad reductora de la flora estomacal, lo que permite una importante absorción de los nitratos; por otro lado, los nitritos pueden oxidarse a nitratos, por ejemplo, por la acción de catalasas asociadas a la xantina oxidasa; finalmente existe en el organismo, tres sistemas enzimáticos de reducción que regeneran la hemoglobina a partir de la metahemoglobina, los tres se localizan en los eritrocitos y funcionan con cofactores reducidos de NAD o NADP (19).

## 1.9 MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS

### 1.9.1 Determinación por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión, en modo de Cromatografía de iones (HPLC, por sus siglas en inglés).

La Cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra es distribuida entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, de tal forma que cada una de los componentes de la mezcla es selectivamente retenido por la fase estacionaria (21).

Por medio de esta técnica se han hecho determinaciones simultáneas de nitratos y nitritos, mediante un intercambio aniónico usando columnas como Partisil SAX, y como fase móvil un buffer de ácido fosfórico-ortofosfato potásico 0.030 M y un pH de 3.5 y con un detector de UltraVioleta Visible (UV-VIS).

En este caso se han obtenido límites de detección de 0.2 ng para nitratos y 0.1 ng para nitritos. La reproducibilidad del método, calculado como desviación estándar relativa en el rango óptimo es menor al 2% para nitratos y 5% para nitritos (22).

Si se hace una comparación entre las diferencias que existen entre esta técnica con la técnica del FIA, se puede observar que la principal diferencia es el fundamento de la técnica ya que en el HPLC siempre hay una interfase que logra la separación de una mezcla de sustancias que pasan por una columna, en FIA esta situación no es la normal; otra diferencia es la presión, en FIA la presión es baja mientras que en HPLC la bomba (generalmente de doble pistón) debe imprimir una presión alta para vencer la resistencia hidrodinámica de la columna cromatográfica rellena de un material finamente dividido para aumentar la eficacia del proceso. A pesar de que se han desarrollado métodos FIA usando los componentes del HPLC, los sistemas FIA ordinarios son mucho más simples al no tener que estar diseñados para resistir altas presiones.

### 1.9.2 Determinaciones por Ensayos Enzimáticos

También existen determinaciones a partir de ensayos enzimáticos, estos procedimientos resultan ser también costosos y muy delicados ya que las enzimas que se usan en ellos necesitan de un cuidado especial. Además de que se necesitan condiciones especiales, como lo son la temperatura, el pH, etc.

En este caso el principio del ensayo es mediante una reducción de nitratos a nitritos usando a la enzima nitrato reductasa; la reacción es la siguiente:



Donde:

$\beta\text{-NADPH}$ =  $\beta$ -Nicotinamida Dinucleótido Fosfato Adenina  
forma reducida.

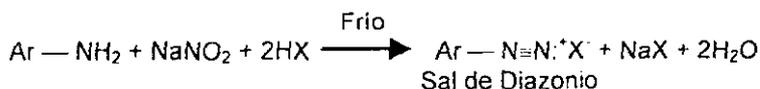
$\beta\text{-NADP}$ =  $\beta$ - Nicotinamida Dinucleótido Fosfato Adenina  
forma oxidada.

Condiciones: Temperatura=25°C, pH=7.5, Longitud de Onda=340 nm,  
Paso Optico= 1 cm (23).

### 1.9.3 Determinación Espectrofotométrica

#### a) Preparación de la sal de diazonio.

Cuando se trata una amina primaria, disuelta o suspendida en un ácido mineral acuoso con nitrito de sodio, se genera una sal de diazonio. Puesto que éstas se descomponen lentamente, aún a temperaturas de un baño de hielo, sus soluciones, una vez preparadas, se emplean de inmediato.



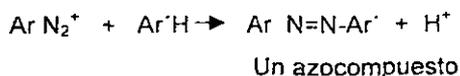
Las sales de diazonio dan lugar a un gran número de reacciones y pueden agruparse en dos clases **reemplazo**, en la que se pierde nitrógeno como  $N_2$  y en su lugar queda otro átomo o grupo, y **copulación**, en la que el nitrógeno queda retenido.

Las sales de diazonio son valiosas en síntesis, no sólo porque dan tantos tipos de compuestos, sino también porque pueden prepararse con casi todas las aminas primarias aromáticas. Las aminas de las que se preparan sales de diazonio se obtienen sin problemas a partir de los correspondientes nitrocompuestos, que se preparan, a su vez, por nitración directa (24).

El proceso de formación de las sales de diazonio es llamado diazotización y fue descubierto por P. Griess en 1858. Las sales de diazonio sólidas son cristalinas e incoloras aunque se oscurecen en contacto con el aire. Se trata de sustancias inestables que pueden explotar cuando se calientan o al estar sujetas a choques mecánicos, por lo que su elaboración puede ser peligrosa; además de que sus disoluciones se descomponen con producción de nitrógeno cuando se permite que se encuentren a temperatura ambiente. La mayoría de las sales de diazonio son solubles en agua y usualmente se preparan en disoluciones ácidas utilizándose sin ser purificadas previamente. Si se desea almacenar, se debe realizar bajo condiciones especiales ya que son sensibles a la luz. En este trabajo a partir de esta metodología, se puso a punto la determinación de  $NO_2^-$  y  $NO_3^-$  por FIA (25).

#### b) Formación del compuesto Azoico.

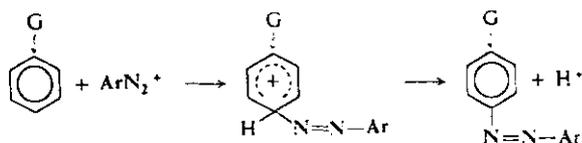
En condiciones apropiadas, las sales de diazonio pueden reaccionar con ciertos compuestos aromáticos para dar productos de fórmula general:  $Ar-N=N-Ar'$ , llamados **azocompuestos**. En esta reacción, conocida como **copulación**, se retiene el grupo diazonio en el producto, al contrario que en las reacciones de reemplazo, donde se pierde el nitrógeno.



En general, el anillo aromático ( $\text{Ar}'\text{H}$ ) que sufre el ataque del ion diazonio debe contener un grupo de fuerte tendencia a liberar electrones; normalmente estos son  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NR}_2$ ,  $-\text{NHR}$  o  $-\text{NH}_2$ .

Por lo común, la sustitución se realiza en la posición "Para" con respecto al grupo activante. La copulación con fenoles se hace en medio moderadamente alcalino, mientras que con aminas se hace en ambiente ligeramente ácido.

Tanto por activación mediante grupos que liberan electrones, como las pruebas aportadas por estudios cinéticos, indican que esta reacción de copulación es una sustitución electrofílica aromática, donde el ion diazonio es el reactivo atacante:



Es significativo que los compuestos aromáticos que sufren la copulación son los mismos que se nitrosan. El ion diazonio es, sin duda, muy débilmente electrofílico ( $\text{ArN}_2^+$ ), como lo es el ion nitrosonio,  $^+\text{NO}$ , de modo que sólo puede atacar anillos muy reactivos (24).

## CAPÍTULO II

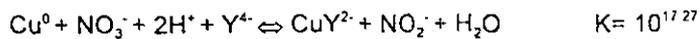
### DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 2.1 FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN

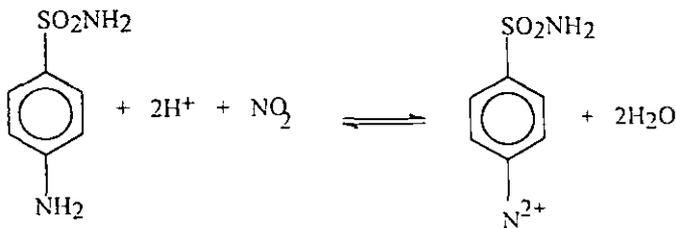
El nitrato se reduce cuantitativamente a nitrito por medio de una columna empacada con cadmio cuperizado. El nitrito formado reacciona con la sulfanilamida ( $C_6H_8N_2O_2S$  P.M.172.21) para formar la sal de diazonio, subsecuentemente reacciona con el Clorhidrato de N-1-Naftiletildiamina ( $C_{12}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$  P.M. 259.18) para formar el azo compuesto que se mide espectrofotométricamente a 540 nm. Para la determinación de nitritos se introduce la muestra a la configuración FIA sin pasar por la columna de cadmio cuperizado. Las reacciones se deben llevar a cabo a un pH mayor a 2.0.

#### REACCIONES:

##### REACCIÓN DE REDUCCIÓN DE NITRATOS ( $NO_3^-$ ):



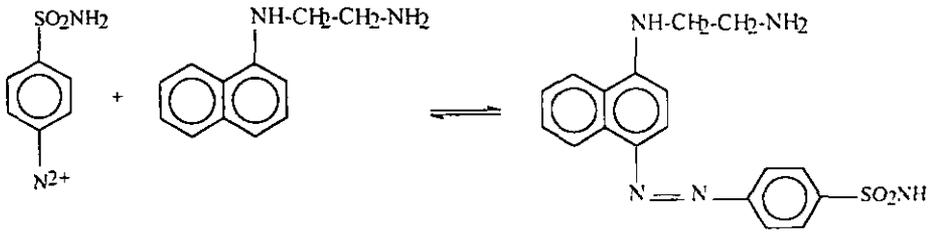
##### FORMACIÓN DE LA SAL DE DIAZONIO



Sulfanilamida

Sal de Diazonio

## FORMACIÓN DEL COMPUESTO AZOICO:



Clorhidato de  
N-1-naftiletilendiamina

Azo-Compuesto color violeta  
540 nm

## 2.2 METODOLOGÍA

### 2.2.1 REACTIVOS

Todos los reactivos usados en este trabajo, fueron grado analítico. A continuación se hace mención de las marcas de cada reactivo, como también el número de lote de cada uno de ellos:

- Cloruro de Amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Merck, No. de Lote: 311251. R.A. 99.8%.
- Ácido Etilendiaminotetracético (EDTA) ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ ). Técnica Química. No. de Lote:01127 A. 99.4-100.6%.
- Sulfanilamida ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ). Aldrich. No. de Lote: EZ 02114 CY. 99%.
- Clorhidrato de N-1-naftiletilendiamina (NED) ( $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\cdot 2\text{HCl}$ ). J.T. Baker. No. de Lote: E 44721. 98.2%.
- Ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Merck.
- Nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ). Sigma. No. de Lote: 84HO456. 64%.
- Nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ). J.T. Baker. No. de Lote: M-21344. 99.62%.
- Cadmio granulado. Fluka AG.
- Ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ). J.T. Baker. No. de lote:F31454.
- Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). J.T. Baker. No. de Lote: H16720. 99.8%.
- Hidróxido de Sodio ( $\text{NaOH}$ ). J.T. Baker. No. de Lote: 40254 98.0%.

#### 2.2.1.1 DISOLUCIÓN AMORTIGUADORA ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ /EDTA pH 8.5):

Se pesaron aproximadamente y con precisión 21.25 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en un vaso de precipitados de 250 mL, por separado se pesaron aproximadamente y con precisión 0.025 g de EDTA . Una vez pesados ambos reactivos, se mezclaron y disolvieron en aproximadamente 150 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 8.5 con NaOH. Se transfirió la disolución a un matraz volumétrico de 250 mL y se aforó con agua destilada. Se guardó el buffer en un frasco de plástico a temperatura ambiente, el reactivo dura en estas condiciones aproximadamente tres semanas.

### 2.2.1.2 REACTIVO PARA DESARROLLO DE COLOR:

Se pesó aproximadamente y con precisión 1.0 g de Sulfanilamida en un vaso de precipitados de 150 mL, por separado se pesó aproximadamente y con precisión 0.5 g de NED. Por otro lado en un matraz volumétrico de 250 mL, se adicionó aproximadamente 50 mL de agua destilada y después se adicionó cuidadosamente 25 mL de  $H_3PO_4$ . Una vez pesados los reactivos se mezclaron y se disolvieron perfectamente con la disolución de  $H_3PO_4$ . Se aforó con agua destilada. Se guardó el reactivo de color en un frasco ámbar a temperatura ambiente, el reactivo dura aproximadamente en estas condiciones dos semanas.

### 2.2.2 CUPERIZACIÓN DE LA COLUMNA

Para la cuperización de la columna se realizaron los siguientes pasos, según lo establecido en el American Society for Testing and Materials (ASTM, por sus siglas en inglés): (26)

1.- Se tamizaron algunos gránulos de cadmio en una malla 40-60  $\mu m$ , esto con la finalidad de homogeneizar el tamaño del gránulo utilizando los de la parte de arriba del tamiz, procurando que este tamaño quedara bien incorporado en el diámetro (0.3 mm) de la columna.

2.- Una vez que se seleccionaron los gránulos de la malla, se pesaron 10 g en un vaso de precipitados.

3.- Posteriormente los gránulos de cadmio se lavaron con ácido clorhídrico diluido (HCl 1:1), varias veces y finalmente con agua destilada se quitó el exceso de ácido, este procedimiento se realizó hasta que los gránulos se observaran de color gris plata.

4.- Se preparó la disolución cuperizante formada por sulfato de cobre ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), 0.008M, disuelto en una disolución de EDTA 0.1 M.

5.- La disolución cuperizante, se agregó a los gránulos de cadmio en varias porciones. Se mantuvo en agitación ligera hasta que desapareciera el color azul de la disolución de sulfato de cobre, una vez incolora la disolución se decantó y se adicionó otra porción de aproximadamente 20 mL. Esto con la finalidad de asegurar que queden los gránulos cuperizados, esto se repite varias veces, hasta que los gránulos de cadmio queden color café rojizo, lo cual nos indica que el Cadmio ha quedado bien cuperizado, para asegurar este color se utilizó un volumen aproximado de 250 mL de la disolución cuperizante.

6.- Una vez cuperizado el cadmio, se decantó la disolución cuperizante de los gránulos de cadmio y se lavaron varias veces con agua destilada para remover el precipitado de cobre que se formó.

7.- Los gránulos de cadmio cuperizado se guardaron en un buffer de EDTA/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  pH 8.5, en refrigeración hasta ser utilizados.

8.- El cadmio cuperizado se empacó en una columna de 0.3 mm de diámetro interno y una longitud de 10.0 cm, en los extremos de la columna se colocaron unos filtros de lana de vidrio, para evitar que se saliera el Cadmio, para posteriormente ser incorporado en el sistema FIA.

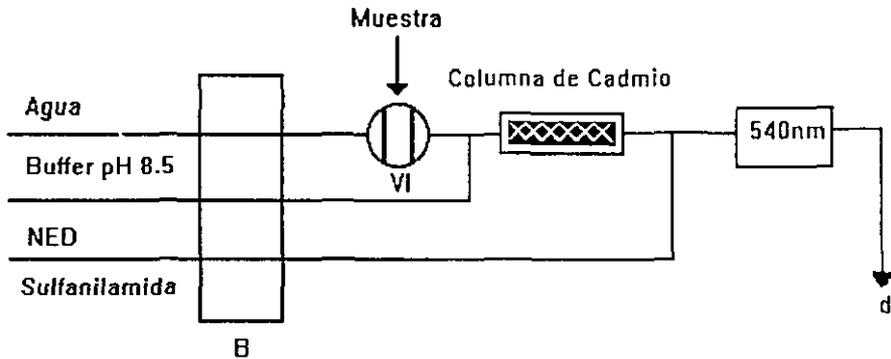
### 2.2.3 CONFIGURACIÓN

La configuración propuesta para la determinación de  $\text{N-NO}_2^-$  y  $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$  se muestra en la figura 2.2.3.1.

