

Problemática de la determinación de especies nitrogenadas (nitrógeno total y amoniacal) en aguas residuales

María del Carmen Espinosa-Lloréns, Yadiana León-Hernández y Xiomara Rodríguez-Petit.

Dpto. de Estudios sobre Contaminación Ambiental, Dirección de Medio Ambiente, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba. E.mail: maria.espinosa@cnic.edu.cu.

Recibido: 28 de enero del 2013.

Aceptado: 11 de junio del 2013.

Palabras clave: nitrógeno, aguas residuales, Kjeldahl, electrodo selectivo, límite de cuantificación.

Key words: Nitrogen, wastewaters, Kjeldahl, selective electrode, quantification limit

RESUMEN. El nitrógeno es un indicador relevante en los estudios medioambientales, debido a la importancia que este tiene en los procesos de tratamiento, en el control de la calidad de las aguas y de las descargas de las aguas residuales al medio. El método Kjeldahl es el más ampliamente utilizado para la determinación de nitrógeno total (N_{total}) y en las aguas residuales se encuentran diferentes especies nitrogenadas, como son: nitrógeno orgánico y amoniacal, nitritos, nitratos, entre otras. La norma cubana de vertimiento de aguas residuales (NC 27:2012) hace obligatoria la determinación de N_{total} mediante el método Kjeldahl. Los electrodos selectivos (ES) han permitido la determinación de nitrógeno amoniacal (N_{am}) con límites de cuantificación (LC) inferiores al método Kjeldahl. En el presente trabajo se realiza una valoración de la problemática de la determinación de N_{total} y N_{am} en aguas residuales, teniendo en cuenta los Límites Máximos Permisibles Promedios (LMPP) de la NC 27:2012 y los límites de cuantificación (LC) de los métodos analíticos objeto de estudio. En el trabajo experimental se emplearon materiales de referencia y agua residual porcina. Se comprobó que en las condiciones del laboratorio donde se desarrolló el trabajo el LC del nitrógeno determinado por el método Kjeldahl es superior (10 mg/L) a lo que establece el método normalizado (5 mg/L), el que coincide con el LMPP de la norma de vertimiento cubana. Por esta razón el laboratorio ha tenido que implementar la adición de estándares múltiples como alternativa para lograr resultados confiables con concentraciones inferiores a su LC. Además, se demostró que en la determinación de N_{am} , el método Kjeldahl y el de ES no mostraron diferencias significativas en las concentraciones iguales o superiores a 10 mg/L, pero sí para aquellas inferiores al LC del laboratorio en el método Kjeldahl.

ABSTRACT. Nitrogen is a significant indicator in environmental studies, due to its importance in treatment processes, quality control of waters and control of wastewater discharge to the environment. The Kjeldahl method is the most widely used for determining total nitrogen. There are different nitrogen species in wastewater: organic and ammonia nitrogen, nitrites, nitrates, among others. The National Standard of Wastewater Discharge (NC: #2012) mandates the determination of total nitrogen (N_{total}) by the Kjeldahl method. Selective electrodes (SE) have allowed the determination of ammonia nitrogen (N_{amm}) with limits of quantification (LOQ) below the Kjeldahl method. This paper, evaluates the problems of determination of N_{total} and N_{amm} in wastewater, taking into account the maximal permissible averages limits (MPAL) of the NC 27:2012 and the LOQ of the analytical methods studied. For the experiments, reference materials and swine wastewater were used. Under laboratory conditions, the LOQ of Kjeldahl nitrogen was higher (10 mg/L) the one established in the standard method (5 mg/L), which matches with the MPAL for the Cuban standard of discharge. Therefore, the laboratory has had to implement multiple standard additions, just to achieve reliable results at concentrations below its LOQ. Furthermore, it was proven that Kjeldahl and SE methods showed no significant differences in determining N_{amm} , for concentrations at or above 10 mg/L, but for those one below the lab LOQ in the Kjeldahl method.

INTRODUCCION

Los contaminantes en las aguas residuales son normalmente, una mezcla compleja de compuestos orgánicos e inorgánicos y por ello no es práctico ni posible, en la mayoría de los casos, obtener su análisis completo. Por las razones anteriores, se ha desarrollado una serie de métodos empíricos para la evaluación de la concentración de contaminantes en aguas residuales, cuya aplicación no requiere un conocimiento completo de la composición química específica de las aguas residuales que se trate.

Esta es la razón del porqué la medición de los llamados parámetros combinados o compuestos es la opción que más se usa a menudo para el control de la calidad de las aguas residuales, ya que proporciona a los usuarios una vía rápida y global de apreciar los efectos potenciales de una contaminación no específica.¹ Entre estos métodos de este tipo se encuentran la demanda química de oxígeno (DQO), la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) los aceites y grasas, el nitrógeno total Kjeldahl, los fenoles totales y otros.¹

Simonet, Lendl y Valcárcel, en 2006,² sistematizaron y describieron los “parámetros definidos a través de un método” como resultados analíticos no convencionales, ya que dependen de los métodos a los que dan lugar sus resultados, no de mediciones estándar. Son de gran relevancia práctica, porque se utilizan ampliamente en los laboratorios de rutina. Se ha identificado la necesidad de adaptar el enfoque metrológico en la Química a sus características analíticas peculiares. De esta forma, los procesos de acreditación de los laboratorios analíticos pudieran facilitarse, tomando en cuenta la necesidad de métodos simples y confiables para procesar un gran número de muestras diariamente.

Para lograr resultados confiables con este tipo de métodos analíticos es necesario ajustarse exactamente a las condiciones descritas en el documento normalizativo de referencia. Sin embargo, esto pudiera parecer contradictorio dada la gran variedad de matrices e interferencias de todo tipo, a las que tiene que enfrentarse un laboratorio de caracterización de aguas residuales en su trabajo diario. Es el caso de las aguas residuales industriales como las de destilería, con un elevado contenido de materia orgánica (DQO de hasta decenas de g/L); o aquellas cuyo origen es un proceso de purificación de proteínas mediante cromatografía, con un contenido de sólidos disueltos totales del orden de las decenas de g/L y escaso o nulo contenido de materia orgánica, o las aguas residuales de los procesos de generación de energía eléctrica, con determinado contenido de grasas y aceites de origen mineral (hidrocarburos), por solo acotar tres ejemplos.³

Entre los métodos analíticos que se utilizan, con mayor frecuencia en los estudios medioambientales se tienen los de determinación de nitrógeno, debido a la importancia que este tiene como indicador en los procesos de tratamientos control de la calidad de las aguas y en el control de las descargas de las aguas residuales al medio.⁴

El nitrógeno es un nutriente esencial para todas las formas de vida y cambios pequeños en las concentraciones de nitrógeno biológicamente asequible pueden afectar drásticamente los niveles de la vida de los animales y las plantas. En el agua de origen residual existe amoníaco (NH_3) en forma no ionizada, que es tóxico y la forma ionizada (ion amonio, NH_4^+) relativamente no tóxico.⁵

