

**VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE:  
DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGENO (DBO<sub>5</sub>), SULFATOS Y NITRATOS EN  
AGUAS SUPERFICIALES EN EL LABORATORIO AMBIENTAL DE LA CRC**

**WILLIAM ALBERTO CISNEROS ORDOÑEZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2006**

**PREVALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN  
DE: DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGENO (DBO<sub>5</sub>), SULFATOS Y NITRATOS  
EN AGUAS SUPERFICIALES EN EL LABORATORIO AMBIENTAL DE LA CRC**

**WILLIAM ALBERTO CISNEROS ORDOÑEZ**

**Trabajo de grado en Modalidad de Pasantía presentado como requisito  
parcial para optar al título de Químico**

**Directora. M.Sc. ISABEL BRAVO R.  
Codirector Qco. DIEGO ZULUAGA. (C.R.C).**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2006**

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

---

---

**Directora**  
**MSc. ISABEL BRAVO REALPE**

---

**Jurado**  
**MSc. Alexander Erazo**

---

**Jurado**  
**MSc. Fernando Hernandez Blanco**

**Fecha de sustentación: Popayán, 15 de Agosto de 2006**

## DEDICATORIA

***Hoy al concluir esta importante etapa de mi vida y prepararme para enfrentar una nueva, deseo dedicar este trabajo a mis padres, quienes con su amor, esfuerzo y devoción fueron los principales gestores de mi triunfo.***

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo se realiza en el Laboratorio Ambiental de la Corporación Autónoma Regional del Cauca (CRC), bajo la dirección de la profesora del Departamento de Química de la Universidad del Cauca, M.Sc. Isabel Bravo Realpe, y el Químico Diego Zuluaga, Jefe del Laboratorio Ambiental de la CRC. A quienes deseo expresar mi más sincero agradecimiento por su admirable labor de orientación y por los conocimientos compartidos mediante los cuales se logró la realización de este trabajo.

También deseo agradecer a todos los profesores del Departamento de Química por sus valiosas enseñanzas y su dedicación durante mi proceso de formación académica.

A los Jurados por su recepción y colaboración en el mismo.

A todos mis compañeros del Laboratorio Ambiental de la CRC por su amistad y apoyo profesional

A mis compañeros y amigos del programa de química de la Universidad del Cauca por su amistad y aportes durante mi permanencia en la Universidad.

A todas y cada una de las personas que de alguna forma colaboraron en la realización de este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a mi familia por su afecto y consejo en mí proceso de formación tanto personal como profesional.

A mis padres, hermanos y primos gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	<b>13</b>
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>14</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>3.1 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>17</b>
<b>3.2 OBJETIVO ESPECIFICO</b>	<b>17</b>
<b>4. FUNDAMENTO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE</b>	<b>18</b>
<b>4.1 QUÉ ES EL AGUA</b>	<b>18</b>
<b>4.2 PROPIEDADES FÍSICAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS DEL AGUA</b>	<b>18</b>
<b>4.2.1 Propiedades Físicas</b>	<b>18</b>
<b>4.2.2 Propiedades Químicas</b>	<b>19</b>
<b>4.2.3 Propiedades Bioquímicas</b>	<b>19</b>
<b>4.3 TIPOS DE AGUA</b>	<b>19</b>
<b>4.3.1 Agua Cruda</b>	<b>19</b>
<b>4.3.2 Aguas Naturales</b>	<b>20</b>
<b>4.3.3 Agua Potable</b>	<b>20</b>
<b>4.3.3.1 Fuentes de Agua Potable</b>	<b>20</b>
<b>4.3.3.2 Contaminantes en las Fuentes de Agua Potable</b>	<b>21</b>
<b>4.3.4 Aguas Residuales</b>	<b>21</b>
<b>4.4 CALIDAD DE AGUA</b>	<b>22</b>
<b>4.4.1 Norma de calidad de agua</b>	<b>23</b>
<b>4.4.2 Criterio de calidad de agua</b>	<b>23</b>
<b>4.4.3 Tratamiento</b>	<b>23</b>
<b>4.4.4 Indicadores de calidad del agua</b>	<b>23</b>
<b>4.4.5 Normas y criterios de calidad química del agua potable</b>	<b>24</b>
<b>4.5 DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGENO (DBO)</b>	<b>25</b>
<b>4.5.1 Principio</b>	<b>25</b>
<b>4.5.2 Interpretación con base al valor de DBO<sub>n</sub></b>	<b>26</b>
<b>4.5.3 Problemas en la Interpretación</b>	<b>27</b>
<b>4.5.4 Procedimientos para evaluar la DBO</b>	<b>28</b>
<b>4.6 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y SULFATOS</b>	<b>29</b>
<b>4.6.1 Principio</b>	<b>29</b>
<b>4.6.2 Análisis cuantitativo</b>	<b>31</b>
<b>4.7. DEFINICIONES DE PARÁMETROS A TENER EN CUENTA EN EL PROCESO DE ESTANDARIZACIÓN</b>	<b>32</b>