Se inyectan 100  $\mu\text{L}$  de muestra en un portador de agua destilada que posteriormente confluye con el buffer. Subsecuentemente reacciona con el reactivo de desarrollo de color donde se forma el compuesto azoico, para llegar al detector y ser medido espectrofotométricamente a 540 nm.

Cabe señalar que cuando se hace la determinación para  $\text{N-NO}_2^-$  no es necesario poner la columna de cadmio cuperizado, pero para el caso de la determinación de  $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$ , si es necesario colocarla porque de esta forma se obtiene la reducción de nitratos a nitritos. La configuración no cambia,

solo hay que poner o quitar la columna de cadmio cuperizado según la determinación que se vaya a realizar.



B: Bomba peristáltica

Buffer:  $\text{NH}_2\text{Cl}$  / EDTA pH 8.5

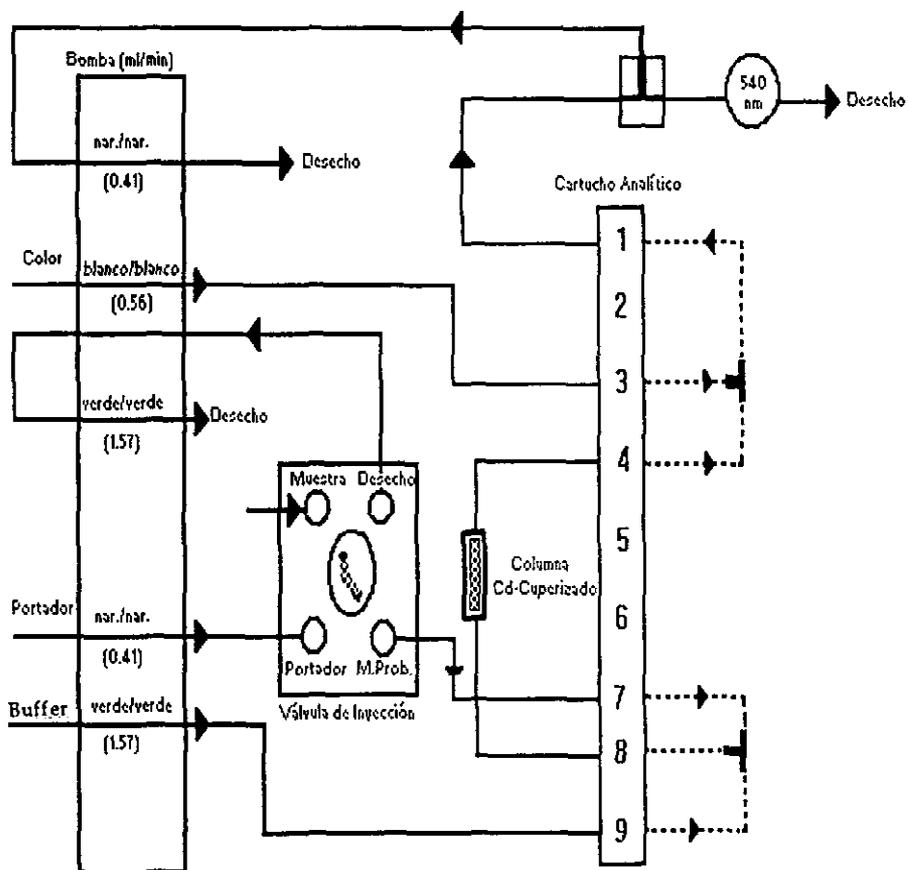
VI: Válvula de Inyección  
(100  $\mu\text{L}$ )

NED: Clorhidrato de N-1-naftiletilendiamina

d: desecho

Figura 2.2.3.1 Configuración FIA para la determinación de  $\text{N-NO}_2^-$  y  $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$ .

Basándonos en la configuración de la figura 2.2.3.1, se construye la configuración mostrada en la figura 2.2.3.2, para el equipo FIA automatizado.



NOTA: LOS COLORES QUE SE MENCIONAN CORRESPONDEN AL DIAMETRO INTERNO DE LOS TUBOS QUE SE UTILIZARON CON ESTA CONFIGURACION.

Figura 2.2.3.2 Diagrama de la configuración en el equipo automatizado FIA, para la determinación de nitratos y nitritos.

## 2.2.4 CONDICIONES ÓPTIMAS DE ANÁLISIS

CAUDAL: 0.41 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 100  $\mu$ L.

LONGITUD DE LA COLUMNA: 10 cm.

CONCENTRACIÓN DEL BUFFER:

Cloruro de Amonio: 1.58 M.

EDTA: 0.0003 M.

pH: 8.5

CONCENTRACIÓN DEL REACTIVO DE COLOR:

Sulfanilamida: 0.023 M.

NED: 0.008 M.

LONGITUD DE ONDA: 540 nm.

## 2.2.5 MUESTRAS Y ESTÁNDARES

### 2.2.5.1 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras a analizar, se recolectaron de varias delegaciones de la Ciudad de México, se muestreó en Colonia Tepepan y Barrio San Pedro, ambos de la Delegación Xochimilco; Colonia Pedregal de San Nicolás de la Delegación Tlalpan; Colonia Condesa de la Delegación Cuauhtémoc; Colonia San Angel de la Delegación Coyoacán; de la Planta de Tratamiento de Agua, de la UNAM. También se analizaron muestras recolectadas en diferentes puntos del río Texcaliacac ubicado en el Estado de México.

La recolección de las muestras se hizo en frascos de plástico de 100 mL cada uno, cada muestra se tomó por duplicado y se tomaron a partir del agua de Tinaco y del agua del Grifo. Para la toma de las muestras se dejó correr un poco de agua, después se enjuagó el envase con el agua que se va a muestrear y posteriormente se llenó el frasco teniendo cuidado que el frasco no se contaminara, estas muestras se guardaron en refrigeración, no más de 48 horas (27).

En cuanto al agua de la Planta de Tratamiento, las muestras se recolectaron en frascos de 500 mL, tanto el agua residual como el agua tratada, es decir tal y como llega el agua a la Planta y una vez que ha llevado a cabo todo el proceso de tratamiento hasta la cloración. Estas muestras antes de ser analizadas se filtraron varias veces por medio de filtración rápida, utilizando inicialmente papel filtro de poro grande, después un poro más cerrado, hasta llegar a una filtración con Millipore de 25  $\mu$ , ya que tenían mucha materia suspendida, principalmente el agua residual, estas muestras se guardaron también en refrigeración, no más de 48 horas.

En cuanto a las muestras del río Texcaliacac, estas se muestrearon de la desembocadura del río Texcaliacac y comienzo del río Lerma Santiago.

Se midió el pH de todas las muestras una vez listas para ser analizadas.

Se debe hacer notar que las muestras se analizaron, para el caso de nitritos, dentro de las primeras 24 horas, ya que los nitritos no son estables más de este tiempo. Con lo referente a los nitratos, estos pueden analizarse hasta 48 horas después de la toma de la muestra (28).

### **2.2.5.2 ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> Y N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> NITRITOS:**

Partiendo de una disolución Madre de 1000.0 ppm de nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>), (se pesaron aproximadamente y con precisión 0.4930 g de NaNO<sub>2</sub> y se aforó en un matraz volumétrico a 100 mL con agua destilada), de esta disolución se tomó 1.0 mL y se aforó en un matraz volumétrico a 100 mL con agua destilada, para tener una concentración de la disolución Madre de 10.0 ppm de NaNO<sub>2</sub> de la cual se hicieron los estándares correspondientes para la curva de calibración.

Para la determinación de  $\text{N-NO}_2^-$  se preparó la curva de calibración, utilizando estándares de concentraciones de 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 y 10.0 ppm, usando material volumétrico calibrado.

### **NITRATOS:**

A partir de una solución Madre de 1000.0 ppm de nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) (se pesaron aproximadamente y con precisión 0.6070 g de  $\text{NaNO}_3$  y aforando en un matraz volumétrico a 100.0 mL con agua destilada), de aquí se tomó 1.0 mL con pipeta volumétrica y se aforó en un matraz volumétrico a 100.0 mL con agua destilada, para tener una concentración final de 10.0 ppm de  $\text{NaNO}_3$ , a partir de ésta se prepararon los estándares de la curva de calibración.

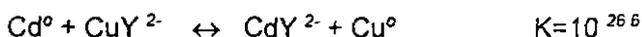
Los estándares de la curva de calibración para el caso de  $\text{N-NO}_3^-$ , fueron de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 y 10.0 ppm, usando material volumétrico calibrado.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 OPTIMIZACIÓN DE LA COLUMNA DE CADMIO CUPERIZADO

##### REACCIÓN DE CUPERIZACIÓN:



##### 3.1.1 Optimización de la columna de Cadmio cuperizado:

La columna se empacó de acuerdo a las especificaciones del manual del equipo automatizado. En esta metodología, se enunciaba el siguiente procedimiento:

- 1) Pesar aproximadamente 10 g de gránulos de cadmio.
- 2) Lavar los gránulos de cadmio mediante agitación con ácido clorhídrico 0.5 N, varias veces.
- 3) Enjuagar los gránulos con agua destilada, varias veces.
- 4) Una vez limpios los gránulos agitar en una disolución de sulfato de cobre al 2%, con dos porciones de 50 mL cada una. Agitar hasta que la disolución de cobre azul se decolore, decantar y repetir con la siguiente porción.
- 5) Lavar el cadmio cuperizado con mucho cuidado, evitando agitarlo fuertemente, con agua destilada para remover todo el precipitado de cobre que pudo haber quedado.
- 6) Colocar los gránulos de cadmio cuperizado en un buffer de  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$  pH 8.5.

La columna de cadmio cuperizado tiene una duración de aproximadamente siete meses, ya que se pudo observar que al cabo de este tiempo la reducción de  $\text{N-NO}_3^-$  a  $\text{N-NO}_2^-$  ya no es tan eficiente.

Esto se puede apreciar en los fiagramas, pues empieza a haber cambios como son: el ancho de los picos es más grande, la dispersión aumenta, el coeficiente de correlación disminuye y por lo tanto la linealidad de la curva de calibración se va perdiendo.

### **3.1.2 Condiciones iniciales:**

Cabe mencionar que se tuvieron que cambiar las condiciones iniciales para la cuperización del cadmio, descritos en el manual del Equipo *Automatizado*.

Cuando se trató de cuperizar por primera vez el cadmio, nos dimos cuenta que realmente no se estaba cuperizando, ocasionando la formación de cobre metálico lo cual era visible por la presencia de un polvo café.

Inicialmente la disolución de sulfato de cobre se preparaba con agua destilada únicamente, ocasionando la formación de cobre metálico el cual no recubría los gránulos de cadmio.

Para evitar esto, lo que se hizo fue preparar la disolución de sulfato de cobre con una disolución de EDTA 0.1 M (según lo establecido en la ASTM) (26), en lugar de prepararla con agua destilada, esto es con la finalidad de complejar al cobre y así evitar que este ión metálico precipite.

El aspecto final de los gránulos ya cuperizados es de color café-rojizo, los cuales se guardan en buffer de  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EDTA}$  pH 8.5.

### **3.1.3 Determinación de la eficiencia de la columna:**

Para determinar la eficiencia de la columna se hizo pasar un estándar de  $\text{N-NO}_2^-$  de 1.0 ppm, por la configuración que contiene la columna de cadmio cuperizado, para que la muestra sufra la misma dispersión que cuando se determine  $\text{N-NO}_3^-$  con la misma concentración, el fiagrama 3.1.3.1 nos muestra

cómo se registra la señal cuando el estándar de  $\text{N-NO}_2^-$  no pasa por la columna.

La eficiencia se calcula con la siguiente fórmula:

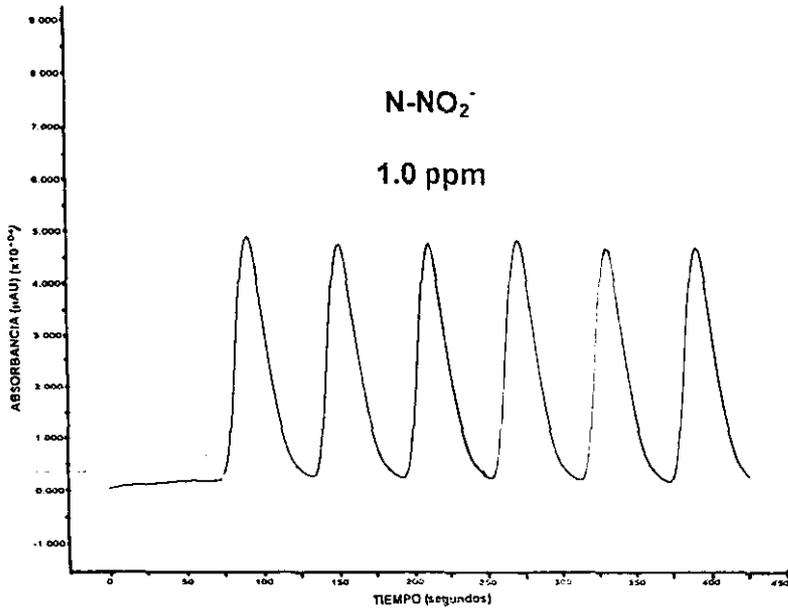
$$\frac{h_{\text{N-NO}_3^-}}{h_{\text{N-NO}_2^-}} \times 100$$

La eficiencia de la columna una vez que se volvió a cuperizar, fue de 98.9%. Lo cual se registró en el fiagrama 3.1.3.2.

En el fiagrama No.3.1.3.3 se muestra la reducción de  $\text{N-NO}_3^-$  a  $\text{N-NO}_2^-$  cuando se probó una columna que tenía 7 meses en uso continuo.

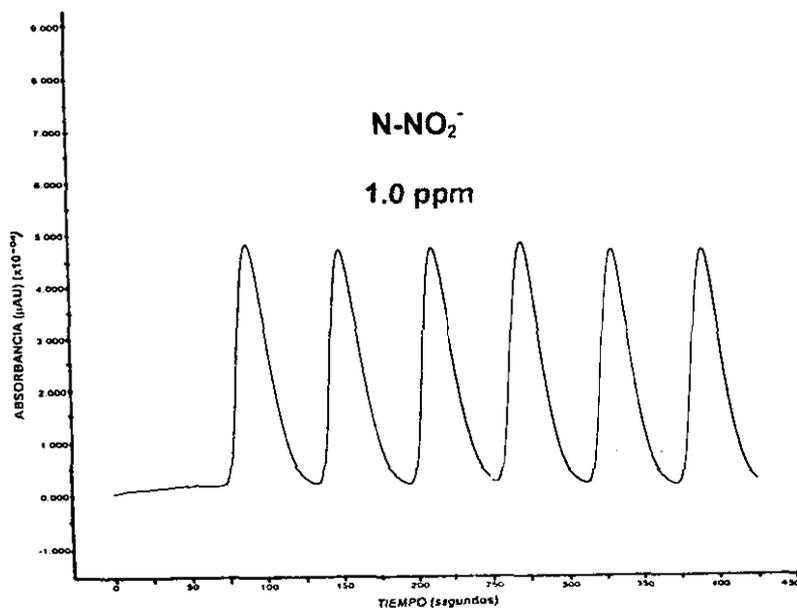
En este fiagrama se observa la variabilidad en la altura de los picos, que se esperaba fueran parecidos, pues para  $\text{N-NO}_3^-$  y  $\text{N-NO}_2^-$  se utilizó la misma concentración la cual fue de 1.0 ppm, por esta razón se tomó la decisión de volver a cuperizar el cadmio. Pues se pudo comprobar que la eficiencia no era buena.