El método tradicional de determinación de nitrógeno total es el método Kjeldahl, el cual mantiene su vigencia en la actualidad, a pesar de que data de hace casi 130 años, ya que fue en 1883 que el químico danés Johan Kjeldahl presentó por primera vez en la Danish Chemical Society un método para la determinación de lo que se conoce como *nitrógeno Kjeldahl*, que proporciona el contenido de nitrógeno orgánico más nitrógeno amoniacal de una muestra.⁶⁻⁷

La determinación de nitrógeno total por este método aún hoy en día es uno de los más utilizados en el análisis químico. Es la técnica más versátil para el análisis de nitrógeno. De hecho, es el único método que puede ser usado para el análisis del contenido de nitrógeno en muestras con elevada diversidad. Su universalidad, veracidad y precisión ha hecho que sea un método internacionalmente reconocido para la determinación de nitrógeno total y del contenido de proteína en alimentos. Es el método estándar contra el cual todos los demás métodos deben ser comparados y está aceptado por numerosas e importantes organizaciones internacionales.⁸⁻¹⁰ No requiere de equipamiento sofisticado y se adapta con facilidad a los análisis de rutina de un gran número de muestras, con diferentes matrices.

Kirk¹¹ considera que el descubrimiento de Kjeldahl que dio lugar al método de determinación de nitrógeno así nombrado, es uno de los acontecimientos relevantes en la Química. Este método ha tenido más modificaciones y aplicaciones, quizás, que cualquier otro tipo de método analítico, y ha dado lugar a más de 1500 publicaciones.¹²

Con el desarrollo tecnológico y científico han surgido diferentes formas de determinación de nitrógeno, en diferentes matrices, pero en todos los casos, el método de referencia para su validación antes de implementarlas, es el método Kjeldahl.¹³⁻¹⁴ Los resultados obtenidos por este método se han utilizado para calibrar los métodos automáticos. D'Elia, en 1983, refirió “...los cambios más significativos en la práctica de la determinación de nitrógeno han resultado no tanto de la expansión del empleo de este método, sino de la expansión de su aceptación en la mejora de sistemas automatizados...”¹⁵

Dentro de las modificaciones del método Kjeldahl están aquellas que han introducido cambios para hacerlo tecnológico y ambientalmente más seguro. Este es el caso de la Norma Mexicana NMX-AA-026-SCFI-2010,¹⁶ que utiliza mineralización con sulfato de potasio y la modificación con tiosulfato de sodio, la cual es más adecuada que la propuesta por la norma ISO 5663:1984,¹⁰ que emplea mineralización con selenio.

El nitrógeno total Kjeldahl es definido como la suma de amonio libre y compuestos orgánicos nitrogenados que son convertidos a sulfato de amonio, después de la digestión de la muestra con ácido sulfúrico y en presencia de un catalizador. El amonio es destilado en medio alcalino y recuperado nuevamente para su cuantificación.

De acuerdo con ello, hay que diferenciar entre nitrógeno total Kjeldahl (NTK, que comprende el nitrógeno orgánico y el amoniacal) y el nitrógeno total (NT), que abarca el NTK, además de los nitritos y los nitratos, como formas oxidadas del nitrógeno.

El método Kjeldahl no es aplicable a muchos compuestos orgánicos nitrogenados, debido a la conversión incompleta del nitrógeno en amoníaco, como es el caso de los nitritos y nitratos, sin embargo, produce resultados exactos cuando se aplica a muestras que contienen nitrógeno orgánico (incluyendo las proteínas) y nitrógeno amoniacal.¹⁷ Los métodos colorimétricos se encuentran entre los más usados para determinar nitritos y nitratos.⁷

La norma cubana de vertimiento de aguas residuales a las aguas terrestres y al alcantarillado establece límites máximos permisibles promedios (LMPP) para estos vertimientos.¹⁸ Para los LMPP que se establecen cuando los vertimientos se realicen a las aguas terrestres (cuerpos de agua o infiltración al subsuelo) se tienen en cuenta tres clasificaciones (A, B y C), dependiendo del uso que se le dé a dichas aguas, decreciendo en ese mismo orden la exigencia de los límites.

Entre los indicadores que es preciso analizar en estos casos, se exige que la determinación de nitrógeno total, se realice mediante el método Kjeldahl. Cuando estos cuerpos de agua se han clasificado como Clase A (acción que corresponde al organismo rector de las aguas terrestres, Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos), el LMPP correspondiente al contenido de nitrógeno total es de 5 mg/L, valor que coincide con el límite de cuantificación (LC) del método Kjeldahl según establecen los métodos normalizados de la American Public Health Association (APHA)⁸ considerados la referencia fundamental en estos métodos. Esta coincidencia entre el LMPP y el LC del método puede resultar riesgosa, ya que todo resultado analítico tiene una variabilidad asociada.

Esta situación cobra mayor importancia, al considerar que los resultados que emite un laboratorio que analiza indicadores medioambientales, por lo regular se emplean para compararlos con valores de normativas, y demostrar su cumplimiento ante las autoridades pertinentes. De esta forma, puede darse el caso de que, cuando se compare el resultado del laboratorio con el LMPP de la norma, no pueda precisarse si se cumple o no el mismo. De acuerdo con ello, los laboratorios se verían precisados a emplear diferentes alternativas con el objetivo de la cuantificación confiable de concentraciones inferiores al LC del método.

Con la aparición de los electrodos selectivos ha sido posible la determinación de nitrógeno amoniacal mediante este método electrométrico, rápido, sencillo y confiable, que posee además la ventaja de tener un LC inferior al del método Kjeldahl, ya que pueden ser medidas concentraciones inferiores a 5 mg N/L en aguas potables, superficiales y en aguas residuales domésticas e industriales.¹⁹ No obstante, este equipamiento requiere de una inversión inicial mayor que la del método Kjeldahl tradicional.

Otro de los aspectos importantes en este tipo de análisis, es la selección del material de referencia (MR) y su estabilidad. En este método se emplean frecuentemente, con este fin, urea, lisina, ácido nicotínico y albúmina bovina. La utilización de los MR resulta imprescindible para el control de la veracidad del método analítico y para el método de adición de estándares, debido a que previamente se conoce el contenido del analito presente, aunque siempre es necesario precisar, previamente, la estabilidad del MR con el tiempo.²⁰

En el presente trabajo se realiza, una valoración de la problemática de la determinación de nitrógeno total y amoniacal en aguas residuales, teniendo en cuenta los límites máximos permisibles de la Norma Cubana de Vertimiento de Aguas Residuales y los límites de cuantificación de los métodos analíticos objeto de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo de nitrógeno total por el método Kjeldahl (N_{total} Kjeldahl)

Determinación de nitrógeno total (N_{total})

Se aplicó el método macro-Kjeldahl, según se describe en el método normalizado.⁸

Verificación de la precisión y la veracidad

Para el establecimiento de la precisión y de la veracidad se diseñaron experimentos en que se analizaron, al menos, siete réplicas de cada una de las concentraciones con los MR empleados.