<b>4.7.1 Exactitud</b>	<b>32</b>
<b>4.7.2 Precisión</b>	<b>32</b>
<b>4.7.3 Limite de detección</b>	<b>32</b>
<b>4.7.4 Limite de Cuantificación</b>	<b>33</b>
<b>4.7.5 Linealidad</b>	<b>33</b>
<b>4.7.6 Sensibilidad</b>	<b>33</b>
<b>4.8 Pruebas Paramétricas</b>	<b>33</b>
<b>4.8.1 Análisis de varianza (ANOVA)</b>	<b>33</b>
<b>4.8.2 Prueba de Duncan</b>	<b>34</b>
<b>4.9 Pruebas No Paramétricas</b>	<b>34</b>
<b>4.9.1 Prueba de Kruskal-Wallis para comparar k muestras independientes</b>	<b>35</b>
<b>5. METODOLOGIA</b>	<b>36</b>
<b>5.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA</b>	<b>36</b>
<b>5.2 DOCUMENTACIÓN Y MONTAJE DE LAS METODOLOGÍAS</b>	<b>36</b>
<b>5.3 METODOLOGÍAS ANALÍTICAS SELECCIONADAS PARA LA VALIDACION DE LOS METODOS</b>	<b>36</b>
<b>5.3.1 Método para la medición de la DBO<sub>5</sub></b>	<b>38</b>
<b>5.3.1.1 Técnica Respirométrica</b>	<b>38</b>
<b>5.3.1.1.1 Preparación del agua de dilución</b>	<b>39</b>
<b>5.3.1.1.2 Preparación de la solución patrón de glucosa ácido glutámico</b>	<b>39</b>
<b>5.3.1.1.3 Determinación del Volumen de semilla de inóculo</b>	<b>39</b>
<b>5.3.1.1.4. Determinación del Volumen de Muestra</b>	<b>40</b>
<b>5.3.2 Método para determinar nitratos.</b>	<b>41</b>
<b>5.3.3 Método para determinar sulfato</b>	<b>42</b>
<b>5.4 VALIDACIÓN DE LOS METODOS</b>	<b>43</b>
<b>5.4.1 Diseño Experimental</b>	<b>43</b>
<b>5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>5.6 ELABORACIÓN Y PRESENTACIÓN DE DOCUMENTOS</b>	<b>44</b>
<b>5.6.1. Protocolo de validación</b>	<b>44</b>
<b>5.6.2. Carpeta de soporte</b>	<b>44</b>
<b>5.6.3. Parámetros de estandarización</b>	<b>44</b>
<b>6. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>6.1 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO RESPIROMÉTRICO PARA DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGENO (DBO<sub>5</sub>)</b>	<b>45</b>
<b>6.1.1 Determinación de la cantidad de semilla o inóculo</b>	<b>45</b>
<b>6.1.2 Evaluación del método Respirométrico en diferentes muestras de agua</b>	<b>51</b>
<b>6.1.2.1 Muestra del Río Ejido</b>	<b>51</b>
<b>6.1.2.2 Muestra del Vertimiento de Aguas Residuales Domesticas</b>	<b>52</b>

<b>6.1.3 Ensayo de agua de dilución para hallar límites de detección para la DBO</b>	<b>53</b>
<b>6.2 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINACIÓN DE NITRATOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA</b>	<b>55</b>
<b>6.2.1 Estandarización del método para determinación de Nitratos</b>	<b>55</b>
<b>6.2.2 Validación del método para la determinación de nitratos</b>	<b>68</b>
<b>6.3 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO TURBIDIMÉTRICO PARA DETERMINACIÓN DE SULFATOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA</b>	<b>70</b>
<b>6.3.1 Estandarización del método para determinación de Sulfatos</b>	<b>71</b>
<b>6.3.2 Validación del método para la determinación de Sulfatos</b>	<b>82</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>86</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>88</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>93</b>