Haciendo una comparación entre los fiagramas 3.1.3.1 y el 3.1.3.2 se puede decir que existe mucha semejanza entre ellos que finalmente era lo que esperabamos ya que si en el estándar sólo hay nitritos entonces al hacerlos pasar por la columna debemos obtener la misma absorbancia pues estos no están sufriendo ninguna reducción. Los picos de ambos fiagramas nos muestran que tienen una absorbancia de  $4.8 \times 10^4 \mu\text{AU}$ ; ya sea cuando el estándar pasa o no por la columna de cadmio cuperizado, y esto nos indica que vamos a tener una buena reducción cuando deseemos conocer la cantidad de nitratos.



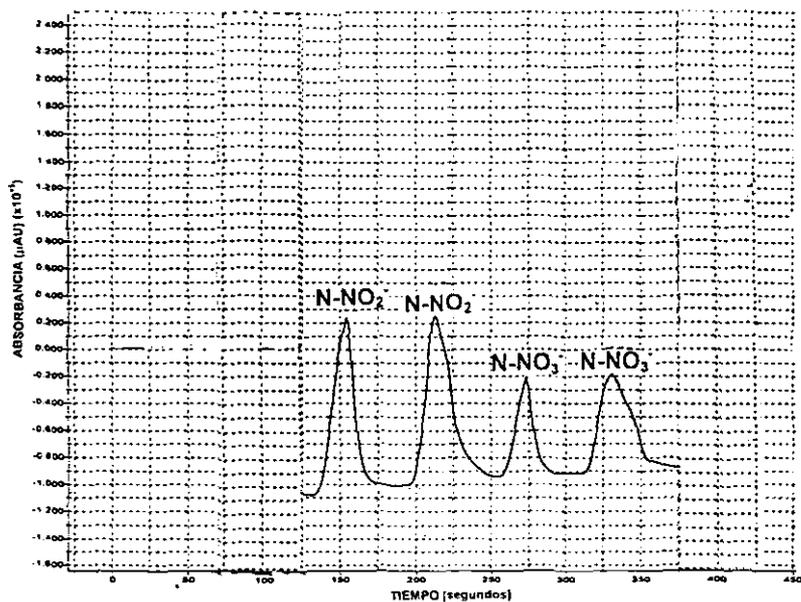
NOTA: Como se puede observar en este fiagrama la altura de los picos tienen una absorbancia de  $4.8 \times 10^{-4}$  µAU, para un estándar de 1.0 ppm de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> sin pasar por la columna.

FIAGRAMA 3.1.3.1 Estándar de 1.0 ppm de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> sin pasar por la columna.



NOTA: Como se puede observar en este diagrama la altura de los picos tienen una absorbancia de  $4.8 \times 10^4$  μAU, para un estándar de 1.0 ppm de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> cuando pasa por la columna

**FIGRAMA 3.1.3.2** Eficiencia de la columna una vez que se volvió a  
cuperizar el cadmio (98.9%).



NOTA: El papel de este diagrama es diferente a los demás debido a que es el único que nos demuestra esta variabilidad en la reducción de  $\text{N-NO}_3^-$  a  $\text{N-NO}_2^-$ .

**FIGRAMA 3.1.3.3 Reducción de  $\text{N-NO}_3^-$  a  $\text{N-NO}_2^-$  cuando se probó una columna que tenía 7 meses en uso continuo. (Eficiencia 70.5%)**

### 3.1.4 Comprobación de la reducción de $\text{N-NO}_3^-$ a $\text{N-NO}_2^-$ en el intervalo lineal de 0.1 a 10.0 ppm

Se prepararon mezclas de diferentes proporciones de  $\text{N-NO}_3^-$  y  $\text{N-NO}_2^-$ , para llegar a una concentración final de 1.0 ppm y otra para tener una concentración final de 5.0 ppm. Se realizaron por triplicado. Esto con la finalidad de comprobar que la columna de cadmio cuperizado efectivamente tiene la misma eficiencia a lo largo de todo el intervalo lineal de medición.

Las proporciones utilizadas fueron las siguientes:

Para el caso de 1.0 ppm:

$\text{N-NO}_3^-$ (ppm)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
$\text{N-NO}_2^-$ (ppm)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
$\text{N-NO}_3^-$ + $\text{N-NO}_2^-$ (ppm)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Los resultados que se obtuvieron para estas primeras mezclas de  $\text{N-NO}_3^-$  y  $\text{N-NO}_2^-$ , se muestran en la tabla 3.1.4.1., en esta tabla se enlistan las concentraciones obtenidas dentro del intervalo lineal, de 0.1 ppm a 3.0 ppm, como también el intervalo de confianza para cada uno de los puntos.

CONCENTRACIÓN DE N-NO <sub>3</sub> + N-NO <sub>2</sub> (ppm)			INTERVALO DE CONFIANZA		
CONC.	PROMEDIO	s	s <sub>m</sub>	INTERVALO DE CONFIANZA	
0.9109, 0.9122, 0.9194	0.9194	4.578X10 <sup>-3</sup>	2.643X10 <sup>-3</sup>	0.9194±0.007	
0.8866, 0.8917, 0.9096	0.8960	0.0121	6.986X10 <sup>-3</sup>	0.8960±0.019	
0.9663, 0.9659, 0.9639	0.9654	1.286X10 <sup>-3</sup>	7.425X10 <sup>-4</sup>	0.9654±0.002	
0.9151, 0.8983, 0.9166	0.9166	0.0101	5.831X10 <sup>-3</sup>	0.9166±0.015	
0.9292, 0.9102, 0.9267	0.9220	0.0103	5.947X10 <sup>-3</sup>	0.9220±0.016	
0.9160, 0.8975, 0.9040	0.9058	9.385X10 <sup>-3</sup>	5.418X10 <sup>-3</sup>	0.9058±0.014	
0.9291, 0.9186, 0.9345	0.9274	8.085X10 <sup>-3</sup>	4.668X10 <sup>-3</sup>	0.9274±0.012	
0.9036, 0.9022, 0.9055	0.9038	1.656X10 <sup>-3</sup>	9.561X10 <sup>-3</sup>	0.9038±0.004	
0.9011, 0.9196, 0.9080	0.9096	9.349X10 <sup>-3</sup>	5.398X10 <sup>-3</sup>	0.9096±0.025	

ERROR RELATIVO = 1.82%

Datos de la regresión lineal:

$$Y = A + B * X$$

$$b = 1297.28$$

$$m = 107734.52$$

$$r = 0.9999$$

INTERVALO DE CONFIANZA:

$$s_m = s / \sqrt{n}$$

$$X \pm s_m t$$

Donde: s = desviación estándar

n = número de muestras

X = promedio de las muestras

t = t de student al 95%

s<sub>m</sub> = desviación estándar de la muestra

Tabla 3.1.4.1 Concentración a partir de interpolar la altura de los picos en la curva de calibración de 0.1 ppm hasta 3.0 ppm.

Para el caso de 5.0 ppm:

<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> <b>(ppm)</b>	4.0	3.0	2.0	1.0	4.9	4.8	0.2	4.5	0.5
<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> <b>(ppm)</b>	1.0	2.0	3.0	4.0	0.1	4.9	4.8	0.5	4.5
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> <b>+ N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> <b>(ppm)</b>	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

Los resultados que se obtuvieron para las mezclas de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, se muestran en la tabla 3.1.4.2, en esta tabla se enlistan las concentraciones obtenidas dentro del intervalo lineal, de 0.1 ppm a 7.0 ppm, como también el intervalo de confianza para cada uno de los puntos.

CONCENTRACIÓN DE N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (ppm)			INTERVALO DE CONFIANZA	
CONC.	PROMEDIO	s	s <sub>m</sub>	INTERVALO DE CONFIANZA
5.2662, 5.1754, 5.1564	5.1993	0.0587	0.0339	5.1993±0.100
5.1988, 5.2556, 5.1548	5.2031	0.0505	0.0291	5.2031±0.086
5.0999, 5.1689, 5.1547	5.1412	0.0364	0.0210	5.1412±0.062
5.1301, 5.3048, 5.2213	5.2187	0.0874	0.0505	5.2187±0.149
5.2269, 5.1588, 5.2424	5.2094	0.0445	0.0257	5.2094±0.076
5.1699, 5.2285, 5.2425	5.2136	0.0385	0.0222	5.2136±0.066
5.4641, 5.4069, 5.4725	5.4478	0.0357	0.0206	5.4478±0.061
5.2066, 5.1536, 5.2771	5.2124	0.0620	0.0358	5.2124±0.106
5.3946, 5.4429, 5.3492	5.3956	0.0468	0.0270	5.3956±0.080
5.2042, 5.1801, 5.1398	5.1747	0.0325	0.0188	5.1747±0.056

ERROR RELATIVO = 1.76%

**Datos de la regresión lineal:**

$$Y = A + B * X$$

$$b = 2987.75$$

$$m = 105153.19$$

$$r = 0.9999$$

**INTERVALO DE CONFIANZA:**

$$s_m = s / \sqrt{n}$$

$$X \pm s_m t$$

Donde: s = desviación estándar

n = número de muestras

X = promedio de las muestras

t = t de student al 95%

s<sub>m</sub> = desviación estándar de la muestra

**Tabla 3.1.4.2 Concentración a partir de interpolar la altura de los picos en la curva de calibración de 0.1 ppm hasta 7.0 ppm.**

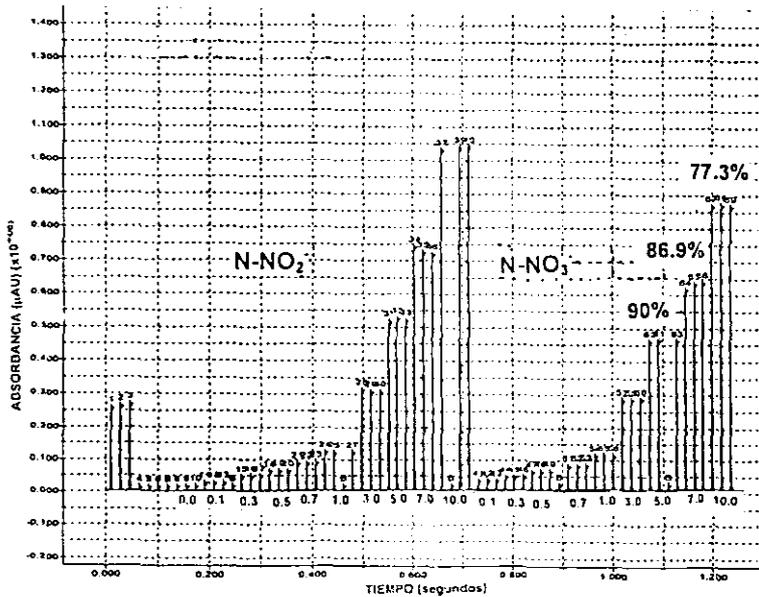
En estos resultados se puede observar que los intervalos de confianza obtenidos para un caso y para otro fueron buenos, los resultados son confiables, y se encuentran dentro de los valores estimados que son 1.0 ppm y 5.00 ppm.

El error relativo para el caso de las mezclas de 1.0 ppm fue de 1.82%, y para el caso de las mezclas de 5.0 ppm fue de 1.76%. De acuerdo al error relativo encontrado para cada determinación se puede observar que la de 1.0 ppm es mayor a la concentración de 5.0 ppm, lo cual indica que a concentraciones mayores la reducción en la columna de cadmio cuperizado es menos reproducible.

Para hacer una prueba más sobre la eficiencia de reducción de la columna se hizo una curva patrón de  $N-NO_2^-$ , con concentraciones de 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 y 10.0 ppm; y otra con concentraciones de 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 y 10.0 ppm de  $N-NO_3^-$ , esto con la finalidad de observar la reducción de éstos. A continuación se muestra la tabla de estos resultados, al igual que el diagrama 3.1.4.3.

CONCENTRACION ESPERADA (ppm)	CONCENTRACION REAL (ppm)	
	$N-NO_2^-$	$N-NO_3^-$
0.1	0.099	0.098
0.3	0.299	0.276
0.5	0.499	0.483
0.7	0.697	0.682
1.0	0.998	0.987
3.0	2.994	2.885
5.0	4.990	4.864
7.0	6.986	6.687
10.0	9.980	9.726

\* EN ESTA CONCENTRACIÓN SE OBSERVA UNA REDUCCIÓN DE LA COLUMNA DE 77.3%, POR LO QUE LA EFICIENCIA DE LA MISMA SE VE DISMINUIDA A ALTAS CONCENTRACIONES



B: es la línea base, esta nos indica que cada 11 inyecciones que haga el equipo automatizado, nos verificará la línea base.

NOTA: En este fiagrama se observa que teniendo una concentración de 10.0 ppm, la reducción de la columna es de 77.3%, como se muestra en el fiagrama.

### FIAGRAMA 3.1.4.3. Eficiencia de reducción

En este caso se observa que los valores obtenidos de los nitratos es muy similar a la obtenida de los nitritos, en las concentraciones que van de 0.1-7.0 ppm, ya que en estos casos existe más semejanza en la altura de los picos. En el caso de 10.0 ppm se tiene un 77.3% de reducción de la columna debido a que es menos eficiente a concentraciones altas, en el caso de 5.0 ppm y 7.0 ppm se tiene un 90% de reducción pero este valor es todavía más aceptable que el correspondiente a 10.0 ppm, esto se puede observar de acuerdo a los resultados que se muestran en el fiagrama 3.1.4.3.

Una vez que se comprobó que la eficiencia de la columna fue buena se procedió a hacer las determinaciones de  $\text{N-NO}_2^-$  y  $\text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^-$ , para la validación de los métodos y su cuantificación en diferentes muestras.

## 3.2 DETERMINACIÓN DE N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

### 3.2.1 Condiciones iniciales:

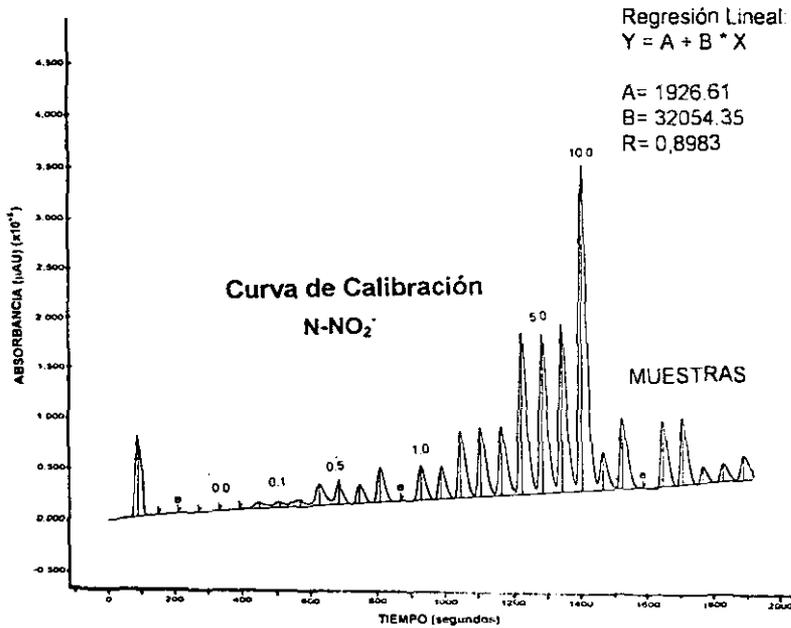
A partir de una disolución Madre de 10.0 ppm de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> se prepararon una serie de disoluciones estándar cuyo intervalo de concentración se encontraba entre 0.1 y 10.0 ppm (0.10, 0.50, 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 ppm) de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y se inyectaron por triplicado.