La precisión fue determinada como repetibilidad y se realizaron las réplicas por un mismo analista, con el mismo equipamiento, en el mismo día. Los propios resultados se emplearon para la verificación de la veracidad, al compararse cada valor hallado con el valor real del MR.

Aplicación del método de adición de estándares múltiples para la determinación de concentraciones de nitrógeno total inferiores a 10 mg/L

Estudio de estabilidad de la albúmina bovina empleada como MR. Se prepararon disoluciones de albúmina bovina, las cuales fueron dispensadas en viales y congeladas a -5°C . Se analizaron diariamente durante 15 d.

Adición de estándares múltiples Se tomaron cuatro volúmenes iguales de aguas residuales porcinas, y se añadieron cantidades conocidas y diferentes del MR de albúmina bovina.

Finalmente, todas se diluyeron al mismo volumen.

Seguidamente, se aplicó el método Kjeldahl para todas esas disoluciones. Las concentraciones de MR añadidas se representaron en un gráfico en el eje xy las concentraciones halladas en el eje y . Con la recta de regresión calculada la concentración de la muestra se puede deducir por extrapolación.

Empleo del método de electrodo selectivo de amonio para la determinación de nitrógeno amoniacal (N_{am}). Comparación con el método Kjeldahl

Determinación de nitrógeno amoniacal (N_{am}) mediante el método Kjeldahl: Se aplicó el método macro-Kjeldahl, según se describe en el método normalizado.⁸

Determinación de nitrógeno amoniacal (N_{am}) mediante el método del electrodo selectivo de amonio (ESA): Se aplicó el método descrito por APHA,¹⁹ empleando un pH metro/ionómetro Orion 720 A, con un ESA de la misma firma comercial.²¹ Para la concentración de 0,2 mg N_{am}/L se utilizó una curva patrón no convencional, similar a un método de adición de estándar, en el intervalo de 0,01-0,49 mg N_{am}/L para, de esta forma, garantizar la mayor sensibilidad del método a estas concentraciones.²²

La precisión y la veracidad se determinaron de la misma forma que para el método de N_{total} .

Materiales de referencia

Material de referencia para N_{total} Albúmina bovina con un contenido proteico de 96 %, que representa un 15,1 % de nitrógeno orgánico.

Material de referencia para N_{am} Cloruro de amonio (NH_4Cl , Merck; pureza: 98 %). Se siguieron las indicaciones dadas por APHA.¹⁹ Se preparó una disolución de reserva de 1000 mg N_{am}/L , a partir de la cual se prepararon cuatro concentraciones diferentes de N_{am} (0,2, 5, 10 y 20 mg N_{am}/L) para aplicarle las metodologías analíticas.

Se probó la estabilidad en el tiempo de los MR, mediante un estudio de reproducibilidad, mediante un gráfico de control de la media, según se ha descrito por Suárez y cols.²³

Los medios de medición utilizados se encontraban calibrados/verificados por el INIMET.

Procesamiento Estadístico

Se empleó el programa de computación Excel 2010 y el paquete de programas estadísticos Statgraphic Centurion XV, 2007. Se calculó la media (\bar{X}), la desviación estándar (DE) y la desviación típica relativa o coeficiente de variación (CV, %), este último se empleó como indicador de la precisión. El sesgo y el porcentaje de recobrado (Rec., %) se calcularon como indicadores de la veracidad.

Además, se halló el intervalo de valores del sesgo para cada concentración estudiada, con el objetivo de establecer su significación, de acuerdo con los criterios establecidos en ISO 5725:1994.²⁴

Para la detección de posibles valores fuera de límites se utilizó la dócima de Grubbs y se aplicaron aplicando las reglas descritas en documentos normalizativos.²⁴ se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA), para la comparación de los resultados con el objetivo de determinar si existían diferencias significativas entre sus medias y el análisis de regresión lineal para hallar el valor de las muestras, mediante extrapolación, en el método de adición de estándares múltiples.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Empleo de la albúmina bovina como material de referencia (MR) para el método de N_{total} Kjeldahl

Las pruebas preliminares de la posibilidad de uso de la albúmina bovina como material de referencia para el control de la prueba de reproducibilidad en la determinación de N_{total} Kjeldahl, demostraron que era factible su aplicación, cuando se preservaba en congelación en alícuotas de 1,5 mL, las cuales se descongelaban antes de su utilización y se desechaban el resto una vez terminado el análisis, en el día.

Al analizar los resultados obtenidos en la prueba de reproducibilidad (20 mg N_{total}/L), se pudo observar (Fig. 1) que para la concentración empleada en esta experiencia, es perfectamente factible la utilización de este material de referencia hasta los 13 d de preparado, ya que los resultados de las medias de las determinaciones diarias se encontraron dentro de los límites de ± 2 DE, considerados como límites de advertencia, según se establece en los métodos normalizados,⁷ lo que había sido utilizado con anterioridad en el laboratorio para la evaluación de estudios de estabilidad de MR.²⁵

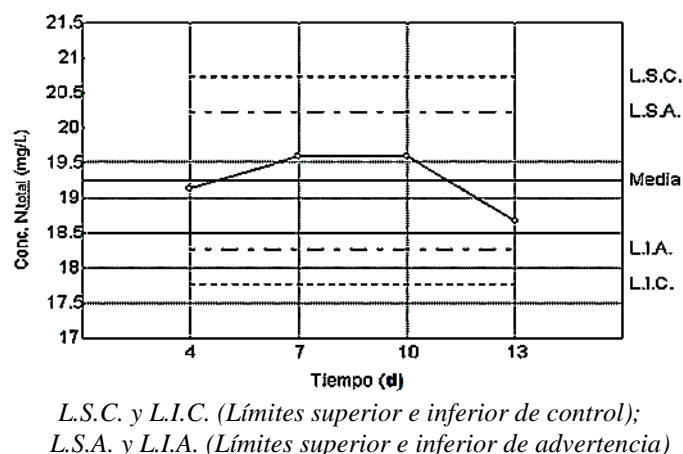


Fig.1. Gráfico de control para el estudio de la estabilidad de la albúmina bovina empleada como material de referencia en el método de N_{total} Kjeldahl

Verificación del método de N_{total} Kjeldahl

Aunque en la norma NC ISO/IEC 17025: 2006²⁶ (que establece la competencia técnica de los laboratorios) se especifica que, el laboratorio no necesita realizar una validación del método de ensayo si utiliza un método normalizado y puede emplear, a los efectos del aseguramiento de la calidad de los resultados analíticos, los indicadores de calidad que tenga el método normalizado, resulta conveniente que el laboratorio establezca sus propios criterios de aceptación de los dos indicadores fundamentales de calidad analítica; es decir, precisión y veracidad, los cuales se realizan mediante una verificación del método.