## LISTA DE TABLAS

		<b>Pág.</b>
Tabla 1	Criterios para elementos y compuestos químicos, diferentes a los plaguicidas y otras sustancias, que al sobrepasar los valores establecidos tienen reconocido efecto adverso en la salud humana	24
Tabla 2	Criterios de calidad química para características con implicaciones de tipo económico o acción indirecta sobre la salud	25
Tabla 3	Factores de escala según volúmenes y DBO esperado	40
Tabla 4	Grupo Básico de muestras	43
Tabla 5	Tratamientos para definir el volumen de semilla de inóculo	45
Tabla 6	Valoración de la DBO <sub>5</sub> de Solución patrón con 2 mL de inóculo en función del tiempo	45
Tabla 7	Valoración de la DBO de la solución patrón valorado con 3 mL de inóculo en función del tiempo	46
Tabla 8	Valoración de la DBO de la solución patrón valorado con 8 mL de inóculo en función del tiempo	47
Tabla 9	Estadística de la Valoración de la DBO <sub>5</sub> de la solución patrón valorado con diferentes volúmenes de inóculo en función del tiempo	49
Tabla 10	Descriptivos. Demanda Bioquímica de Oxígeno (mg/l)	49
Tabla 11	Anova. Demanda bioquímica de oxígeno (mg/L)	50
Tabla 12	Prueba de Duncan para DBO <sub>5</sub>	50
Tabla 13	Prueba de Kruskal-Wallis	50
Tabla 14	Valoración de la DBO de la Muestra del Río Ejido en función del tiempo.	51
Tabla 15	Datos Estadísticos de la DBO <sub>5</sub> para muestras de Río Ejido	52
Tabla 16	Valoración de la DBO de la Muestra del Vertimiento de Aguas Residuales Domésticas en función del tiempo	52
Tabla 17	Datos Estadísticos para muestras de Vertimiento de Aguas Residuales Domésticas en función del tiempo	53
Tabla 18	DBO <sub>5</sub> Agua de Dilución para hallar Límites de Detección	54
Tabla 19	Límites de Detección para DBO	55
Tabla 20	Curva de calibración de Nitrato(rango de 0.5 a 10mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N/L)	56
Tabla 21	Curva de calibración de Nitrato(rango de 0.5 a 7 mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N/L)	57
Tabla 22	Curva de calibración de Nitrato(rango de 0.5 a 6 mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N/L)	57

Tabla 23	Estandarización de la Curva de Nitratos	59
Tabla 24	Tratamiento Estadístico para la estandarización de la curva de Nitratos	59
Tabla 25	Estadística descriptiva	61
Tabla 26	Estadística de contrastes multivariados	62
Tabla 27	Medias marginales estimadas	62
Tabla 28	Medias marginales estimadas	64
Tabla 29	Prueba de Duncan para las curvas de calibración de Nitratos	65
Tabla 30	Resultados sobre las concentraciones de las soluciones estándar de Nitrato en función del tiempo	69
Tabla 31	Resultados sobre las concentraciones de las muestras del Río Molino en función del Tiempo	69
Tabla 32	Tratamiento estadístico de validación para soluciones estándar de Nitrato	70
Tabla 33	Tratamiento estadístico de validación para las muestras	70
Tabla 34	Curva de calibración de Sulfatos (Rango 1-40mg/L)	71
Tabla 35	Curva de calibración de Sulfatos (Rango 1-25mg/L)	72
Tabla 36	Estandarización de la Curva de calibración de Sulfatos	74
Tabla 37	Tratamiento Estadístico para la estandarización de la curva de Sulfatos	76
Tabla 38	Contrastes multivariados: Influencia del Tiempo	77
Tabla 39	Prueba de esfericidad de Mauchly: influencia del tiempo	77
Tabla 40	Prueba de efectos intrasujetos	77
Tabla 41	Medias marginales estimadas	78
Tabla 42	Medias marginales estimadas	78
Tabla 43	Comparaciones múltiples de Bonferroni	80
Tabla 44	Resultados sobre las concentraciones de Sulfatos de las soluciones estándar en función del tiempo	83
Tabla 45	Resultados sobre las concentraciones de Sulfatos de las muestras en función del Tiempo	83
Tabla 46	Tratamiento estadístico de validación para soluciones estándar	84
Tabla 47	Tratamiento estadístico de validación para las muestras	85