Cuando se hizo esta primer prueba, observamos que la línea base no permanecía constante (Figrama 3.2.1-a) y que esto era debido a que el flujo tampoco era constante. Como se puede observar en el Figrama 3.2.1-a, los picos eran muy anchos, lo cual era debido también a lo mismo y a que la dispersión al no tener el flujo adecuado aumentaba, por lo que se tuvo que ajustar la presión en los tubos de la bomba.

Una vez que se tuvo controlado el flujo, se añadieron más puntos a la curva de calibración, quedando 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 y 10.0 ppm; esto se hizo con la finalidad de asegurar una mejor linealidad en todo el intervalo. En este caso se tenían valores del coeficiente de correlación de 0.9999, y la ecuación de la recta fue  $Y = A + B * X$ . El Figrama 3.2.1-b, nos demuestra cómo se modificó el figrama una vez que se pudo optimizar las condiciones del sistema FIA.

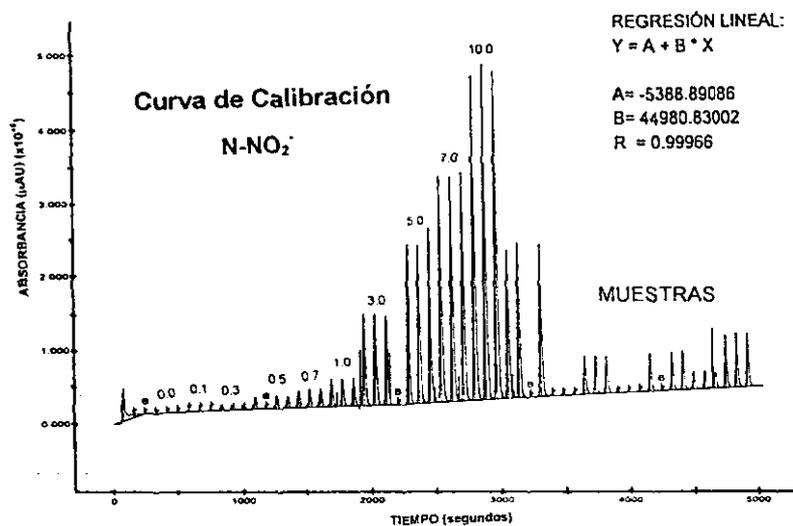
En lo que si se tuvo especial cuidado fue en la duración del reactivo de color, ya que este se descompone a la tercer semana de su preparación, por lo que se recomienda que se prepare cada vez que se va a hacer la determinación y solo la cantidad necesaria.

En este primer caso no hubo necesidad de cambiar otras condiciones, como son temperatura, volumen de inyección, reactores, etc.; las condiciones en este caso fueron las mismas, y son las que se enlistan en la tabla 3.2.2.1., las cuales son las condiciones óptimas para la determinación de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.



B: es la línea base, esta nos indica que cada 11 inyecciones que haga el equipo automatizado, nos verificará la línea base.

Figurama 3.2.1-a Determinación de  $N-NO_2^-$  antes de la optimización del sistema FIA.



B: es la línea base, esta nos indica que cada 11 inyecciones que haga el equipo automatizado, nos verificará la línea base.

Figurama 3.2.1-b Determinación de N-NO<sub>2</sub> después de la optimización del sistema FIA.

### 3.2.2 Condiciones óptimas:

Las condiciones óptimas para realizar la determinación de N-NO<sub>2</sub> se muestran en la tabla 3.2.2.1.

**Tabla 3.2.2.1. Condiciones óptimas para la determinación de N-NO<sub>2</sub> .**

PARÁMETRO	CONDICIÓN
Flujo del portador (agua destilada)	0.41 mL/min
Flujo del Buffer (EDTA/NH <sub>4</sub> Cl pH 8.5)	1.56 mL/min
Flujo del Reactivo de color (NED-Sulfanilamida)	0.56 mL/min
Volumen de Inyección	100 µL
Temperatura	ambiente
Longitud de onda	540 nm
Intervalo de la curva de calibración	0.1-10.0 ppm

Las concentraciones del buffer y del reactivo de color se encuentran especificadas en la metodología.

### 3.3 DETERMINACIÓN DE N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

#### 3.3.1 Condiciones iniciales:

A partir de una disolución Madre de 10.0 ppm de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y de otra disolución Madre de 10.0 ppm de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> se prepararon una serie de disoluciones estándar cuyo intervalo de concentración se encontraba entre 0.1 y 10.0 ppm y se inyectaron por triplicado dentro del sistema FIA.

Al principio se empezaron a utilizar concentraciones de estándares para la curva de calibración como se indica en la siguiente tabla:

N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ppm)	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (ppm)	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ppm)
0.05	0.05	0.10
0.15	0.15	0.30
0.25	0.25	0.50
0.35	0.35	0.70
0.50	0.50	1.00
1.50	1.50	3.00
2.50	2.50	5.00
3.50	3.50	7.00
5.00	5.00	10.00

En esta primer prueba pudimos observar que el flujo no era constante ya que los picos no eran reproducibles, además de que la dispersión también se veía afectada. También pudo ser debido a que la columna de cadmio cuperizado estaba recién empacada. Esto lo podemos observar en el Diagrama 3.3.1-a.

Después se añadieron más puntos a la curva de calibración, para verificar linealidad en todo el intervalo, quedando como se muestra en la siguiente tabla.

N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ppm)	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (ppm)	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ppm)
0.10	0.10	0.20
0.20	0.20	0.40
0.30	0.30	0.60
0.40	0.40	0.80
0.50	0.50	1.00
0.60	0.60	1.20
1.00	1.00	2.00
1.50	1.50	3.00
2.50	2.50	5.00
3.50	3.50	7.00
5.00	5.00	10.00

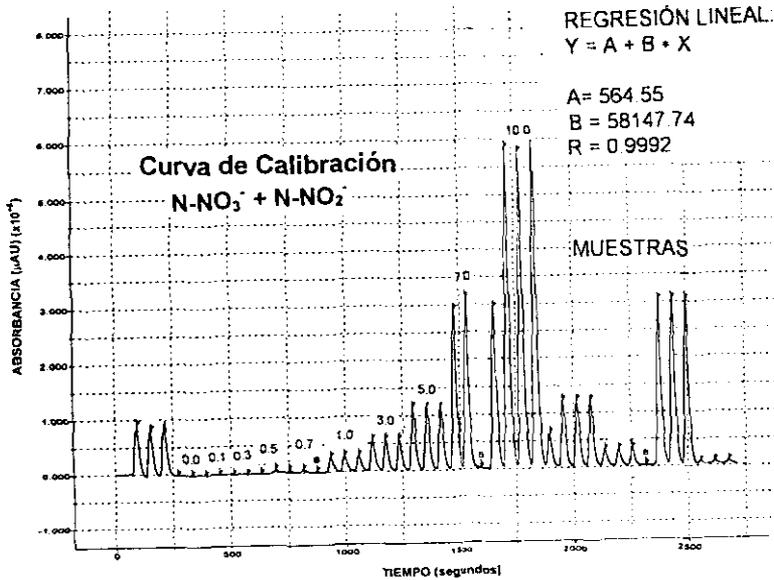
Por lo que respecta a esta determinación, se debe tener cuidado con la eficiencia de la columna, que como ya se dijo, su duración es de aproximadamente siete meses. En el siguiente punto se mencionan cuáles fueron los parámetros que se optimizaron para este análisis.

El Diagrama 3.3.1-b nos muestra como se observa este una vez optimizadas las condiciones de análisis.

Las condiciones óptimas para la determinación de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se enlistan en la tabla 3.3.2.1.

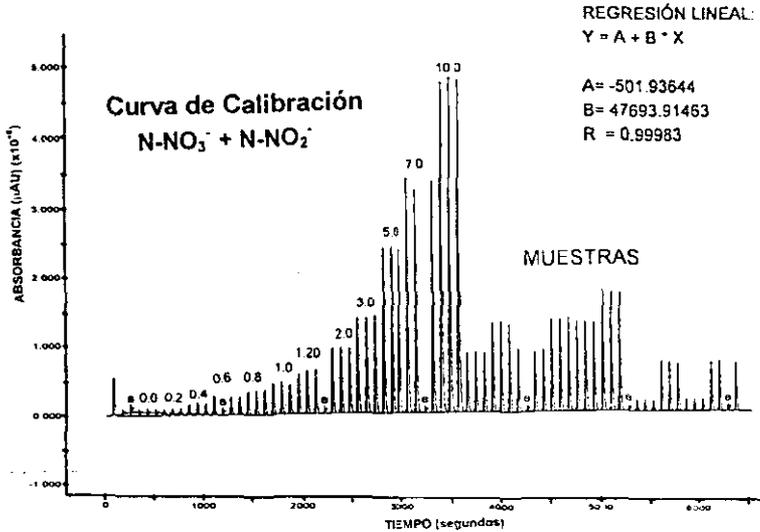
En ellas podemos observar que el flujo del sistema no se cambió, se dejó el mismo que ya se especificó en la metodología (0.41 mL/min). Tampoco se cambió el volumen de inyección (100 µL).

Se tuvo que tener cuidado, como ya se mencionó anteriormente, en la duración del reactivo de color.



B: es la línea base, esta nos indica que cada 11 inyecciones que haga el equipo automatizado, nos verificará la línea base.

Figrama 3.3.1-a Determinación de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> antes de la optimización del sistema FIA.



B: es la línea base, esta nos indica que cada 11 inyecciones que haga el equipo automatizado, nos verificará la línea base.

Figurama 3.3.1-b Determinación de  $N-NO_3^-$  después de la optimización del sistema FIA.

### 3.3.2 Condiciones óptimas:

Las condiciones óptimas que se tuvieron para realizar esta determinación fueron las que se muestran en la tabla 3.3.2.1.

**Tabla 3.3.2.1. Condiciones óptimas para la determinación de  $N-NO_3^-$  .**

PARÁMETRO	CONDICIÓN
Flujo del portador (agua destilada)	0.41 mL/min
Flujo del Buffer (EDTA/ $NH_4Cl$ pH 8.5)	1.56 mL/min
Flujo del Reactivo de color (NED-Sulfanilamida)	0.56 mL/min
Volumen de Inyección	100 $\mu$ L
Columna	Cd cuperizado
Longitud de la columna	3 mm
Temperatura	ambiente
Longitud de onda	540 nm
Intervalo de la curva de calibración ( $N-NO_3^- + N-NO_2^-$ )	0.2-10.0 ppm

Las concentraciones del buffer y del reactivo de color se encuentran especificadas en la metodología. Con estas condiciones fueron con las que se analizaron todas las muestras a lo largo de este trabajo experimental.

### 3.4 REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

La precisión es el grado en que concuerdan las diferentes mediciones de una misma propiedad. La precisión puede calcularse tanto para el sistema como para el método. La precisión del método puede expresarse como la reproducibilidad y la repetibilidad. La repetibilidad es la concordancia entre determinaciones independientes de soluciones con una concentración cercana al 100% provenientes de una disolución Madre. Los ensayos son realizados por un mismo analista y en las mismas condiciones de operación. La diferencia con la reproducibilidad es que los análisis los pueden realizar diferentes analistas en diferentes equipos y/o en diferentes laboratorios (26).

La repetibilidad es afectada por errores aleatorios, estos errores aleatorios provocan que los resultados individuales caigan a ambos lados del valor medio. Los errores aleatorios no se detectan fácilmente con sólo observar los resultados, sino que también tienen orígenes muy distintos en cuanto a la técnica experimental y al equipo que se utiliza (29).

Para medir la repetibilidad del método en este trabajo, se hizo una curva patrón, cada uno de los puntos se determinó por triplicado, para cada una de las determinaciones. Se hicieron inicialmente 16 inyecciones de una disolución que contenía 5.00 ppm de  $N-NO_2^-$ , de estos valores se calculó la media y la desviación estándar. La precisión del método se representó como la desviación estándar relativa (D.E.R.). Y de igual forma se hizo para determinar  $N-NO_3^-$ . A continuación se muestran los resultados que se obtuvieron para cada una de las determinaciones.

### 3.4.1 DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA (D.E.R.) PARA N-NO<sub>2</sub>

Como ya se mencionó anteriormente, para conocer la repetibilidad expresada como D.E.R., del método lo que se hizo fue preparar la curva de calibración con las condiciones óptimas y después se inyectó 16 veces una disolución de 5.00 ppm de N-NO<sub>2</sub>. Una vez que se obtuvieron los resultados del fiagrama, se calculó la D.E.R.

La D.E.R. se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$DER = ( S / X ) \times 100$$

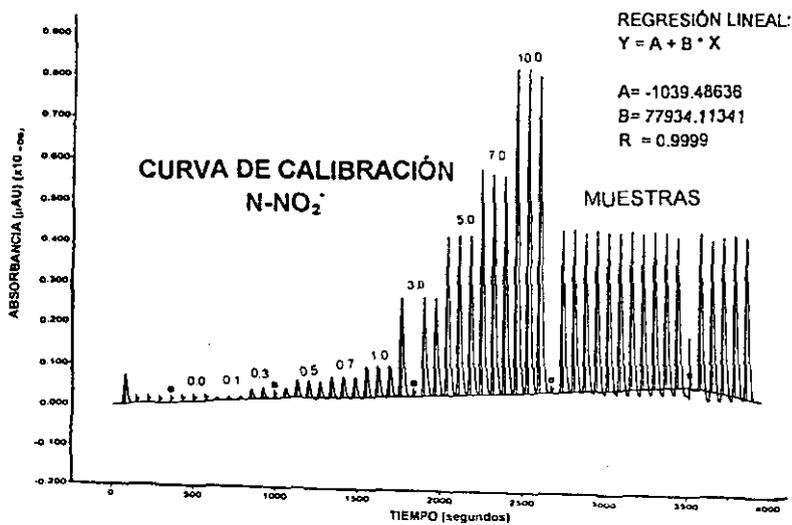
**donde:** S = desviación estándar de la muestra  
X = promedio de la muestra

En la tabla 3.4.1.1 se muestran los resultados obtenidos para N-NO<sub>2</sub>; y así mismo se muestra el valor obtenido para la D.E.R., como también el fiagrama correspondiente.

TABLA 3.4.1.1 Resultados obtenidos para calcular la D.E.R. para N-NO<sub>2</sub>:

NÚMERO DE INYECCIÓN	CONCENTRACIÓN REAL
1	5.0809
2	5.0571
3	4.9277
4	5.0696
5	4.9771
6	4.9577
7	4.9478
8	4.8659
9	4.9283
10	4.8759
11	4.6966
12	4.8744
13	4.6916
14	4.9024
15	5.0169
16	5.0321
PROMEDIO	4.9314
DESV. ESTÁNDAR	0.1160

Una vez obtenidos estos resultados, se tuvo una D.E.R.= 2.35% para N-NO<sub>2</sub>:



B: es la línea base, esta nos indica que cada 11 inyecciones que haga el equipo automatizado, nos verificará la línea base.