Los resultados de la verificación del método Kjeldahl (intervalo de concentraciones 0,2 a 100 mg/L), en lo referente a la precisión, dieron como resultado que la variabilidad observada en las mediciones realizadas, fueron superiores para valores de 0,2 y 5 mg N_{total} /L, siendo el caso más crítico, la concentración de 0,2 mg N_{total} /L (Tabla 1). Teniendo en cuenta que en el aseguramiento de la calidad de los resultados, el laboratorio ha establecido en un 10 % el coeficiente de variación máximo permisible (CVMP) para este método de ensayo, las concentraciones de 0,2 y 5 mg/L no tuvieron valores aceptables de precisión, ya que arrojaron resultados muy superiores a este valor (Fig. 2). Es necesario considerar que, en diferentes trabajos²⁷⁻²⁹ se reporta que la precisión del método es variable, llegando a obtenerse coeficientes de variación de hasta 30,5 % para N_{total} , por lo cual no resulta desacertado considerar como CVMP un valor de 10 %.

Tabla 1. Resultados de la verificación del método de N_{total} Kjeldahl empleando albúmina bovina como material de referencia

	Concentración teórica (mg/L)							
	0,20	5,00	10,00	20,00	40,00	60,00	80,00	100,00
Precisión								
\bar{X} , (mg/L)	1,68	4,03	10,20	19,88	40,02	58,98	79,84	98,12
D.E. (mg/L)	1,17	0,76	0,69	0,62	0,62	1,10	0,70	2,23
C.V. (%)	69,64	18,86	6,76	3,12	1,55	1,87	0,88	2,27
Veracidad								
Recobrado (%)	840,00	80,60	102,00	99,40	100,05	98,30	99,80	98,12
Sesgo (mg/L)	1,48	-0,97	0,20	-0,12	0,02	-1,02	-0,16	-1,88
Significación sesgo	Sí	Sí	No	No	No	No	No	No

D.E. Desviación estándar. C.V. Coeficiente de variación.

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede establecer que el LC para este método, en las condiciones del laboratorio, resulta 10 mg/L, lo cual difiere de lo señalado por APHA,⁸ que reporta 5 mg/L como el LC para el N_{total} Kjeldahl (Fig. 2).

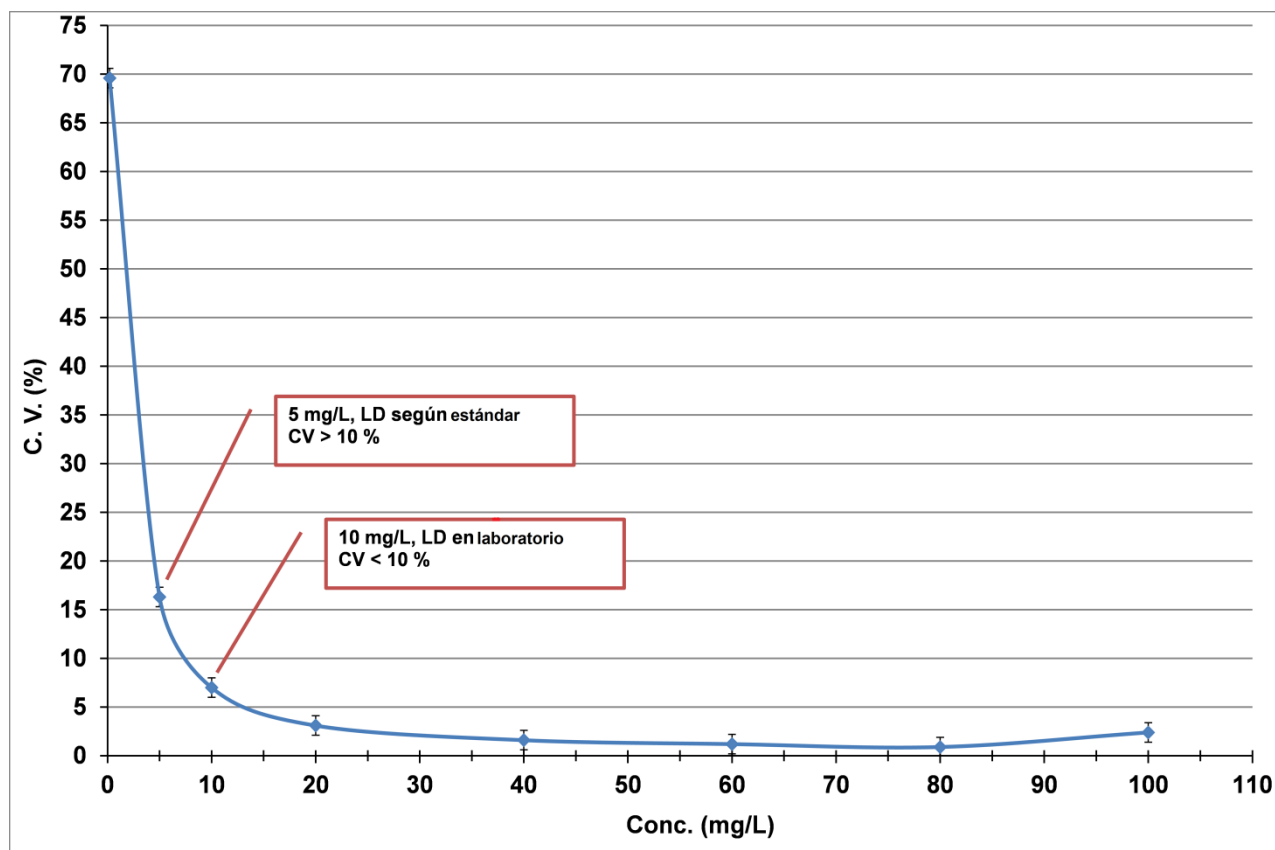


Fig.2. Gráfico de coeficiente de variación (CV, %) experimental para la evaluación de la precisión del N_{total} Kjeldahl, según las condiciones del laboratorio, en el intervalo de concentraciones estudiado.

Al evaluar la veracidad (Tabla 1), como sesgo (absoluto y relativo) y porcentaje de recobrado, resaltó que el valor obtenido de la media, (\bar{X}) para la concentración de 0,2 mg N_{total} /L, fue ostensiblemente superior (más de ocho veces) al valor teórico (Tabla 1).

El análisis de los valores de sesgo indicó de qué forma y en qué medida los valores obtenidos son mayores o menores que el valor teórico. Si se analiza los valores del sesgo (Tabla 1) para la concentración de 0,2 mg N_{total} /L la media de los valores estimados son superiores (valores positivos) que el valor teórico, con un sesgo significativo y un recobrado de 840% (es decir, más de ocho veces superior a la concentración real. De la misma forma, los resultados obtenidos con la concentración de 5 mg/L tampoco fueron aceptables. En ambos casos, debe tenerse en cuenta que el sesgo no debe ser significativo (o sea, que no haya presencia de errores sistemáticos) y que los valores aceptables de recobrado deben encontrarse en el intervalo de 93 a 107 % (Fig. 3).