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Mapa del Municipio de Popayán	37
Figura 2. Botella Oxitop para el Método Respirométrico	39
Figura 3. Montaje de las botellas Oxitop para determinación de DBO	41
Figura 4. Valoración de la DBO de Solución patrón con 2 mL de inóculo en función del tiempo	46
Figura 5. Valoración de la DBO de la solución patrón valorado con 3mL de inóculo en función del tiempo	47
Figura 6. Valoración de la DBO de la solución patrón valorado con 8mL de inóculo en función del tiempo	48
Figura 7. Valoración de la DBO de la Muestra del Río Ejido en función del tiempo.	51
Figura 8. Valoración de la DBO de la Muestra del Vertimiento de Aguas Residuales Domésticas en función del tiempo	53
Figura 9. Relación entre DBO <sub>5</sub> y agua de dilución	54
Figura 10. Curva de calibración de Nitrato (rango de 0.5 a 10 mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N/L)	56
Figura 11. Curva de calibración de Nitrato (rango de 0.5 a 7 mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N/L)	57
Figura 12. Curva de calibración de Nitrato (rango de 0.5 a 6 mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N/L)	58
Figura 13. Curva de calibración de Nitrato estandarizada	60
Figura 14. Gráfico de perfil de Absorbancia de Nitratos en función del tiempo	68
Figura 15. Curva de calibración de Sulfato (Rango 1-35mg/L)	72
Figura 16. Curva de calibración de Sulfato (Rango 1-25mg/L)	73
Figura 17. Estandarización de la Curva de calibración de Sulfato	76
Figura 18. Gráfico de perfil de Absorbancia de Sulfato en función del tiempo	82
Figura 19. Gráfico de perfil de concentraciones de Sulfato en función del tiempo de ensayo	84

## LISTA DE ACRÓNIMOS

**A:** Absorbancia  
**ANOVA:** Análisis de varianza  
**A.R.D.:** Aguas Residuales Domésticas  
**C:** Concentración  
**CRC:** Corporación Autónoma Regional del Cauca  
**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de Carbono  
**C<sub>org</sub>:** Materiales orgánicos fuente de Carbono  
**CTMP:** N-Allylthiourea (ATH) ó la 2-cloro-6(tricloro metil) piridina  
**DBO:** Demanda Bioquímica de Oxígeno  
**DBOn:** Demanda Bioquímica de Oxígeno después de n días  
**DBO<sub>5</sub>:** Demanda Bioquímica de Oxígeno después de 5 días  
**DBO<sub>20</sub>:** Demanda Bioquímica de Oxígeno después de 20 días  
**DO:** Densidad óptica  
**DOC:** Carbono Orgánico Disuelto  
**DQO:** Demanda química de oxígeno  
**IDEAM:** Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales  
**LC:** Límite de Cuantificación  
**LDI:** Límite de Detección Instrumental  
**LDM:** Límite de Detección del Método  
**mg/L:** Miligramos por litro  
**nm:** Nanómetro  
**PM:** Peso molecular  
**R.A:** Reactivo Analítico  
**r:** Coeficiente de correlación  
**RMN:** Resonancia magnética nuclear  
**S:** Desviación estándar  
**TOC:** Carbono Orgánico Total  
**UNESCO:** La Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura  
**UV - VIS:** Ultravioleta Visible

## RESUMEN

La riqueza hídrica colombiana abarca una extensa red fluvial superficial que cubre el país, sin embargo, este enorme potencial se restringe en su aprovechamiento por la confluencia de múltiples factores antrópicos que han generado efectos en los componentes del ciclo hidrológico y en especial, sobre la calidad del agua debido a la incorporación de residuos a las fuentes abastecedoras.

Para controlar el impacto antrópico y asegurar el abastecimiento de agua, es necesario conocer las condiciones de calidad del recurso, teniendo un diagnóstico de la fuente hídrica, se pueden adoptar medidas que conduzcan al mejoramiento de la calidad y uso racional del agua; medida que se logra si se cuenta con métodos de análisis idóneos para cumplir tal fin. Por lo tanto el Laboratorio AMBIENTAL de la CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DEL CAUCA (CRC) busca procesos de acreditación, que reconozcan su capacidad y competencia técnica de acuerdo a la norma NTC-ISO-IEC17025.

Entre los requisitos que implica el cumplimiento de dicha norma, todos los métodos y procedimientos que se aplican deben estar documentados, e incorporados a un adecuado sistema de calidad. Es por esto que mediante este proyecto y el convenio 069 existente entre la Universidad del Cauca y la CRC, se plantea implementar los métodos para determinación de  $DBO_5$  por Respirimetría, Sulfatos por Turbidimetría y Nitratos por Espectrofotometría de Ultravioleta, en las instalaciones del Laboratorio Ambiental de la CRC, con los equipos, materiales y reactivos con que cuenta el laboratorio para ser aplicados al monitoreo de la calidad ambiental de aguas superficiales.