FIAGRAMA OBTENIDO PARA DETERMINAR LA "D.E.R." DE N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

### 3.4.2 DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA (D.E.R.) PARA N-NO<sub>2</sub> + N-NO<sub>3</sub>

Al igual que para el caso de nitritos, para conocer la repetibilidad expresada como D.E.R., del método lo que se hizo fue preparar la curva de calibración con las condiciones óptimas y después se inyectó 16 veces una disolución de 5.00 ppm de N-NO<sub>2</sub> + N-NO<sub>3</sub>. Una vez que se obtuvieron los resultados del diagrama, se calculó la D.E.R.

La D.E.R. se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$DER = ( S / X ) \times 100$$

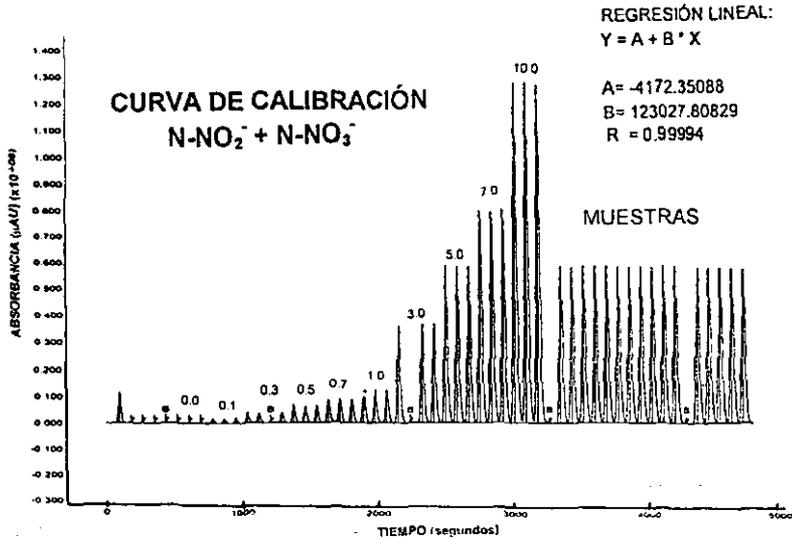
**donde:** S = desviación estándar de la muestra  
X = promedio de la muestra

En la tabla 3.4.2.1 se muestran los resultados obtenidos para N-NO<sub>3</sub> + N-NO<sub>2</sub> y así mismo se muestra el valor obtenido para la D.E.R. , como también el diagrama correspondiente.

**TABLA 3.4.2.1 Resultados obtenidos para calcular la D.E.R. para  
N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**

<b>NÚMERO DE INYECCIÓN</b>	<b>CONCENTRACIÓN REAL</b>
1	4.7917
2	4.7810
3	4.7915
4	4.7941
5	4.7431
6	4.7644
7	4.6719
8	4.7101
9	4.7483
10	4.7003
11	4.7703
12	4.7374
13	4.7094
14	4.7133
15	4.7499
16	4.6514
<b>PROMEDIO</b>	4.7393
<b>DESV. ESTÁNDAR</b>	0.0434

Una vez obtenidos estos resultados, se tuvo una D.E.R.= 0.91% para  
N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> .



B: es la línea base, esta nos indica que cada 11 inyecciones que haga el equipo automatizado, nos verificará la línea base.

FIGRAMA OBTENIDO PARA DETERMINAR LA "D.E.R." DE N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> +  
N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

### 3.5 CARTAS CONTROL

El control de calidad de un laboratorio es el conjunto de medidas de aseguramiento de la calidad que intenta garantizar la obtención y mantenimiento de resultados de alta calidad. Los sistemas de aseguramiento de la calidad difieren entre los laboratorios, pero todos deberían abarcar entrenamiento, documentación, procedimientos de control interno y externo.

Una carta control es un gráfico preparado para cada muestra control, en ella se muestra la concentración en el eje de la Y, contra el tiempo o número de ensayo en el eje X. La línea horizontal media forma parte del eje Y justo en la concentración promedio ( $n=20$ ) y paralela a ella se colocan los límites de control superior e inferior, los cuales se calculan en base a la desviación estándar. Este procedimiento fue inicialmente introducido por W. Shewart en 1931 e introducido a la química por S. Levey and E.R. Jennings en 1950.

CRITERIOS DE DECISIÓN: según J. Westgard, (Figura 3.5.1):

- a)  $1_{2s}$ , representa la regla de control en donde un control excede el límite de control =  $X \pm 2s$ . "Advertencia, aviso".
- b)  $1_{3s}$ , simboliza la regla de control en la que rechaza el análisis porque un control excede el límite  $X \pm 3s$ .
- c)  $2_{2s}$ , es la regla de control que rechaza la corrida cuando dos controles consecutivos exceden el mismo límite, ya sea  $X + 2s$ , ó  $X - 2s$ .
- d)  $R_{4s}$ , bajo esta regla de control el ensayo se rechaza cuando la diferencia entre los dos controles utilizados excede  $4s$ .
- e)  $4_{1s}$ , esta regla indica que la corrida se rechaza cuando los controles exceden 4 veces consecutivas el mismo límite ya sea  $X + 1s$ , ó  $X - 1s$ .
- f)  $10_x$ , es la regla control que rechaza el ensayo cuando 10 observaciones control consecutivos caen hacia el mismo lado del promedio ( $\bar{x}$ ).

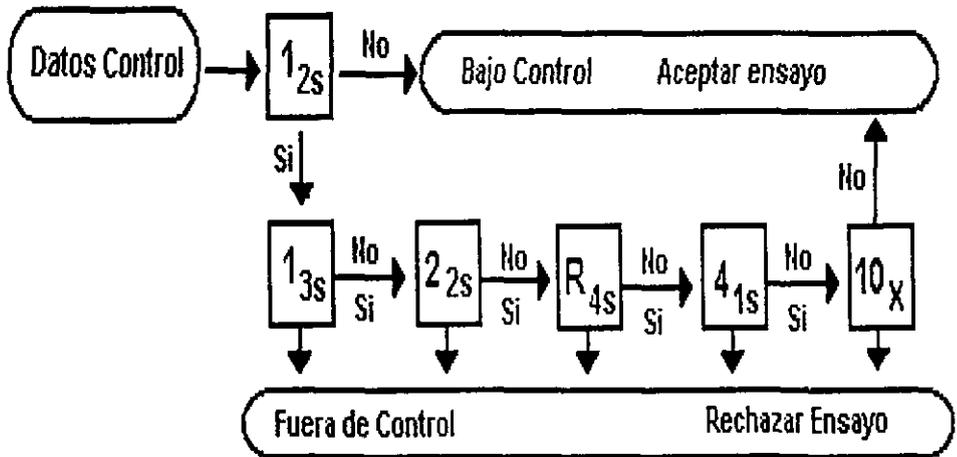
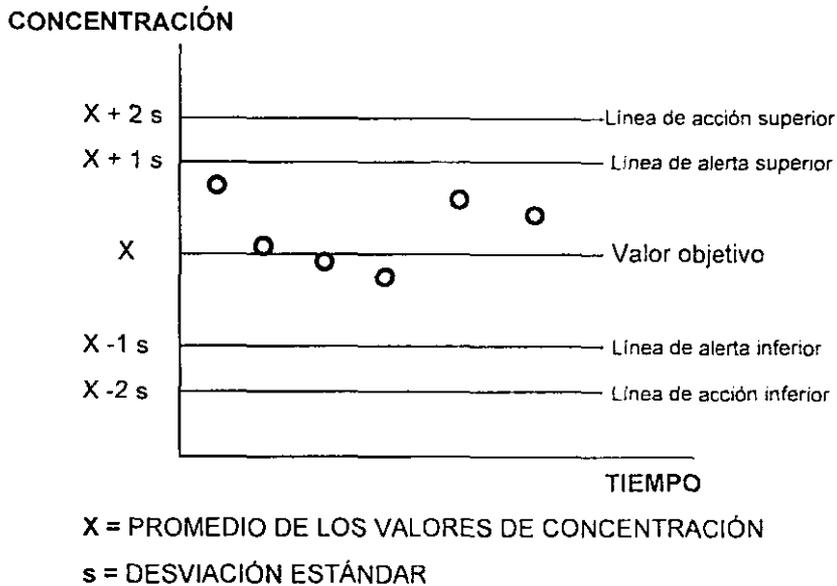


Figura 3.5.1 Diagrama de Criterios de Decisión

En la figura 3.5.2 se muestra un tipo de carta control, conocido como diagrama de Levey-Jennings.



**Figura 3.5.2 Diagrama de LEVEY-JENNINGS**

Para hacer la Carta Control para  $N-NO_2$  y otra para  $N-NO_3$ , se realizó el siguiente procedimiento: cada vez que se hacía una determinación de una muestra, se medía un control que contenía 5.00 ppm, de  $N-NO_2$  ó de  $N-NO_3$ , en este caso es importante llevar el control en valores de concentraciones altas, ya sea para uno u otro caso, esto se hizo con la finalidad de observar como la eficiencia de la columna va disminuyendo mientras va transcurriendo el tiempo, cuando se espera que los resultados cambien lo menos posible. A lo largo de este desarrollo experimental se estuvo trabajando con estos controles. Cabe mencionar que no fue el mismo control durante todo el trabajo, cada vez que se medía uno se preparaba y también se medía el que se tenía de la corrida anterior. Esto con la finalidad de observar si cambiaban o se mantenían constantes, y darnos cuenta de la tendencia que tuvieran.

Los resultados se pueden observar en las tablas siguientes, al igual que en la carta control correspondiente a cada determinación.

### NITRITOS ( $\text{N-NO}_2^-$ ):

Para este caso se obtuvieron 12 determinaciones, que fueron por triplicado y fue un total de 36 datos durante todo el intervalo de desarrollo experimental. Se determinó el promedio de estos datos como también su desviación estándar.

La siguiente tabla indica el día en que se midió el control de 5.00 ppm, como también los valores que se reportaron en cada caso.

DÍA DE DETERMINACIÓN	FECHA (día-mes-año)	CONCENTRACIÓN PROMEDIO (ppm)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
1	22-01-98	4.98	0.04
2	20-02-98	4.93	0.116
3	20-02-98	4.93	0.04
4	17-04-98	5.09	0.125
5	22-04-98	5.02	0.113
6	08-05-98	4.95	0.065
7	10-05-98	4.84	0.049
8	17-06-98	4.74	0.233
9	18-06-98	4.77	0.202
10	18-06-98	4.72	0.119
11	12-08-98	5.00	0.017
12	15-08-98	4.97	0.025

Al igual que para el caso de nitratos, aquí también a los datos obtenidos se les determinó el promedio, como también la desviación estándar, y los resultados son los siguientes:

$$\bar{X} = 4.90$$

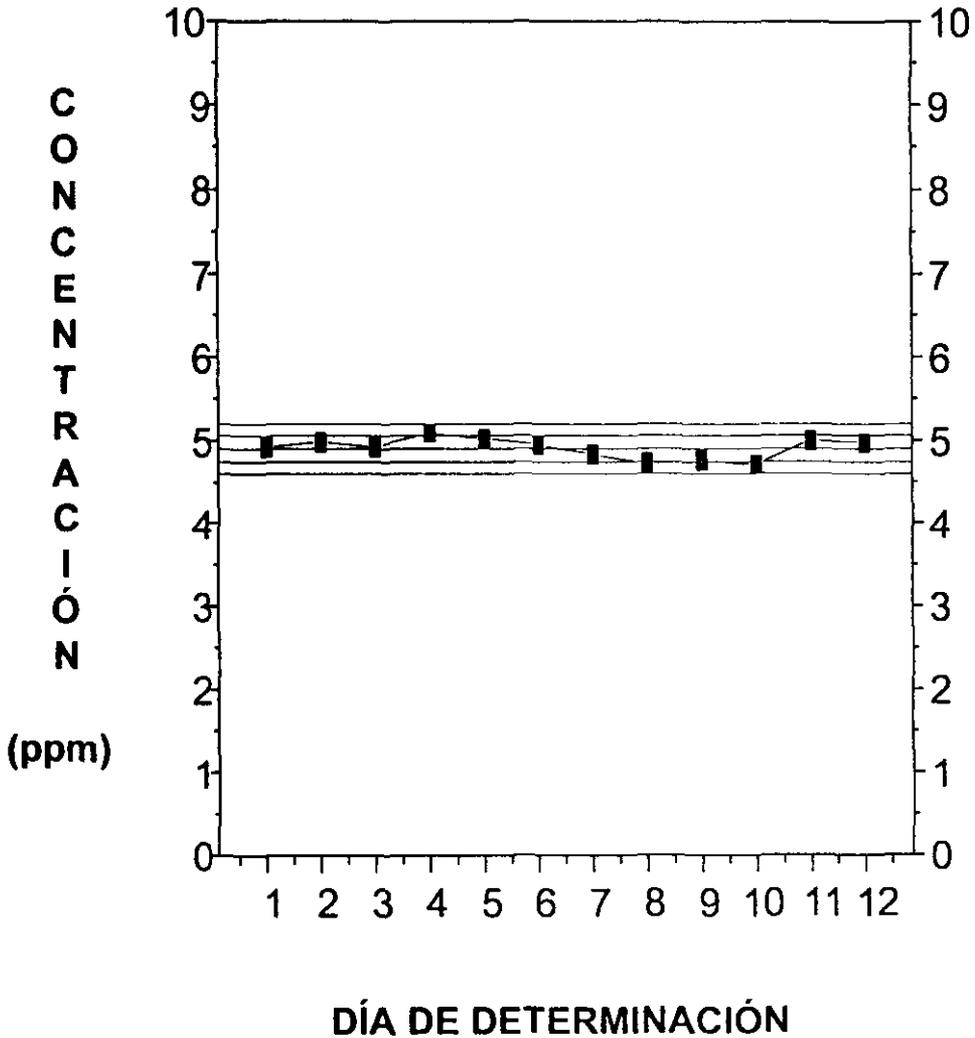
$$s = 0.15$$

$$\bar{X} + 1s = 5.06 \quad \bar{X} - 1s = 4.76$$

$$\bar{X} + 2s = 5.20 \quad \bar{X} - 2s = 4.61$$

A continuación se muestra la Carta Control correspondiente a esta segunda determinación, en ella observamos que en el eje de las abscisas se encuentra expresado el día en que fue medida la muestra control y en el eje de las ordenadas se encuentra expresado el intervalo lineal de la curva patrón.

# CARTA CONTROL PARA NITRITOS



**NITRATOS (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) :**

Para este caso se obtuvieron 12 determinaciones por triplicado cada una, para dar un total de 39 datos durante todo el intervalo de desarrollo experimental. Se determinó el promedio de estos datos como también su desviación estándar.

La siguiente tabla indica el día en que se midió el control de 5.00 ppm, como también los valores que se reportaron en cada caso.