Teniendo en cuenta que la precisión y la veracidad son indicadores de calidad analítica imprescindibles, y conjugando los resultados obtenidos, se puede inferir que el método estudiado presentó menor exactitud (conjugación de la precisión y la veracidad)³⁰ para las concentraciones de 0,2 y 5 N_{total} /L, siendo el caso más crítico la concentración de 0,2 mg N_{total} /L (Tabla 1).

Relacionando los resultados de precisión y veracidad se pudo establecer la concentración de 10 mg/L como el LC o la menor concentración que es posible determinar con valores aceptables de precisión y veracidad.

Este LC en las condiciones del laboratorio (10 mg/L) concordó con lo reportado por Monras y cols. en un estudio de validación del método de N-Kjeldahl en aguas residuales, trabajando incluso con un equipamiento con cierto grado de automatización.²⁹

Al ser superior el LC del N_{total} Kjeldahl en el laboratorio al LMPP establecido por la norma cubana de vertimiento de aguas residuales¹⁸ en los casos de vertimientos a cuerpos de agua o infiltración al subsuelo de clase A, el laboratorio se vería precisado a establecer otras alternativas de medición, con el objetivo de lograr resultados confiables y poder

determinar el cumplimiento o no de esta normatividad. En este caso, se optó por la conocida técnica de adición de estándar para lograr establecer el valor de la concentración de la muestra, con una adecuada confiabilidad, cuando este fuera inferior a 10 mg/L.

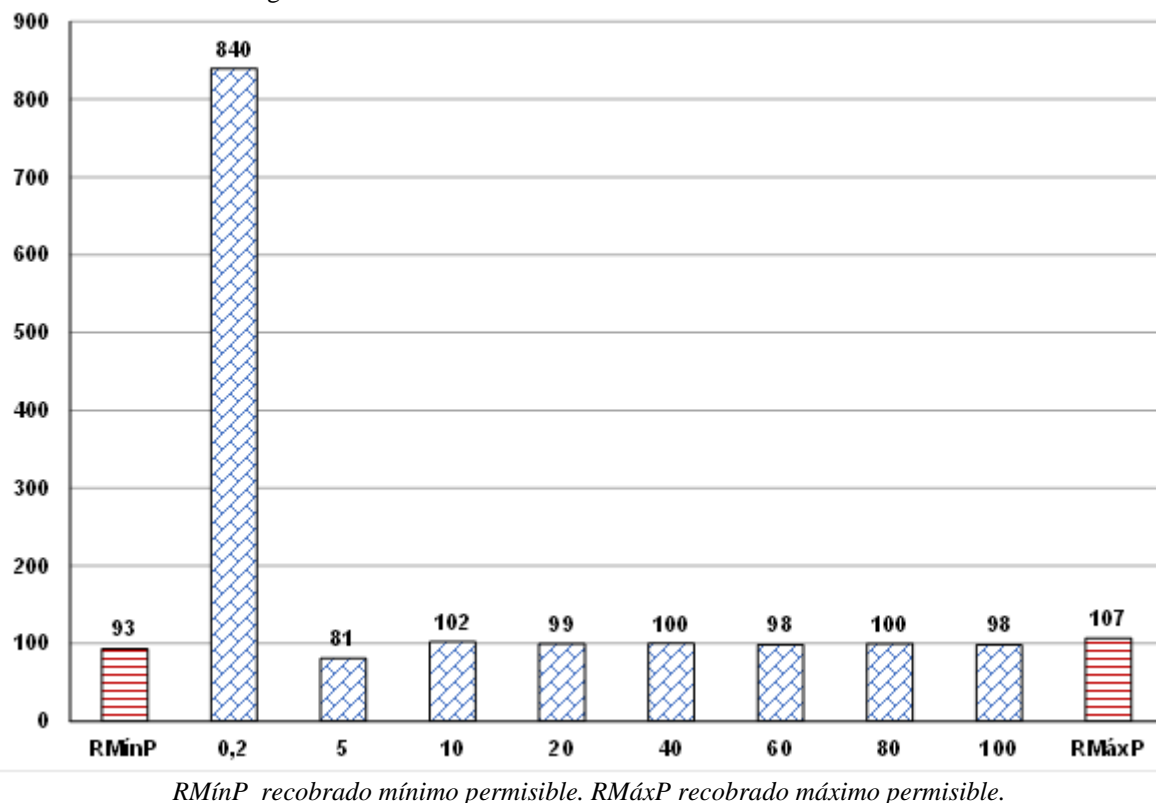


Fig.3. Comparación de los porcentajes de recobrado obtenidos en la verificación del método de N_{total} Kjeldahl, con el intervalo permisible de los valores de recobrado establecidos en el laboratorio.

Aplicación del método de adición de estándares múltiples para concentraciones inferiores de 10 mg N_{total} /L

En este estudio se aplicaron los métodos Kjeldahl normalizado y con adición de estándares múltiples en muestras de aguas residuales porcinas y empleando como material de referencia albúmina bovina (Tabla 2). Se escogió el agua residual porcina, dada su matriz compleja, como forma de imponer condiciones extremas al estudio.

Tabla 2. Comparación del método Kjeldahl normalizado y con adición de estándares múltiples a dos niveles de concentración, con aguas residuales porcinas y albúmina bovina como MR

Método Kjeldahl			Método Kjeldahl con adición de estándares múltiples	
Concentración Teórica (mg/L)	Hallada (mg/L)	Recobrado (%)	Concentración hallada (mg/L)	Recobrado (%)
2,9	3,5	120	2,93	101
6,0	3,5	58	5,88	98

Mediante la regresión lineal de los resultados de las adiciones de estándares múltiples se obtuvieron las concentraciones reales de aquellas muestras, las que fueron inferiores a 10 mg/L. (Fig. 4). El intercepto (0 adición) correspondió al valor real de la muestra.

Se obtuvieron porcentajes de recobrados adecuados en el método de adición de estándares múltiples con respecto al método normalizado que no tuvo ese desempeño (Tabla 2). Se observa que en el método de adición de estándares múltiples se encontró una correspondencia lineal entre las concentraciones añadidas y el valor teórico, ya que los coeficientes de correlación fueron elevados para las concentraciones determinadas (2,9 y 6,0 mg N_{total} /L) (Fig. 4).