En el proceso se determinarán los parámetros que servirán para establecer la confiabilidad del método, como son: intervalo lineal, sensibilidad, límite instrumental, límite de detección del método, límite de cuantificación, exactitud, precisión, límite de confianza, porcentaje de recuperación, de acuerdo al protocolo de estandarización de metodologías analíticas del IDEAM, con muestras de referencia tomadas sobre el Río Molino próximo a la bocatoma, en el vertimiento de aguas residuales domésticas Barrio Pandiguando, Río Ejido Barrio El Edén y en la Quebrada de la Granja INEM.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Corporación Autónoma Regional del Cauca (CRC), teniendo en cuenta la necesidad de conocer, efectuar seguimiento y administrar los recursos naturales en el departamento del Cauca, ha implementado y puesto en funcionamiento el Laboratorio Ambiental de la C.R.C., es así como actualmente el laboratorio cuenta con equipos de alta tecnología, instalaciones apropiadas, personal capacitado, reactivos y recursos necesarios para ofrecer a los usuarios respuestas a las necesidades en materia de análisis ambientales. Concientes de la importancia de la calidad en los procesos analíticos, el Laboratorio adelanta la implementación de su sistema de calidad bajo la norma NTC-ISO-IEC 17025 como requisito para obtener la acreditación ante el IDEAM.

Sin embargo, el Laboratorio Ambiental de la CRC actualmente no ha implementado los métodos para la determinación de Nitratos, Sulfatos y Demanda Bioquímica de Oxígeno los cuales son objeto de este trabajo de grado. Por lo tanto teniendo en cuenta el acercamiento conceptual entre ambas instituciones, se lleva a cabo la pasantía de un estudiante de Química para la implementación y validación de metodologías.

Para realizar el presente trabajo se plantea la siguiente hipótesis general: los métodos para análisis de  $DBO_5$  por Respirimetría, Sulfatos por Turbidimetría y Nitratos por lectura directa mediante Espectrofotometría de Ultravioleta, aplicados en el Laboratorio Ambiental de la CRC, una vez implementados, generan resultados confiables para que se inicie el proceso de validación y se aplique al monitoreo de la calidad ambiental de agua superficiales.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La elaboración de los protocolos analíticos e implementación de las metodologías para medición de los parámetros fisicoquímicos, aplicadas a la evaluación de la calidad ambiental, incluyendo la elaboración de toda la documentación relacionada (manual de funcionamiento, protocolos, instructivos), todos estos procesos se llevan a cabo como parte del sistema de calidad, con el objeto de acreditar los métodos de análisis fisicoquímicos y obtener reconocimiento como un laboratorio de excelente calidad.

La acreditación es la manera más confiable para garantizar que un laboratorio está produciendo información válida, homologable según los estándares internacionales, entregando en forma oportuna, segura a los usuarios finales, si a esto se suma el componente de interpretación ambiental de los datos desde un punto de vista interdisciplinario, se estará dando un valor agregado a dicha información, fortalecerá ampliamente al Sistema de Información Ambiental constituyéndose en una herramienta importante para el avance de la gestión ambiental en el Departamento del Cauca como en el país.

La acreditación significa que el sistema de calidad del laboratorio, su personal, sus instalaciones y equipos, sus métodos de prueba, sus archivos y reportes han sido evaluados, y con dicha evaluación el laboratorio tendrá la capacidad de proveer datos confiables.

Este trabajo busca implementar las metodologías necesarias para el análisis de Nitratos, Sulfatos,  $\text{DBO}_5$  presentes mayoritariamente en aguas superficiales, parámetros importantes en la determinación de la calidad del agua para los organismos que habitan en ella, así como indicio de contaminación. La CRC adelanta este tipo de trabajos (convenios) con estudiantes de la Universidad del Cauca, para lograr tal fin, de tal manera que el estudiante aplica los conocimientos adquiridos durante su formación académica al estudio y solución de un problema cotidiano en el ámbito laboral, aumenta su espectro de habilidades, retroalimenta el sistema de calidad de la entidad y adquiere una formación integral.

Se establece un modelo para que los analistas de laboratorios ambientales, o los estudiantes de programas de Química que aspiran a desempeñarse en dicha área, construyan el conocimiento requerido para desempeñar un buen papel en este tipo de labor, solucionando problemas prácticos, efectuando monitoreo del medio