<b>DÍA DE DETERMINACIÓN</b>	<b>FECHA (día-mes-año)</b>	<b>CONCENTRACIÓN PROMEDIO (ppm)</b>	<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>
1	22-01-98	4.68	0.064
2	27-02-98	4.74	0.04
3	28-01-98	4.32	0.015
4	30-01-98	5.61	0.46
5	27-02-98	4.74	0.078
6	06-03-98	5.08	0.032
7	01-04-98	4.61	0.049
8	02-04-98	4.56	-
9	03-04-98	5.08	0.026
10	24-04-98	5.04	0.15
11	19-06-98	5.20	0.06
12	13-08-98	4.94	0.01

Para elaborar la carta control se calculó el promedio ( $\bar{X}$ ) de todos los datos y su desviación estándar, los resultados son los siguientes:

$$\bar{X} = 4.87$$

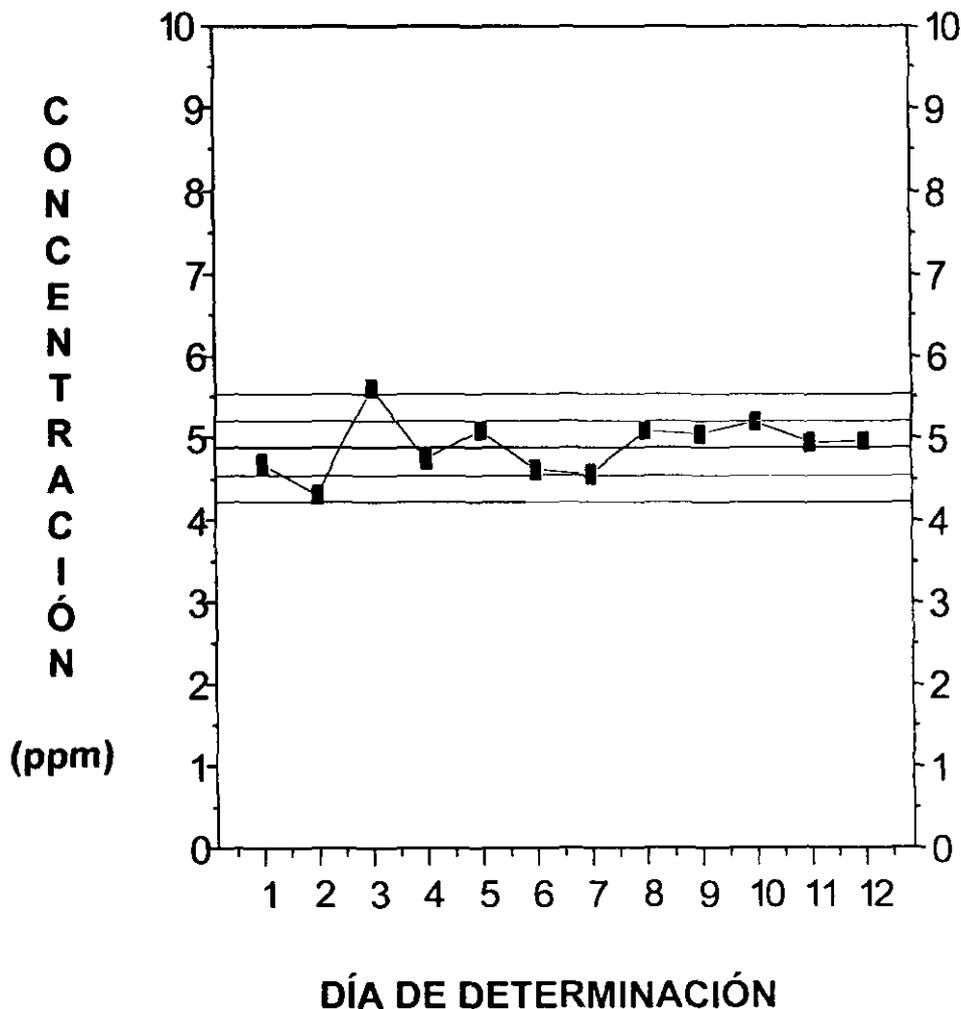
$$s = 0.33$$

$$\bar{X} + 1s = 5.20 \quad \bar{X} - 1s = 4.55$$

$$\bar{X} + 2s = 5.53 \quad \bar{X} - 2s = 4.22$$

A continuación se muestra la Carta Control correspondiente a esta primer determinación, en ella observamos que en el eje de las abscisas se encuentra expresado el día en que fue medida la muestra control y en el eje de las ordenadas se encuentra expresado el intervalo lineal de la curva patrón.

# CARTA CONTROL PARA NITRATOS



De acuerdo a los resultados anteriores, se puede decir, que para el caso de nitratos, el punto que está marcado como día de determinación 4, se sale de los límites aceptables, pues se obtuvo un valor de 5.61 ppm, por lo que rebasa el valor de  $X \pm s$ . Y como se dijo anteriormente, es recomendable que todos los puntos no rebasen más de  $X \pm 2s$ . Por lo que ese punto se debe eliminar. Todos los demás datos se mantienen por debajo del valor correspondiente a  $X \pm 2s$ , entonces se aceptan.

Por lo que respecta a los resultados de nitritos, se puede observar tanto en la tabla como en la carta control, que los datos obtenidos no rebasaron los límites de  $X \pm 2s$ , por lo que estos valores de las corridas hechas son aceptados, sin tener que eliminar ninguno.

### 3.6 LÍMITE DE DETECCIÓN

Una de las ventajas de utilizar métodos instrumentales de análisis es que son capaces de detectar y determinar cantidades de analito mucho más pequeñas que los métodos de análisis clásicos. Esta ventaja permite apreciar la importancia de las concentraciones en el nivel de trazas en muchos materiales, contribuyendo así el desarrollo de muchas otras técnicas en las cuales los límites de detección bajos son el mejor criterio para aplicarlas con éxito.

Es evidente que los métodos estadísticos son importantes para la evaluación y la comparación de límites de detección (16).

El *límite de detección* "es un número, expresado en unidades de concentración (o cantidad) que define la menor concentración (o cantidad) de un compuesto (o elemento) que un químico analítico puede determinar y que sea estadísticamente diferente de la señal generada por un blanco".

Según la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, por sus siglas en inglés), el límite de detección expresado como una concentración  $C_L$  (o cantidad  $Q_L$ ) se deriva de la medición más pequeña,  $X_L$ , que pueda ser detectada con un razonable nivel de confianza, para un procedimiento analítico (36).

Una definición que se utiliza en la bibliografía de química analítica es que el límite de detección es la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco,  $Y_B$ , más tres veces la desviación estándar del blanco,  $S_B$ :

$$Y = Y_B + 3 S_B$$

Donde:  $S_B$ : Desviación estándar del blanco.

$Y_B$ : Concentración del Blanco

La significación de esta última definición se aclara con mayor detalle en la figura 3.6.1.

Un analista que estudia concentraciones traza se enfrenta a dos problemas: por un lado no desea dar un informe de la presencia de analito cuando esté realmente ausente, pero por otro, tampoco pretende informar que el analito está ausente cuando de hecho está presente. En la figura 3.6.1., la curva A representa la distribución normal de valores medidos de la señal del blanco. Sería posible identificar un punto  $y=P$ , hacia el borde superior de esta distribución, y pretender que sería improbable que una señal más grande que ésta se debiese al blanco, mientras que se supondría que una señal menor que P indica una muestra en blanco. Sin embargo para que una muestra de una señal promedio P, el 50% de las señales observadas será menor que ésta, ya que tendrá una distribución normal que se prolonga por debajo de P (curva B). La probabilidad de concluir que esta muestra no difiere de la del blanco cuando de hecho lo hace es por lo tanto del 50%. El punto P, llamado el límite de decisión, es insatisfactorio como un límite de detección, ya que soluciona el primero de los problemas mencionados antes, pero no el segundo. Un punto más adecuado está en  $y=Q$ , de manera que Q está situado al doble de la distancia que existe entre  $Y_B$  y P.

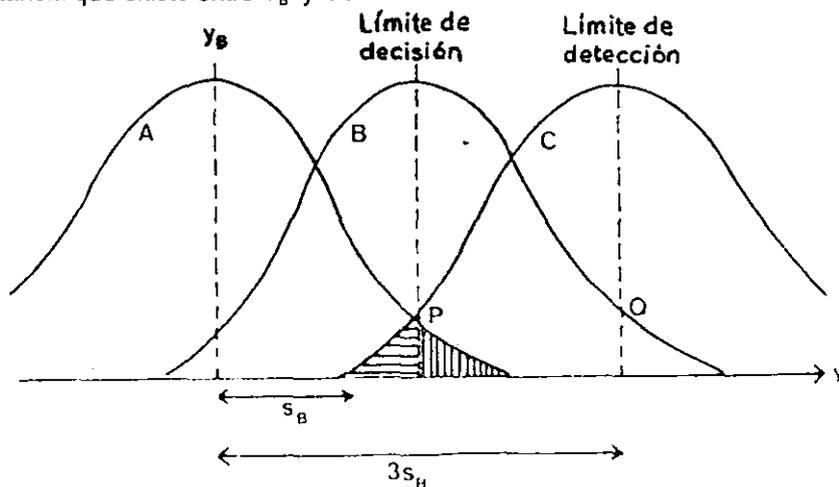


Figura 3.6.1. Límite de Decisión y Límite de detección

Otro término muy utilizado en los trabajos de química analítica es la determinación de *límite de cuantificación*, el cual está definido como el límite más bajo para mediciones cuantitativamente precisas, en oposición a la detección cualitativa.

El valor que se ha propuesto es:

$$Y_B + 10 S_B$$

Los valores reportados en este trabajo están basados en las definiciones anteriormente expuestas. La tabla de abajo muestra los resultados y los cálculos necesarios para la determinación del límite de detección.

$X_i$	$X_i^2$	$Y_i$		$\hat{Y}_i$	$(Y_i - \hat{Y}_i)$	$(Y_i - \hat{Y}_i)^2$
		Valores por triplicado	Promedio			
0.0	0.00	0,0,0	0	-2062.29	-2062.29	4253040.044
0.02	0.0004	1000,850,850	900	-1263.62	2163.62	4681251.504
0.04	0.00016	1250,1250,1200	1233.33	-464.94	1698.27	2884120.993
0.06	0.00036	1750,1900,1800	1816.67	333.73	1482.94	2199111.044
0.08	0.00064	2300,2500,2700	2500	1132.40	1367.6	1870329.76
0.10	0.01	3000,3100,3200	3100	1931.07	1168.93	1366397.345
0.30	0.09	9800,9700,9800	9766.67	9917.80	-151.13	22840.277
0.50	0.25	16200,16000,16100	16100	17904.53	-1804.53	3256328.521
0.70	0.49	23200,23600,23700	23500	25891.26	-2391.26	5718124.388
1.00	1.00	34900,34700,35500	35033.33	37871.36	-2838.03	8054414.281
3.00	9.00	115000,115000,116000	115333.33	117738.65	-2405.32	5785564.302
5.00	25.00	194000,195000,194000	194333.33	197605.95	-3272.62	10710041.66
7.00	49.00	274000,281000,278000	277666.67	277473.24	193.43	37415.165
10.0	100.00	400000,400000,400000	400000	397274.19	2725.81	7430040.156

Otra forma de calcular límite de detección y cuantificación es basándose en la recta de regresión obtenida para el analito. En este caso en base a los valores obtenidos, los correspondientes para la regresión lineal son los siguientes:

**Regresión Lineal:**

$$Y = bx + a$$

$$a = -2062.292$$

$$b = 39933.65$$

$$r = 0.9998$$

Un supuesto fundamental del método de los mínimos cuadrados, es que cada punto en la representación gráfica (incluido el que representa al blanco o ruido de fondo) tiene una variación distribuida normalmente (solo en la dirección de  $Y$ ) con una desviación estándar estimada por  $S_{y/x}$ , el cual equivaldría a  $S_B$  del blanco.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n - 2}}$$

Conociendo los valores y sustituyéndolos obtenemos lo siguiente:

$$\sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2 = 58269019.44$$

$$n - 2 = 14 - 2 = 12$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{58269019.44}{12}}$$

$$S_{y/x} = 2203.577$$

donde se utiliza los residuos de  $Y$ ,  $Y_i - \hat{Y}_i$ . Los valores de  $\hat{Y}_i$ , son los puntos sobre la recta de regresión calculada, correspondiente a los valores individuales de  $X$ , los valores de  $Y$  ajustados.

El valor de la ordenada en el origen calculada,  $a$ , puede utilizarse como una estimación de  $Y_B$ , la propia señal del blanco; debería ser una estimación más exacta de  $Y_B$  que el solo valor de la medición del blanco,  $Y$ .

De acuerdo a esta definición los resultados obtenidos para la determinación de  $N-NO_2^-$ , a partir de la recta de regresión de lineal y tomando en cuenta todos los puntos de la misma tenemos que:

$$Y_B = a = -2062.292$$

$$S_B = (S_{y/x}) = 2203.577$$

Y sustituyendo estos valores en la ecuación siguiente tenemos lo siguiente:

$$Y = Y_B + 3 S_B$$

$$Y = -2062.292 + (3 * 2203.577)$$

$$Y = 4548.439$$

De acuerdo a esto entonces el límite de detección es el siguiente:

$$Y = bx + a$$

Donde:  $Y = 4548.439$

$$a \approx -2062.292$$

$$b \approx 39933.65$$

Despejando  $x$ :

$$x = (Y - a) / b$$

$$x = \{4548.439 - (-2062.292)\} / 39933.65$$

$$x = L.D. = 0.165 \text{ ppm}$$

Por lo tanto el Límite de Cuantificación es el siguiente:

$$Y_B + 10 S_B$$

$$Y = -2062.292 + (10 * 2203.577)$$

$$Y = 19973.478$$

Entonces tenemos que:

$$Y = bx + a$$

Donde:  $Y = 19973.478$

$$a = -2062.292$$

$$b = 39933.65$$

Despejando  $x$ :

$$x = (Y - a) / b$$

$$x = \{19973.478 - (-2062.292)\} / 39933.65$$

$$x = L.C. = 0.552 \text{ ppm}$$

Si se consideran los datos obtenidos se puede ver que el valor que mejor representa al límite de detección es el encontrado para el cálculo a partir de considerar la desviación estándar proporcionada por la señal del blanco. El valor obtenido a partir de la recta de regresión en el intervalo bajo es incoherente, ya que por debajo de 0.01 ppm no se puede distinguir entre el blanco y la presencia del analito.

### 3.7 RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN ENCONTRADAS EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS DE $\text{N-NO}_2^-$ y $\text{N-NO}_3^-$

El método desarrollado y optimizado se utilizó para determinar  $\text{N-NO}_2^-$  y  $\text{N-NO}_3^-$  en muestras de agua natural, residual y potable. Los resultados que se muestran a continuación son las concentraciones que se encontraron en las diferentes muestras.

Antes de llevar a cabo este análisis, se hizo la toma de la muestra tal y como se especificó en la metodología (26). Una vez que se tuvo la muestra, se determinó  $\text{N-NO}_2^-$  dentro de las 24 horas siguientes, de recolectada la muestra. Y para el caso de  $\text{N-NO}_3^-$  se hizo durante las 48 horas siguientes. Previo a su análisis se determinó el pH de las muestras, usando un potenciómetro Cole Parmer Model 05669-21 Microcomputer pH-Vision.

La altura de la señal obtenida es directamente proporcional a la concentración de  $\text{N-NO}_2^-$  en las muestras, ya que entre mayor sea la altura la concentración también es mayor.

Las muestras se inyectaron por triplicado y el promedio de los tres datos es el valor reportado junto con la desviación estándar para cada muestra.

Para conocer la concentración de  $\text{N-NO}_3^-$ , se resta cada uno de los valores correspondientes de  $\text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^-$  menos los valores que se obtienen de  $\text{N-NO}_2^-$ , de la misma muestra.