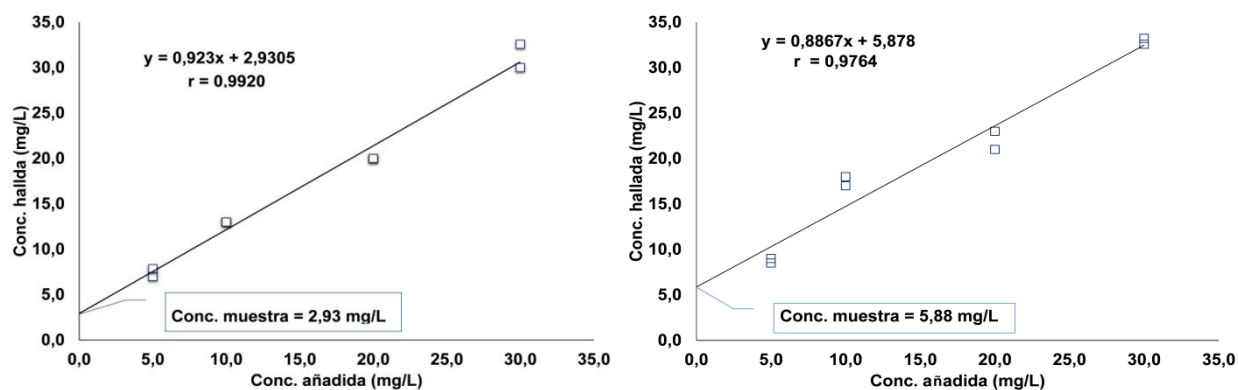


Fig.4. Prueba de adición de estándares múltiples en el ensayo de N_{total} Kjeldahl, para dos concentraciones (izquierda: 2,9 mg/L; derecha: 6,0 mg/L).

De acuerdo con los resultados anteriores se puede resumir que el método de adición de estándares múltiples sería una herramienta adecuada para el análisis de muestras de aguas residuales con concentraciones inferiores a 10 mg N_{total} /L. Por otra parte, el hecho también permite corroborar la aplicabilidad de los resultados en muestras de matrices complejas como lo constituye el agua residual porcina. Con el empleo de la adición de estándares múltiples para concentraciones de N_{total} Kjeldahl menores a 10 mg/L, el laboratorio podría ofrecer resultados muy marcadamente confiables. Sin embargo, debe considerar los costos de esta variante si lo introduce dentro de los servicios que oferta.

Comparación de los métodos de nitrógeno amoniacal (Nam) Kjeldahl y Electrodo Selectivo de Amonio (ESA)

Ahora bien, en ocasiones se necesita solamente determinar el contenido de nitrógeno amoniacal (por ej. para el monitoreo de este indicador), pudiendo emplearse en este caso, el método del ESA, si las concentraciones fuesen inferiores al LC del método Kjeldahl, como una alternativa adicional a la opción de adición de estándares múltiples analizada anteriormente y si se cuenta con este tipo de equipamiento. El método del ESA resulta rápido y confiable, requiere menores volúmenes de muestra y contando con un LC apreciablemente inferior al del método Kjeldahl.¹⁹ Los resultados obtenidos al realizar las determinaciones de N_{am} en material de referencia mediante los métodos Kjeldahl y ESA (Tabla 3) mostraron que las medias obtenidas con el método del ESA fueron siempre superiores que aquellas obtenidas con el método Kjeldahl, excepto para la concentración de 0,2 mg/L, y lo que probablemente sea debido al enorme error que existe cuando se aplica este método para determinar concentraciones iguales o inferiores a esta. Al comparar, mediante un análisis de varianza (ANOVA), las medias obtenidas por los dos métodos, se observó que para las concentraciones de 20 y 10 mg/L no se encontraron diferencias significativas entre ambos (última fila Tabla 3 y Fig. 5, izquierda), pero para las concentraciones de 5 y 0,2 mg/L (última fila Tabla 3 y Fig. 5, derecha) las diferencias entre ambos métodos fueron estadísticamente significativas (95 % de confianza), teniendo en cuenta que dichas concentraciones eran inferiores al LC del método Kjeldahl establecido en el laboratorio.

Tabla 3. Resultados del estudio de la precisión en la determinación de nitrógeno amoniacal (N_{am}) mediante los métodos de N_{am} Kjeldahl y electrodo selectivo de amonio a diferentes concentraciones, empleando como MR cloruro de amonio

	Precisión							
	ESA_20	KJ_20	ESA_10	KJ_10	ESA_5	KJ_5	ESA_0,2	KJ_0,2
Media	20,27	19,00	10,20	9,63	4,94	3,60	0,16	1,80
DE	0,43	0,75	0,22	0,96	0,16	0,75	0,01	0,68
CV%	2,03	3,94	1,92	9,97	3,16	20,78	6,29	37,95
ANOVA	a	a	b	b	c	d	e	f

ESA Electrodo Selectivo de Amonio. KJ Kjeldahl. 20, 10, 5 y 0,2 Concentraciones en mg/L. ANOVA Resultados de la comparación de medias mediante el Análisis de Varianza (95 %). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre las medias comparadas.

Las precisiones (expresadas como CV, %) del ESA estuvieron en el mismo orden de las reportadas por Molins y cols. Acorde con los valores referidos en APHA, en 1998¹⁹. En todos los casos, la precisión fue mejor para el método del ESA que para el Kjeldahl (Tabla 3). Para este último método, a partir de concentraciones de 10 mg/L y menores, la precisión decae sensiblemente, siendo el caso más crítico la concentración de 0,2 mg/L (Fig. 6).

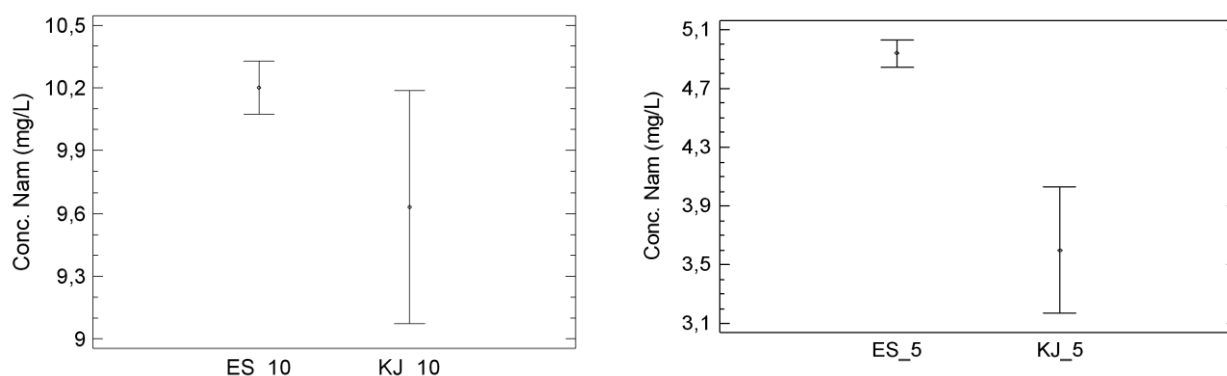


Fig. 5. Gráfico de comparación de medias de la concentración de N_{am} determinada por los métodos Kjeldahl (Kj) y Electrodo Selectivo de Amonio (ESA). Concentraciones 10 mg/L (izquierda) y 5 mg/L (derecha).