ambiente, y obteniendo un sin número de conclusiones sobre los datos recopilados a diario. Estos aspectos sirven para demostrar que un método analítico está siendo correctamente aplicado y no genera valores absolutamente ciertos, sino que están sujetos a algún grado de error por el proceso de análisis, el cual debe ser conocido, cuantificado y tenido en cuenta al momento de reportar el dato.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Realizar la validación de los métodos analíticos para la determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>), Sulfatos y Nitratos en aguas superficiales del Municipio de Popayán, Departamento del Cauca.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1 Adaptar y optimizar los métodos analíticos: Respirometría para la determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>), Espectrofotometría de Ultravioleta para la determinación de Nitratos, Turbidimetría para Sulfatos.
- 2 Evaluar estadísticamente los métodos validados, mediante coeficiente de variación, desviación estándar, porcentaje de error, pruebas de ANOVA (Análisis de Varianza), Pruebas paramétricas y no paramétricas tales como Prueba de Duncan y de Pearson, Bonferroni, Prueba de esfericidad de Mauchly
- 3 Determinar los parámetros: intervalo lineal, sensibilidad, límite instrumental, límite de detección del método, límite de cuantificación, exactitud, precisión, porcentaje de recuperación, límite de confianza para cada uno de los métodos
- 4 Generar el registro documental de los resultados obtenidos para cada método, así como el protocolo de los mismos para la CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DEL CAUCA (CRC)

## **4. FUNDAMENTO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE**

El agua es, como el aire que respiramos, el patrimonio máspreciado de la humanidad. Actualmente, más de dos mil millones de seres humanos no se aprovisionan de agua potable y el desarrollo acelerado de metrópolis gigantescas, acompañado del crecimiento demográfico, incrementan su demanda. Esta situación afecta tanto a los países en vías de desarrollo como a los industrializados. Si el agua llegara a faltar, si no fuera tan inofensiva para la salud, si estuviéramos poniendo en peligro nuestro medio ambiente y, sobre todo, la calidad del agua, víctima de la creciente contaminación urbana, industrial y agrícola. Los ríos están contaminados por fosfatos, nitratos, sulfatos, metales pesados, materia orgánica, etc. Esto pone de manifiesto la fragilidad, la vulnerabilidad de un elemento considerado inagotable y que su misma omnipresencia hace invisible.

La degradación de los recursos acuáticos ha sido motivo de preocupación del hombre en las últimas décadas. Por esta razón, existe un creciente interés por conocer y proteger los ecosistemas fluviales y estudiar sus cambios en el tiempo, desarrollando criterios físicos, químicos y biológicos que permitan estimar el efecto y magnitud de las intervenciones humanas.<sup>(1)</sup>

### **4.1 EL AGUA**

El agua pura es un líquido inodoro e insípido. Tiene un matiz azul, que sólo puede detectarse en capas de gran profundidad. A nivel del mar (760 mm de mercurio), el punto de congelación del agua es de 0° C y su punto de ebullición de 100° C. El agua alcanza su densidad máxima a una temperatura de 4° C y se expande al congelarse. Como muchos otros líquidos, el agua puede existir en estado sobreenfriado, es decir, que puede permanecer en estado líquido aunque su temperatura esté por debajo de su punto de congelación; se puede enfriar fácilmente a unos -25° C sin que se congele<sup>(2)</sup>.

### **4.2 PROPIEDADES FISICAS, QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS DEL AGUA**

#### **4.2.1. Propiedades físicas**

1. Estado físico: sólida, líquida y gaseosa

2. Color: incolora
3. Sabor: insípida
4. Olor: inodoro
5. Densidad: 1 g/cm<sup>3</sup> a 4°C
6. Punto de congelación: 0°C
7. Punto de ebullición: 100°C
8. Presión crítica: 217,5 atm.
9. Temperatura crítica: 374°C. <sup>(2)</sup>

#### **4.2.2. Propiedades Químicas.**

1. Acción disolvente.
2. Fuerza de cohesión entre sus moléculas
3. Elevada fuerza de adhesión
4. Bajo grado de ionización
5. Reacciones: Reacciona con los óxidos ácidos ,con los óxidos básicos, con los metales, con los no metales y une en las sales formando hidratos.<sup>(2)</sup>

**4.2.3 Propiedades bioquímicas.** Los seres vivos se han adaptado para utilizar químicamente el agua en dos reacciones:

1. En la fotosíntesis en la que las enzimas utilizan el agua como fuente de átomos de hidrógeno.
2. En las reacciones de hidrólisis, en que las enzimas hidrolíticas han explotado la capacidad del agua para romper determinados enlaces hasta degradar los compuestos orgánicos en otros más simples, durante los procesos digestivos.<sup>(2)</sup>

### **4.3 TIPOS DE AGUA**

**4.3.1 Agua cruda.** Es aquella que no ha sido sometida a proceso de tratamiento<sup>(3)</sup>.

**4.3.2 Aguas naturales.** Aquéllas cuyas propiedades originales no han sido modificadas por la actividad humana; y se clasifican en:

1. **Superficiales.** Como aguas de lagos, lagunas, pantanos, arroyos con aguas permanentes y/o intermitentes, ríos y sus afluentes, nevados y glaciares
2. **Subterráneas.** En estado líquido o gaseoso que afloran de forma natural o por efecto de métodos artificiales.
3. **Meteóricas o atmosféricas.** Que provienen de lluvias de precipitación natural o artificial. <sup>(2)</sup>

**4.3.3 Agua Potable.** Es aquella que por reunir requisitos físicos, químicos y bacteriológicos, en las condiciones señaladas en el Decreto 475 del 10 de Marzo de 1998 por el Ministerio de Salud, al ser consumida por la población humana no produce efectos adversos a su salud. Se considera normal encontrar una calidad mínima de agentes contaminantes en el agua potable, incluyendo el agua embotellada. Pero la presencia de estos no significa necesariamente que exista o representen un riesgo a la salud. Es importante orientarse sobre los contaminantes regulados y no regulados en el agua potable y sus efectos potenciales a la salud <sup>(3)</sup>.

**4.3.3.1 Fuentes de Agua Potable.** Las fuentes superficiales incluyen: ríos, lagos, quebradas y riachuelos. <sup>(3)</sup>

En la clasificación de **fuentes subterráneas** están: los pozos y los manantiales. El agua que llega a los cuerpos de agua puede disolver los minerales del terreno que atraviesan la superficie de la tierra. Además, podría arrastrar sustancias originadas de las diferentes actividades de los seres humanos y los animales.

Debido a estos y otros sucesos es requisito aplicar tratamiento al agua para el consumo humano; entre ellos se destaca la desinfección de los contaminantes microbiológicos. Existen otras técnicas de tratamiento que podrían utilizarse, dependiendo de la fuente de agua. En el caso de los sistemas con fuente de aguas subterráneas, el tratamiento del agua es más simple y no requiere utilizar la filtración.

**4.3.3.2 Contaminantes en las Fuentes de Agua Potable.** El agua de las fuentes utilizadas en los sistemas públicos de agua, antes de recibir el tratamiento para convertirla en agua potable, podría tener los siguientes contaminantes

- **Microbiológicos:** incluyen virus, bacterias y otros microorganismos, que pueden originarse en las plantas de tratamiento de alcantarillado, pozos sépticos, actividades de ganadería y vida silvestre.
  
- **Químicos Inorgánicos:** incluyen sales y metales, que pueden tener origen natural o son el resultado de las escorrentías de lluvia. Además, otros orígenes pueden ser las descargas de agua con desperdicios domésticos o industriales, la producción de gases, aceites o cultivos.
  
- **Plaguicidas y Herbicidas:** pueden tener origen de una variedad de fuentes tales como: la agricultura, escorrentía de lluvia y de usos residenciales.
  
- **Químicos Orgánicos:** incluyen químicos orgánicos sintéticos y volátiles, que son productos intermedios de procesos industriales y de la producción de petróleo. Además, pueden tener su origen en gasolineras, escorrentías de lluvia y pozos sépticos.
  
- **Radiológicos:** pueden estar presentes en el terreno de forma natural. <sup>(3)</sup>

**4.3.4 Aguas Residuales.** Aguas usadas por una comunidad o industria que contienen materia disuelta o en suspensión. Proviene de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, agrícolas, pecuarios, domésticos y en general de cualquier otro uso. Las labores domésticas contaminan el agua, sobre todo, con residuos fecales y detergentes.

Los trabajos agrícolas y ganaderos pueden producir una contaminación muy grave de las aguas de los ríos y los acuíferos. Los principales causantes son los vertidos de aguas cargadas de residuos orgánicos, procedentes de las labores de transformación de productos vegetales, o de los excrementos de los animales.

Diariamente se utilizan grandes cantidades de agua en los hogares, en la industria, en la artesanía, etc. A través de los alcantarillados, se lleva esta agua

hasta plantas de depuración, donde se limpian mecánicamente, de manera biológica y en parte también con la ayuda de químicos.

Otra fuente de contaminación de las aguas son las industrias. Muchas de ellas, como la papelera, textil y siderúrgica, necesitan agua para desarrollar su actividad. Como consecuencia de estas actividades se tiene el vertido de aguas residuales cargadas de materia orgánica, metales, aceites industriales e incluso radiactividad.

Para eliminar la contaminación del agua existen sistemas de tratamiento de aguas residuales que sirven para devolver las características físicas y químicas originales al líquido. <sup>(2)</sup>

#### **4.4 CALIDAD DE AGUA**

Actualmente, es tan importante conocer la calidad del agua para el consumo humano, como en el riego de cultivos, el uso industrial en calderas, la fabricación de productos farmacéuticos, la expedición de licencias ambientales, el diseño y ejecución de programas de monitoreo en las evaluaciones ambientales, para adecuarla a las aplicaciones analíticas de los laboratorios, entre muchos otros fines.