De acuerdo a lo anterior los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

Para el caso de AGUA POTABLE (  $N-NO_2^-$  ):

AGUA DE LA RED			INTERVALO DE CONFIANZA	
CONCENTRACION	PROMEDIO	s	$s_m$	INTERVALO DE CONFIANZA
<b>Xochimilco 1:</b> 0.2986, 0.0383, 0.0359	0.1243	0.1510	0.0872	0.1243±0.375
<b>Xochimilco 2:</b> 0.0971, 0.1265, 0.1309	0.1182	0.0184	0.0106	0.1182±0.045
<b>Tlalpan:</b> 0.1706, 0.1206, 0.1473	0.1462	0.0250	0.0140	0.1462±0.060
<b>Condesa:</b> 0.0491, 0.0559, 0.0681	0.0577	0.0090	0.0052	0.0577±0.022
<b>Coyoacán:</b> 0.1568, 0.1568, 0.1566	0.1567	0.0001	0.00006	0.1567±0.0003

#### INTERVALO DE CONFIANZA:

$$s_m = s / \sqrt{n}$$

$$X \pm s_m t$$

Donde: s = desviación estándar

n = número de muestras

X = promedio de las muestras

t = t de student al 95%

$s_m$  = desviación estándar de la muestra

AGUA TINACO			INTERVALO DE CONFIANZA	
CONCENTRACION	PROMEDIO	s	s <sub>m</sub>	INTERVALO DE CONFIANZA
<b>Xochimilco 1:</b> 0.2431, 0.2525, 0.2287	0.2414	0.0119	0.0069	0.2414±0.030
<b>Xochimilco 2:</b> 0.0759, 0.0807, 0.0848	0.0805	0.0044	0.0025	0.0805±0.011
<b>Tlalpan:</b> 0.1709, 0.1581, 0.1384	0.1558	0.0164	0.0095	0.1558±0.041
<b>Condesa:</b> 0.1279, 0.1096, 0.0972	0.1116	0.0154	0.0089	0.1116±0.038
<b>Coyoacán:</b> 0.1236, 0.1462, 0.1567	0.1422	0.0169	0.0097	0.1422±0.042

**INTERVALO DE CONFIANZA:**

$$s_m = s / \sqrt{n}$$

$$X \pm s_m t$$

Donde: s = desviación estándar  
n = número de muestras  
X = promedio de las muestras  
t = t de student al 95%  
s<sub>m</sub> = desviación estándar de la muestra

Los pH's correspondientes a cada muestra se presentan a continuación:

MUESTRA	AGUA DE LA RED pH	AGUA TINACO pH
Xochimilco 1	6.81	7.15
Xochimilco 2	6.79	7.30
Tlalpan	6.51	6.91
Condesa	7.00	7.00
Coyoacán	7.07	6.92

Para el caso de AGUA POTABLE (  $N-NO_3^-$  ):

AGUA DE LA RED			INTERVALO DE CONFIANZA	
CONCENTRACION	PROMEDIO	s	$s_m$	INTERVALO DE CONFIANZA
<b>Xochimilco 1:</b> 2.4432, 2.7015, 2.6758	2.6068	0.1423	0.0820	2.6068±0.3530
<b>Xochimilco 2:</b> 1.7402, 1.6732, 1.7102	1.7079	0.0335	0.0190	1.7079±0.082
<b>Tlalpan:</b> 0.9804, 1.0304, 1.0037	1.0048	0.0250	0.0140	1.0048±0.060
<b>Condesa:</b> 0.3394, 0.3140, 0.3037	0.3204	0.0168	0.0090	0.3204±0.039
<b>Coyoacán:</b> 1.1558, 1.1528, 1.1770	1.2959	0.2273	0.1310	1.2959±0.563

#### INTERVALO DE CONFIANZA:

$$s_m = s / \sqrt{n}$$

$$X \pm s_m t$$

Donde: s = desviación estándar

n = número de muestras

X = promedio de las muestras

t = t de student al 95%

$s_m$  = desviación estándar de la muestra

AGUA TINACO			INTERVALO DE CONFIANZA	
CONCENTRACION	PROMEDIO	s	s <sub>m</sub>	INTERVALO DE CONFIANZA
<b>Xochimilco 1:</b> 2.8584, 2.8432, 2.8986	2.8667	0.0286	0.0160	2.8667±0.069
<b>Xochimilco 2:</b> 1.8609, 1.7785, 1.8272	1.8222	0.0414	0.0240	1.8222±0.103
<b>Tlalpan:</b> 0.9951, 1.0069, 1.0256	1.0092	0.0154	0.0090	1.0092±0.039
<b>Condesa:</b> 0.2697, 0.2882, 0.3040	0.2873	0.0172	0.0090	0.2873±0.039
<b>Coyoacán:</b> 1.5414, 1.5268, 1.4966	1.5216	0.0228	0.0130	1.5216±0.056

**INTERVALO DE CONFIANZA:**

$$s_m = s / \sqrt{n}$$

$$X \pm s_m t$$

Donde: s = desviación estándar  
n = número de muestras  
X = promedio de las muestras  
t = t de student al 95%  
s<sub>m</sub> = desviación estándar de la muestra

Los pH's correspondientes a cada muestra se presentan a continuación:

MUESTRA	AGUA DE LA RED pH	AGUA TINACO pH
Xochimilco 1	6.81	7.15
Xochimilco 2	6.79	7.30
Tlalpan	6.51	6.91
Condesa	7.00	7.00
Coyoacán	7.07	6.92

En la primer tabla para  $N-NO_2^-$ , se puede observar que las concentraciones oscilan entre 0.05 y 0.157 ppm para el agua de la red y de 0.080 a 0.241 ppm para el agua de tinaco. Este aumento se debe principalmente a que el agua de tinaco es almacenada. Todas estas muestras tienen valores de pH, que se encuentran entre 6.5-7.30.

Se ha observado que todos estos datos de concentración obtenidos cumplen con los valores establecidos por las Normas Oficiales de Calidad del Agua (no mayor a 1.0 ppm, para agua potable). En las 4 delegaciones de muestreo (Xochimilco, Tlálpán, Cuauhtémoc y Coyoacán), de acuerdo a los resultados de  $N-NO_2^-$  se encontró que la menor concentración fue en la Colonia Tepepan en el agua de la red. El agua de tinaco donde se encontró la menor concentración fue en el Barrio San Pedro, ambos lugares de la Delegación Xochimilco.

En la tabla de  $N-NO_3^-$ , se puede observar que las concentraciones oscilan de 0.32 a 2.7 ppm para el agua de la red y de 0.29 a 2.87 ppm para el agua de tinaco. Los valores de pH, se encuentran entre 6.5-7.30.

Se ha observado que todos estos datos de concentración obtenidos cumplen con los valores establecidos por las Normas Oficiales de Calidad del Agua (no mayor a 10.0 ppm, para agua potable). En las 4 delegaciones de muestreo (Xochimilco, Tlálpán, Cuauhtémoc y Coyoacán), de acuerdo a los resultados de  $N-NO_3^-$  se encontró que la menor concentración fue en la Colonia Condesa tanto en el agua de la red como en el agua de tinaco.

Haciendo referencia al valor obtenido del límite de detección, podemos concluir que el método utilizado para la determinación de  $N-NO_2^-$  es adecuado ya que el límite de detección es de 0.017 ppm y el límite de cuantificación fue de 0.170 ppm, lo que nos indica que nuestros resultados son confiables. Para el caso de  $N-NO_3^-$  fue de 0.005 ppm y el límite de cuantificación fue de 0.050, por lo que los resultados de las muestras también son confiables.

En cuanto a las muestras de la *PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA DE LA UNAM* los resultados para  $N-NO_2^-$  son los siguientes:

PLANTA DE TRATAMIENTO DE LA UNAM			INTERVALO DE CONFIANZA	
CONCENTRACION	PROMEDIO	s	$s_m$	INTERVALO DE CONFIANZA
<b>Agua Tratada:</b> 0.5037, 0.5201, 0.5336	0.5191	0.0150	0.0087	$0.5191 \pm 0.037$
<b>Agua Residual:</b> 0.2403, 0.2358, 0.2386	0.2382	0.0023	0.0013	$0.2382 \pm 0.006$

#### INTERVALO DE CONFIANZA:

$$s_m = s / \sqrt{n}$$

$$X \pm s_m t$$

Donde: s = desviación estándar  
 n = número de muestras  
 X = promedio de las muestras  
 t = t de student al 95%  
 $s_m$  = desviación estándar de la muestra

Los pH's de estas muestras se muestran a continuación:

MUESTRA	pH
Agua Tratada	7.46
Agua Residual	7.87

Y para el caso de  $\text{N-NO}_3^-$  encontrados en las muestras de la *PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA DE LA UNAM* los valores obtenidos fueron los siguientes:

PLANTA DE TRATAMIENTO DE LA UNAM			INTERVALO DE CONFIANZA		
CONCENTRACION	PROMEDIO	s	$s_m$	INTERVALO DE CONFIANZA	
<b>Agua Tratada:</b>					
1.5734, 1.5734, 1.5375	1.5614	0.0207	0.0120	1.5614±0.052	
<b>Agua Residual:</b>					
0.1570, 0.1675, 0.1622	0.1622	0.0052	0.003	0.1622±0.013	

#### INTERVALO DE CONFIANZA:

$$s_m = s / \sqrt{n}$$

$$X \pm s_m t$$

Donde: s = desviación estándar

n = número de muestras

X = promedio de las muestras

t = t de student al 95%

$s_m$  = desviación estándar de la muestra

Los pH's de estas muestras se muestran a continuación:

MUESTRA	pH
Agua Tratada	7.46
Agua Residual	7.87

En las muestras para determinar  $\text{N-NO}_2^-$  de la Planta de Tratamiento de Agua de la UNAM, se encontró una mayor concentración de  $\text{N-NO}_2^-$  en el agua tratada, 0.519 ppm, con un pH de 7.46; mientras que para el caso del agua residual la concentración fue de 0.238 ppm, con un pH de 7.87.

Este último resultado conlleva a pensar que al ser tratada el agua con biodiscos, estos ocasionan que la concentración de nitritos en el agua aumente.

Por lo que respecta a la determinación de  $\text{N-NO}_3^-$ , en las muestras de la Planta de Tratamiento de Agua de la UNAM, se encontró una mayor concentración de  $\text{N-NO}_3^-$  en el agua tratada ya que el valor fue de 1.561 ppm, con un pH de 7.46; mientras que para el caso del agua residual la concentración fue de 0.162 ppm, con un pH de 7.87. Este último resultado también al igual que para el caso de  $\text{N-NO}_2^-$ , conlleva a pensar que al ser tratada el agua con biodiscos, estos ocasionan que la concentración de nitritos en el agua aumente.

Los valores obtenidos para N-NO<sub>2</sub> en el AGUA DE RÍO son:

AGUA DE RIO			INTERVALO DE CONFIANZA		
CONCENTRACION	PROMEDIO	s	s <sub>m</sub>	INTERVALO DE CONFIANZA	
Texcaliacac 1: 0.1317, 0.0899, 0.0888	0.1035	0.0240	0.0138	0.1035±0.059	
Texcaliacac 2: NO DETECTABLE	-----	-----	-----	-----	
Texcaliacac 3: 0.1642, 0.1586, 0.1582	0.1603	0.0030	0.0017	0.1603±0.007	
Texcaliacac 4: 0.1347, 0.1337, 0.1398	0.1361	0.0030	0.0017	0.1361±0.007	
Texcaliacac 5: 0.6241, 0.6369, 0.6369	0.6326	0.0070	0.0040	0.6326±0.017	

#### INTERVALO DE CONFIANZA:

$$s_m = s / \sqrt{n}$$

$$X \pm s_m t$$

Donde: s = desviación estándar  
 n = número de muestras  
 X = promedio de las muestras  
 t = t de student al 95%  
 s<sub>m</sub> = desviación estándar de la muestra

Mientras que los valores obtenidos para  $N-NO_3^-$  en el AGUA DE RÍO son:

AGUA DE RIO			INTERVALO DE CONFIANZA	
CONCENTRACION	PROMEDIO	s	$s_m$	INTERVALO DE CONFIANZA
<b>Texcaliacac 1:</b> 0.5422, 0.5835, 0.5908	0.5722	0.0262	0.0151	0.5722±0.065
<b>Texcaliacac 2:</b> 0.4059, 0.4006, 0.4047	0.4037	0.0028	0.0016	0.4037±0.007
<b>Texcaliacac 3:</b> 0.2281, 0.2390, 0.2336	0.2336	0.0054	0.0031	0.2336±0.013
<b>Texcaliacac 4:</b> 0.2353, 0.2346, 0.2208	0.2302	0.0082	0.0047	0.2302±0.020
<b>Texcaliacac 5:</b> 0.2825, 0.2802, 0.2775	0.2801	0.0025	0.0014	0.2801±0.006

#### INTERVALO DE CONFIANZA:

$$s_m = s / \sqrt{n}$$

$$X \pm s_m t$$

Donde: s = desviación estándar  
 n = número de muestras  
 X = promedio de las muestras  
 t = t de student al 95%  
 $s_m$  = desviación estándar de la muestra

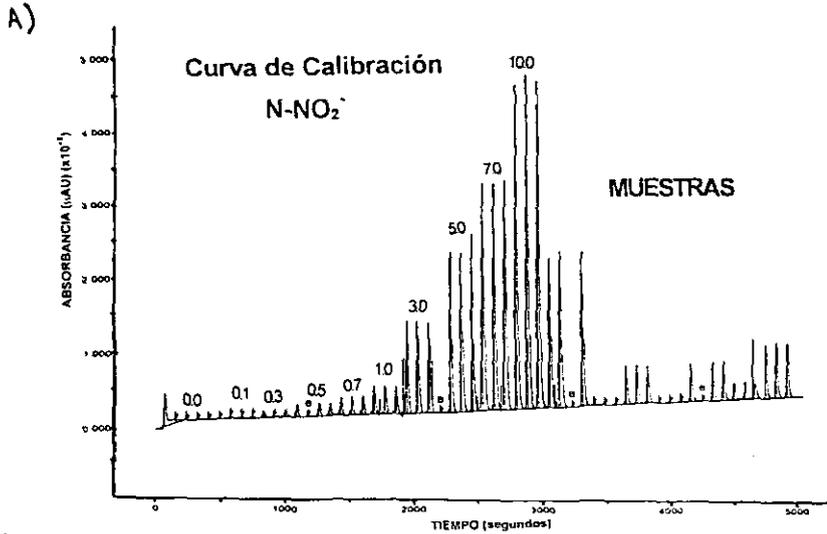
Los pH's correspondientes a cada muestra se presentan a continuación:

MUESTRA	pH
Texcaliacac 1	7.89
Texcaliacac 2	7.65
Texcaliacac 3	7.60
Texcaliacac 4	8.07
Texcaliacac 5	7.29

En las muestras para determinar tanto  $\text{N-NO}_2^-$  como  $\text{N-NO}_3^-$  se puede observar que aunque las muestras son del mismo afluente se puede ver que existen diferencias entre una y otra, al igual que los valores de pH. Lo que en este caso nos influye es que el muestreo fue hecho en diferentes puntos del río, lo cual indica que puede haber algún tipo de desechos que están provocando las diferencias de concentraciones.

En la figura 3.7.1 se muestra como se observa uno de los diagramas para la determinación de  $\text{N-NO}_2^-$  obtenido a partir de la curva de calibración con algunas muestras. Al igual que los datos de la curva de calibración.

Y en la figura 3.7.2 se muestran los correspondientes a la determinación de  $\text{N-NO}_3^-$ .



0: es la línea base, esta nos indica que cada 11 inyecciones que haga el equipo automatizado, nos verificará la línea base.