Las precisiones (expresadas como CV, %) del ESA estuvieron en el mismo orden de las reportadas por Molins y cols. Acorde con los valores referidos en APHA, en 1998¹⁹. En todos los casos, la precisión fue mejor para el método del ESA que para el Kjeldahl (Tabla 3). Para este último método, a partir de concentraciones de 10 mg/L y menores, la precisión decae sensiblemente, siendo el caso más crítico la concentración de 0,2 mg/L (Fig. 6). En el método de ESA la precisión se mantiene entre los valores referidos por la literatura para estas pruebas.¹ Para concentraciones iguales o inferiores a 10 mg N_{am} /L, en la metodología Kjeldahl, la precisión disminuye significativamente, de manera que se sugiere tener en cuenta estos resultados para posibles aplicaciones de esta metodología a muestras que se encuentren en este intervalo de concentración. Como medidas de la veracidad de ambos métodos analíticos se estimaron el recobrado (%) y el sesgo (mg/L). se determinó si este último era significativo o no (Tabla 4), teniendo en cuenta los criterios dados por la norma ISO 5725.²⁴

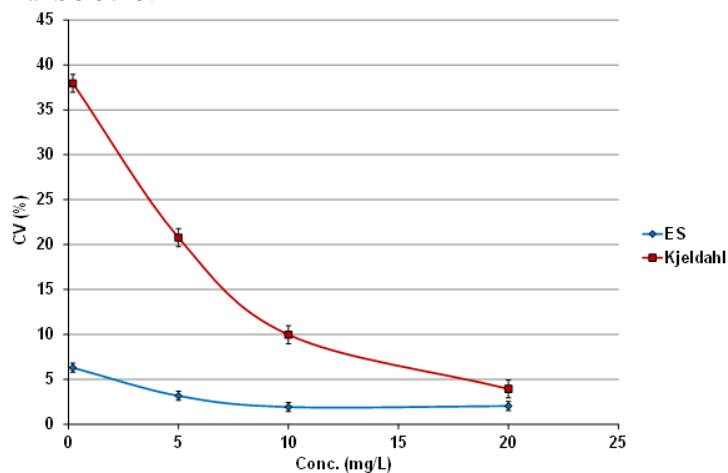


Fig. 6. Comparación de la precisión (CV, %) en los ensayos de N_{am} Kjeldahl y Electrodo Selectivo de Amonio (ESA), a diferentes concentraciones (0,2 a 20 mg/L).

Se pudo observar que en el intervalo de concentraciones estudiado, el método del ESA mostró recobrados aceptables y dentro del intervalo (93–107 %) establecido en el aseguramiento de la calidad del laboratorio, mientras que el método Kjeldahl solo tuvo recobrados aceptables para concentraciones de 20 y 10 mg/L, lo que concordó con lo encontrado para el método de N_{total} Kjeldahl (Tabla 1). Para valores inferiores a 10 mg/L y hasta 0,2 mg/L, el método Kjeldahl no registró recobrados aceptables. En todos los casos el ESA tuvo recobrados más cercanos al óptimo (100 %). De nuevo, el nivel de concentración de 0,2 mg/L resultó el más crítico, especialmente para el método Kjeldahl, lo cual concordó con lo reportado en la norma de referencia,¹⁹ de que este método es aplicable a concentraciones superiores a 5 mg/L. Este efecto se agudiza, por supuesto, en la concentración de 0,2 mg/L, en que el método

Kjeldahl mostró recobrados del orden de 900 %. Si se analizan los valores del sesgo en ambos métodos, para la concentración de 20 mg/L, se puede inferir que en el caso del ESA, la media de los valores estimados son superiores (valor positivo) en 0,27 mg/L del valor teórico; mientras que para el método Kjeldahl, esta media resulta inferior (signo negativo) al valor teórico en 1,00 mg/L. Siguiendo este mismo análisis, para las demás concentraciones, se puede observar que el método Kjeldahl siempre subestima los valores, excepto para el caso en que la concentración es 0,2 mg/L, en este último caso debido al enorme deterioro de la veracidad a esta concentración.

Los gráficos de comparación de las medias de los recobrados de ambos métodos (Fig. 7) para las concentraciones extremas estudiadas muestran que siempre se observaron diferencias significativas en los recobrados correspondientes a ambos métodos analíticos y que la variabilidad en este indicador de calidad analítica siempre fue menor en el método del ES.

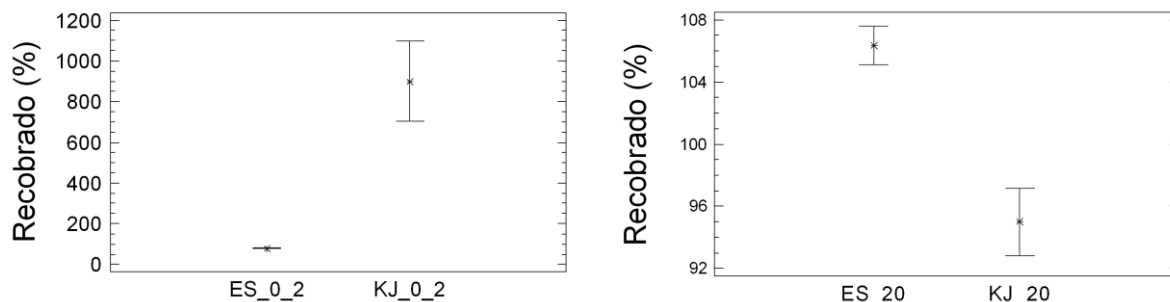


Fig. 7. Gráfico de comparación de los recobrados promedio de N_{am} determinados por los métodos Kjeldahl y ESA

Se demostró que el sesgo no fue significativo para ambos métodos en las concentraciones de 20 y 10 mg/L (Tabla 4). Ya en la concentración de 5 mg/L el sesgo del método Kjeldahl fue significativo, pero no lo fue para el ESA. Por último, en el caso de la menor concentración estudiada (0,2 mg/L) el sesgo fue significativo para ambos métodos. Es decir, que esa concentración resultó crítica aún para el método del ESA. Este hecho concuerda con lo reportado por Molins y cols.,⁵ quienes establecieron como LC del ESA, en aguas residuales, una concentración de 1,6 mg/L. De acuerdo con estos resultados, el laboratorio debe considerar su LC del método del ESA como 5 mg/L.

Tabla 4. Resultados del estudio de la veracidad en la determinación de nitrógeno amoniacal (N_{am}) mediante los métodos de N_{am} Kjeldahl y Electrodo Selectivo de Amonio, a diferentes concentraciones, empleando como MR Cloruro de Amonio.

Veracidad	ESA_20	KJ_20	ESA_10	KJ_10	ESA_5	KJ_5	ESA_0,2	KJ_0,2
Recobrado %	101,4	95,0	102,0	96,3	98,8	72,0	99,8	900,0
Sesgo promedio	0,27	-1,00	0,20	-0,37	-0,06	-1,40	-0,04	1,60
Sesgo significativo	No	No	No	No	No	Sí	Sí	Sí

ESA Electrodo Selectivo de Amonio. KJ Kjeldahl. 20, 10, 5 y 0,2 Concentraciones en mg/L.

Es decir, que tanto para el N_{total} como para el N_{am} , determinados por el método Kjeldahl, el LC del método establecido en las condiciones del laboratorio resultó 10 mg/L, el cual debe tenerse en cuenta para aplicar una u otra de las alternativas analíticas estudiadas, concordando con lo reportado por Molins y cols.,⁵ de que este debe ser el criterio principal para la elección del método analítico de un determinado indicador

CONCLUSIONES

La verificación del método Kjeldahl para la determinación de N_{total} , en las condiciones de laboratorio, demostró que es posible la determinación confiable, con precisión y veracidad adecuados, de concentraciones iguales o superiores a 10 mg/L. La aplicación de la adición de estándares múltiples en el método Kjeldahl resultó adecuada para la determinación de las concentraciones inferiores a 10 mg N_{total} /L, aunque debe tenerse en cuenta que ello aumenta el costo de este ensayo. El método del electrodo selectivo de amonio, en el intervalo de concentraciones estudiado (0,2 a 20 mg N_{am} /L), es otra de las alternativas para cuantificar concentraciones inferiores a 10 mg N_{am} /L, asimismo el LC del laboratorio para este método es de 5 mg/L. Los resultados de la veracidad, en correspondencia con el análisis de la precisión, indican que concentración iguales o inferiores a 10 mg N/L deben tenerse en cuenta para la aplicación de una u otra de las alternativas analíticas estudiadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thomas O and Theraulaz F. Aggregate Organic Constituents. In: UV-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater. Chapter 4. Thomas O. and Burgess C., (eds.). Ciudad: Elsevier; 89-114, 2007:
2. Simonet BM, Lendl B and Valcárcel M. Method-defined parameters: measurands sometimes forgotten. *Trends Anal Chem.* 2006; 25(5): 520-527;
3. Deutsches Institut für Normung German standard methods for the examination of water, wastewater and sludge. DIN, Berlin; Beuth Verlag GmbH; 2011.
4. Sawyer CN, McCarty P, Parkin GF and De García A. Química para ingeniería ambiental, Bogotá; McGraw-Hill; 2001, 658:
5. Molins-Legua C, Meseguer-Lloret S, Moliner-Martínez Y and Campíns-Falco P. A guide for selecting the most appropriate method for ammonium determination in water analysis. *Trends Anal. Chem.*, 25(3), 282, 2006.
6. Kjeldahl J. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Z Anal Chem.* 1883; 22: 366.
7. APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, Washington, DC: 20th Editorial 1550 4500-N. 1998:
8. APHA, AWWA, WEF. 4500-Norg B and 4500 NH₃ E Macro-Kjeldahl Method, In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. Washington, DC: 21th Editorial 4-103-4-111, 2005:
9. ASTM D3590-11 Standard Test Methods for Total Kjeldahl Nitrogen in Water. American Society for Testing and Materials, Philadelphia PA USA: ASTM Committee on Standards; 2011.
10. ISO 5663:1984 Water quality – Determination of Kjeldahl nitrogen – Method after mineralization with selenium. Geneva: International Standard Organization; 1984.
11. Kirk PL. Kjeldahl Method for Total Nitrogen. *Anal. Chem.* 1950; 22(2): 354-358,
12. Hach CC and Brayton SV. Primary Standards: The Basis for Accuracy in the Kjeldahl Protein Method. Technical Center for Applied Analytical Chemistry. Loveland Hach Company; 1-12, 2000:
13. Maher W, Krikowa F, Wruck D, Louie H, Nguyen T and Huang WY. Determination of total phosphorus and nitrogen in turbid waters by oxidation with alkaline potassium peroxodisulfate and low pressure microwave digestion, autoclave heating or the use of closed vessels in a hot water bath: comparison with Kjeldahl digestion. *Anal Chim Acta*, 2002; 463: 283-293,
14. Cruz Lugo L. Correlación del método Kjeldahl con el método de combustión Dumas automatizado para determinación de proteína en alimentos. Tesis. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México: 2007.
15. D'Elia CF. Nitrogen determination in seawater. In: Nitrogen in the Marine Environment. Carpenter, E.J., Capone, D.G. (eds.), México, DF Academic Press; 1983:731-762.
16. NMX-AA-026-SCFI-2010. Análisis de agua - medición de nitrógeno total Kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. México: Secretaría de Economía; 2010.
17. Möller J. Kjeldahl- still going strong. *In focus*; 2009; 33(1):14-16,
18. NC 27:2012. Vertimiento de Aguas Residuales a las Aguas Terrestres y al Alcantarillado. Especificaciones. ONN; La Habana, Cuba: 2012.
19. APHA, AWWA, WEF. 4500 NH₃ F&G. Ammonia Selective Electrode Method & Ammonia Selective Electrode Method with Standard Addition. In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, USA 21th Editorial: American Public Health Association; 4-138 - 4-140; 4-140 - 4-142. 2005:
20. NC ISO Guía 33:2000. Uso de los materiales de referencia certificados. ONN, Ciudad de La Habana, 2000.
21. Orion. Model 95-12. Ammonia Electrode. Instruction Manual. Orion. Laboratory Products Group. Bench Top pH/ISE Meter. Instruction Manual. USA. 1990.
22. Miller JN and Miller JC. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry 5th Edition, Prentice Hall. London Pearson Education Limited; 124-125, 2005.
23. Suárez M, Espinosa MC, Mayarí R, Rodríguez X., Ruíz M., Álvarez Y., Correa O., León Y. Experiencias en el desarrollo y aplicación de materiales de referencia en un laboratorio de análisis de aguas y aguas residuales. *Revista Cubana de Química.* 2005; XVII(5): 264,
24. NC ISO 5725-1:2005. Exactitud (Veracidad y Precisión) de Métodos de Medición y Resultados. Parte 1: Principios Generales y Definiciones. La Habana, Cuba: ONN.
25. Suárez Muñoz M. Experiencias en el desarrollo y aplicación de materiales de referencia en un laboratorio acreditado en la actividad medioambiental. Tesis en opción al título de Máster en Ciencias Químicas. Universidad de La Habana, Cuba: 2004.
26. NC ISO/IEC 17025: 2006. Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración. [ISO/ IEC 17025:2005 + corrigendum técnico 1: 2006 [traducción certificada], IDT]; La Habana: ONN

27. Ekedahl G, Junker P and Rönndell B. Interlaboratory study of methods for chemical analysis of water. *J Water Pollut Contr Fed.* 1975 47: 858–866,
28. Rus DL, Patton CJ, Mueller DK and Crawford CG Assessing total nitrogen in surface-water samples--precision and bias of analytical and computational methods. *USGS Scientific Investigations Report*: 2012: 2012-5281.
29. Monras M., Margarit L., Blanco M. J. and Pecanins D. Validación del procedimiento de análisis de N-Kjeldahl en aguas residuales con el destilador automático PN 1430 Selecta. *Revista Técnicas de Laboratorio.* 2003;25(284): 670-675,
30. OIMLJCGM 200:2008. Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP, Comité conjunto para las guías en Metrología. 1ª edición en español. BIPM Ginebra: Buró Internacional de Pesas y Medidas; 2008.