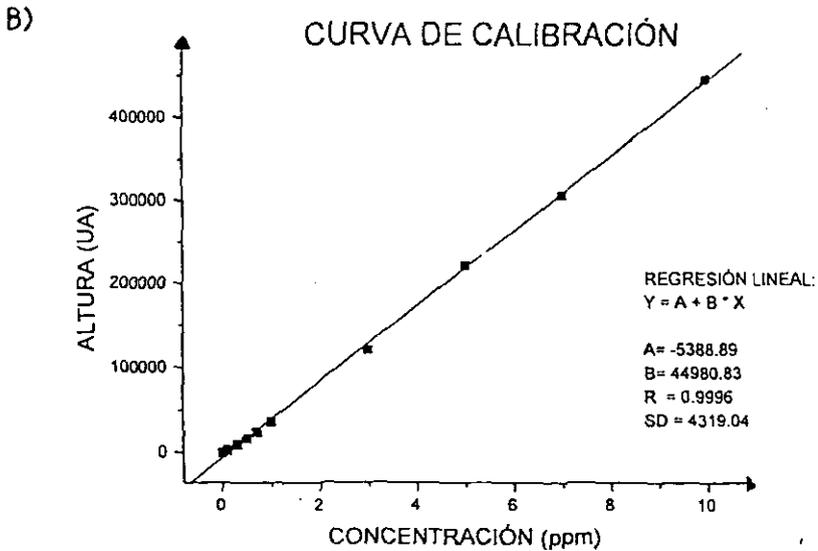
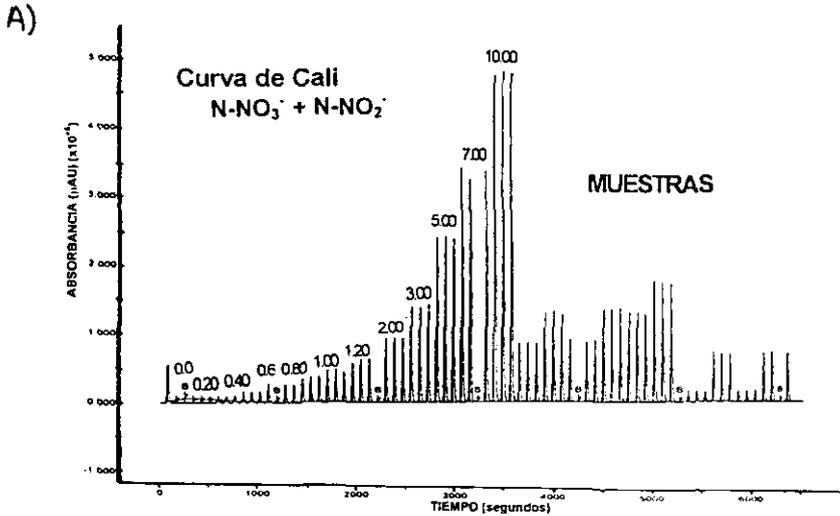


FIGURA 3.7.1 A) Diagrama obtenido de la determinación de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

B) Curva de Calibración



B: es la línea base, esta nos indica que cada 11 inyecciones que haga el equipo automatizado nos verificará la línea base.

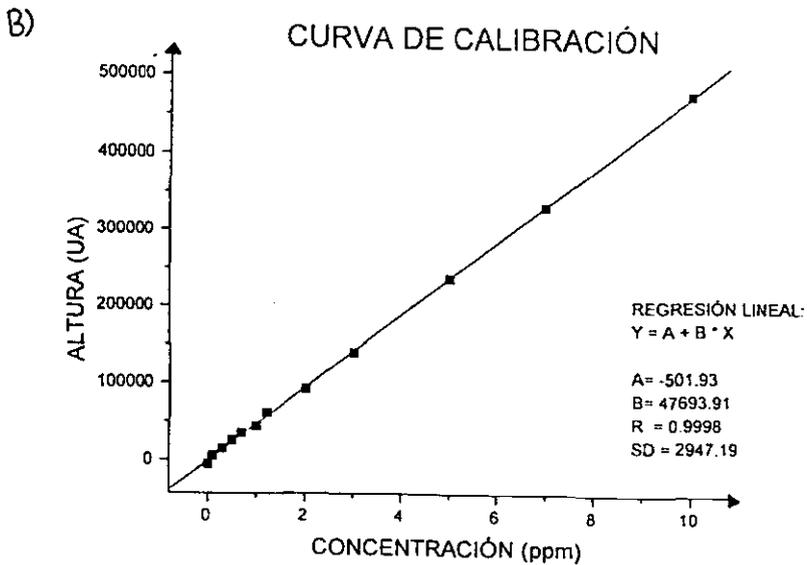


FIGURA 3.7.2 A) Diagrama obtenido de la determinación de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

B) Curva de Calibración

## CONCLUSIONES

Una vez que se ha hecho todo el trabajo experimental, para la validación de los métodos, se hizo un análisis de costos, el cual nos da una idea de las ventajas que ofrece el método expuesto en esta tesis.

En la tabla 3.8 se muestra el análisis de costos para la determinación de  $\text{N-NO}_2^-$  y  $\text{N-NO}_3^-$ .

En ella se hace una comparación de costos entre la metodología que usa el método estándar de la Norma Oficial Mexicana (NMX) y la metodología implementada en el equipo automatizado FIA.

En cuanto a la concentración (g/L) del reactivo de color, se puede observar que para la determinación por FIA se utilizan 4.0 g/L de sulfanilamida y en el método estándar se utilizan 10.0 g/L. Se utilizan 2.0 g/L de N-1-naftiletildiamina (NED) para la determinación por FIA y sólo 1.0 g/L para el método de la NMX; del ácido fosfórico se utilizan cantidades iguales para ambos métodos, 168.5 g/L.

Los mililitros que se gastan por determinación, para este reactivo de color son: para el caso de FIA 0.8 mL y para el método estándar se gastan 2.0 mL, lo que implica que el costo por determinación en pesos es de \$0.207 y \$0.504, respectivamente. Haciendo globalmente el costo por muestra es de \$0.621 para la determinación por FIA y \$1.512 para el método estándar, por determinación. La diferencia es de \$0.891, entre ambos métodos. Esta diferencia parecerá poco significativa, pero si tomamos en cuenta que no es un análisis el que realizamos, sino que son muchos los que se hacen diariamente, entonces aquí la diferencia será bastante significativa.

Por lo que respecta al buffer: aquí se observa que del EDTA se gasta 1.0 g/L para FIA y 1.7 g/L para el método estándar y del cloruro de amonio se gasta 85.0 g/L para FIA y 13.0 g/L para el método estándar; la diferencia en concentración de este último reactivo es bastante grande si se realiza la determinación por FIA; pero esto no provoca mayor problema, ya que el gasto

por determinación es menor por FIA que por el método estándar, siendo de 0.9 mL para el primero y 75.0 mL para el segundo; lo cual hace que el costo por determinación, para el FIA sea de \$0.0279 y para el método estándar sea de \$1.008. Por lo tanto el costo por muestra es de \$0.083 por FIA y de \$3.024 por el método estándar. La diferencia de este reactivo, entonces, entre ambos métodos es de \$2.941.

El costo total para FIA tomando en cuenta ambos reactivos es de \$0.705 y para el método de la NMX es de \$4.530; como se puede observar aproximadamente hay un ahorro del 85%, por parte de la metodología del FIA con respecto a la del método estándar.

Y podrá parecer una diferencia muy poco significativa, pero tomando en cuenta que se trata de implementar estas determinaciones en análisis de rutina, se puede pensar que esta diferencia incrementará entre más muestras se analicen.

En donde sí habría un gasto muy grande por parte de la técnica FIA, sería en la adquisición del equipo automatizado, pero se debe tomar en cuenta que posteriormente los gastos serán amortizados.

Se ha visto a lo largo de este trabajo que el utilizar un equipo automatizado FIA, en un laboratorio de análisis de rutina sigue teniendo muchas ventajas.

Como conclusión final, de acuerdo a los resultados obtenidos, la determinación de  $\text{N-NO}_2^-$  y  $\text{N-NO}_3^-$  por FIA es altamente recomendable para análisis de rutina, ya que se pueden realizar determinaciones con una alta precisión expresada como D.E.R. (2.43 para  $\text{N-NO}_2^-$  y 0.9 para  $\text{N-NO}_3^-$ ), rapidez (frecuencia de muestreo de 42 determinaciones por hora -12 muestras inyectadas por triplicado, y 4 inyecciones de un blanco- para ambas determinaciones) y finalmente económica (disminución de un 85% del costo por determinación).

REACTIVO	CONCENTRACION (g/L)		mL GASTADOS POR DET.		COSTO POR DET. (PESOS)		COSTO POR MUESTRA (PESOS)	
	FIA	EST.	FIA	EST.	FIA	EST.	FIA	EST.
COLOR:			0.8	2	0.207	0.504	0.621	1.512
SULFANILAMIDA	4	10						
NED	2	1						
ÁC. FOSFÓRICO	168.5	168.5						
BUFFER:			0.9	75	0.0279	1.008	0.083	3.024
EDTA	1	1.7						
NH <sub>4</sub> Cl	85	13						
TOTAL					0.0235	1.512	0.705	4.530

**TABLA 3.8 COMPARACIÓN DE ANÁLISIS DE COSTOS ENTRE LA METODOLOGÍA DEL MÉTODO ESTÁNDAR Y LA DEL EQUIPO AUTOMATIZADO FIA.**

*Este análisis de costos se hizo tomando en cuenta el valor del dólar en \$9.00 y considerando los precios de los reactivos de marca SIGMA y Aldrich.*

- AHORRO APROX. DEL 85% DEL EQUIPO AUTOMATIZADO FIA CON RESPECTO AL PROPUESTO POR EL MÉTODO ESTÁNDAR.

- Tiempo total de análisis para una sola determinación de N-NO<sub>2</sub>:

FIA: 1.39 MINUTOS

MÉTODO ESTÁNDAR: 12 MINUTOS

- Para la determinación de  $\text{N-NO}_3^-$  es necesario hacer la reducción a  $\text{N-NO}_2^-$  con una columna de cadmio cuperizado, el costo para ambos métodos es prácticamente el mismo:

Tiempo total de análisis para una sola determinación:

FIA: 1.42 MINUTOS

MÉTODO ESTÁNDAR: 19 MINUTOS

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Kazanas y cols. Procesos básicos de Manufactura. Editorial Mc Graw-Hill. México D.F. Año 1983.
- (2) Valcárcel M. y Luque de Castro M.D. Memorias del Curso de Doctorado de Química Analítica. Córdoba, España.
- (3) Gómez Ruíz H. Memorias del Curso de Química Analítica Ambiental. ABC Instrumentación. México, 1994.
- (4) Valcárcel M. y Luque de Castro M.D.; *Flow Injection Analysis. Principles and Applications*. Ed. John Wiley & Sons, Gran Bretaña 1987.
- (5) Serizot P.; *Analisis*, 19 (2), 127, 1991.
- (6) Shpigun L.K., Kolotyrykina I. y Zolotov Y.A; *Anal. Chim. Acta*; 261, 307, 1992.
- (7) Lázaro F., Luque de Castro M.D. y Valcárcel M.; *Analisis*; 13, 147, 1985.
- (8) Koupparis M.A., Anagnostopouou P.I.; *Analyst*; 111, 1311, 1986.
- (9) Martínez P., Gallego M. y Valcárcel M.; *Analyst*; 112, 1233, 1987.
- (10) Cañete F.; Rios A., Luque de Castro M.D. y Valcárcel M.; *Analyst*; 113, 739, 1988.
- (11) Cardwell T.J., Catral R. y Mitri M.; *Talanta*; 41, 115, 1994.
- (12) Ren-Min Liu, Dao-Jie Liu y Ai-Ling Sun; *Analyst*; 117, 1767, 1992.
- (13) Cañizares P. y Luque de Castro M.D.; *Anal. Chim. Acta*; 295, 59, 1994.
- (14) Ruzicka J. Y cols. *Flow Injection Analysis*. Edit. John Wiley and Sons. 2nd. Edition. U.S.A. 1982.
- (15) Valcarcel M. y col. *Flow Injection Analysis. Principles and Applications*. Edit. Ellis Harwood Limited. 1st. Edition. Gran Bretaña, 1987.
- (16) Appelquist R, y cols. *Analytica Chimica Acta*, 180 (1986), 1-67.
- (17) Vernon L. Snoeyink. *Química del Agua*. Editorial Limusa. México D.F. 1987.

- 
- (18) Hinrich L. Bohn et al. *Química del Suelo*. Grupo Noriega Editores. Limusa. Primera Edición. 1993.
- (19) Derache R. *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Editorial Omega Barcelona, España. 1990.
- (20) Samuel R. Aldrich. *Nitrogen in relation to food, environment and energy*. The Board of Trustees of the University of Illinois. *Manufactured in the United States of America*. 1980.
- (21) Harold M. McNair y Benjamin Esquivel H. *Cromatografía Líquida de Alta Presión*. Segunda Edición, 1980. The General Secretariat of the Organization of American States Washington, D.C.
- (22) Blanco D.; et al. *Determination of nitrate and nitrite in tap water and vegetables by high performance liquid chromatography*. *Journal of Liquid Chromatography*: 18 (1995) 2445-2456.
- (23) Gilliam, M.B. et al. *Analytical Biochemistry* (1993), 212, 359-365. Enzymatic Assay of nitrate Reductase (NAD [P] H).
- (24) Morrison y Boyd. *Química Orgánica*. Editorial Addison-Wesley Iberoamerica. 5ta. Edición. U.S.A. 1990.
- (25) Packer J. Y col. *A modern Approach to Organic Chemistry*. Edit. Oxford University Press. 1 st. Edition. Gran Bretaña. 1958.
- (26) *Annual Book of ASTM Standards*. American Society for Testing and Materials. *Water and Environmental Technology*. Water ( I ). Vol. 11.01(D 3867-90) Philadelphia, PA. 1991.
- (27) *Annual Book of ASTM Standards*. American Society for Testing and Materials. *Water and Environmental Technology*. Water ( I ). Vol. 11.01 (D 3370-82) Philadelphia, PA. 1991.

- 
- (28) Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials. *Water and Environmental Technology. Water (1)*. Vol. 11.01(D 3866-90) Philadelphia, PA. 1991.
- (29) The American Heritage Dictionary of the English Language. William Morris Ed. American Heritage. 1969
- (30) Scott A. Glazier. *Anal. Chem.*, 1998, 70, 1511-1515.
- (31) M.F. Giné y cols. *Analytica Chimica Acta*, 114 (1980). 191-197
- (32) Ruzicka, J., Hansen, E.H. y Ramsing, A. U., *Flow Analyzer for students, teaching and research*, *Anal. Chim. Acta*, 1982, 134, 55.
- (33) Pungor, E., Feher, Z., Nagy, G., Toth, K., Morvai, G. y Gratzl, M., *Injection techniques in dynamic Flow-through Analysis with electroanalytical sensors*, *Anal. Chim. Acta*, 1979, 109 I.
- (34) Ruzicka, J., Hansen, E.H. y Mosback, *Flow Injection Analysis, Part. IX. A new approach to continuous flow titrations*, *Anal. Chim. Acta*, 1977, 92, 235.
- (35) Valcárcel M. y Luque de Castro M.D. *Análisis por Inyección en flujo*. Depto. de Química Analítica. Córdoba, España, 1984, 107-131.
- (36) Gómez Ruíz H. *Memorias del Curso de Control de Calidad en resultados Analíticos*. México, 1998.