La calidad del agua, se define como la condición general que permite que el agua se emplee para usos concretos. La calidad del agua está determinada por la hidrología, la fisicoquímica y la biología de la masa de agua a que se refiere <sup>(2)</sup>.

Las características hidrológicas son importantes, ya que indican el origen, cantidad del agua y el tiempo de permanencia, entre otros datos. Estas condiciones tienen relevancia ya que, según los tipos de substratos por los que viaje el agua, ésta se cargará de unas sales u otras en función de la composición y la solubilidad de los materiales de dicho substrato. Así, las aguas que discurren por zonas calizas (rocas muy solubles) se cargarán fácilmente de carbonatos. Los cursos de agua que discurren sobre substratos cristalinos, como los granitos, se cargarán muy poco de sales, y aparecerá en cantidad apreciable la sílice.

La cantidad y la temperatura también son importantes a la hora de analizar las causas que concurren para que el agua presente una calidad u otra. Lógicamente,

para una cantidad de contaminantes dada, cuanto mayor sea la cantidad de agua receptora mayor será la dilución de los mismos, y la pérdida de calidad será menor. Por otra parte, la temperatura tiene relevancia, ya que los procesos de putrefacción y algunas reacciones químicas de degradación de residuos potencialmente tóxicos se pueden ver acelerados por el aumento de la temperatura.

En síntesis, una determinada fuente de aguas puede tener la calidad necesaria para satisfacer los requerimientos de un uso en particular y al mismo tiempo, no ser apta para otro. Puesto que no existe un tipo de agua que satisfaga los requerimientos de calidad para cualquier uso concebible ni tampoco “un criterio único de calidad para cualquier fin”, en la actualidad es más frecuente que el concepto de Calidad de Aguas, se halle ligado a una utilidad o aplicación perfectamente establecida.

La calidad de un cuerpo de aguas, cualquiera que sea su aplicación, se determina a través de pruebas de laboratorio. Estas mismas pruebas, con diferente interpretación, pueden aplicarse también para controlar y optimizar el funcionamiento de las plantas de purificación y tratamiento de aguas. Adicionalmente, las pruebas de laboratorio constituyen la principal herramienta para el desarrollo de evaluaciones ambientales.

**4.4.1 Norma de calidad de agua.** Es el valor admisible o deseable establecido para algunas características presentes en el agua, con el fin de determinar su calidad y contribuir a preservar y mantener la salud humana.

**4.4.2 Criterio de calidad de agua.** Es el valor establecido para algunas características presentes en el agua, con el fin de conceptualizar sobre su calidad e iniciar investigación sanitaria cuando las circunstancias lo ameriten.

**4.4.3 Tratamiento.** Es el conjunto de operaciones y procesos sanitarios que se realizan sobre el agua cruda, con el fin de modificar sus características físicas, químicas o bacteriológicas para obtener agua potable que cumpla las normas de calidad establecidos.

**4.4.4 Indicadores de calidad del agua.** Los parámetros más comúnmente utilizados para establecer la calidad de las aguas son los siguientes: oxígeno

disuelto, pH, sólidos en suspensión, DBO, fósforo, nitratos, nitritos, amonio, amoniaco, compuestos fenólicos, hidrocarburos derivados del petróleo, cloro residual, cinc total y cobre soluble. <sup>(3)</sup>

**4.4.5 Normas y criterios de calidad química del Agua potable.** Mediante el artículo 8 del capítulo III del decreto 475 de 10 de marzo de 1998 el Presidente de La República de Colombia, decreta las normas y criterios de calidad química del agua potable que rigen para todo el territorio nacional. En las siguientes tablas se relacionan algunas de las normas establecidas en dicho decreto <sup>(3)</sup>.

**Tabla 1. Criterios para elementos y compuestos químicos, diferentes a los plaguicidas y otras sustancias, que al sobrepasar los valores establecidos tienen reconocido efecto adverso en la salud humana <sup>(3)</sup>**

<b>Características</b>	<b>Expresada como</b>	<b>Valor admisible (ppm)</b>
Aluminio	Al	0.2
Antimonio	Sb	0.005
Arsénico	As	0.01
Bario	Ba	0.5
Boro	B	0.3
Cadmio	Cd	0.003
Cianuros	CN	0.1
Cloroformo	CHCl <sub>3</sub>	0.03
Cobre	Cu	1.0
Cromo	Cr <sup>6+</sup>	0.01
Fenoles	Fenol	0.001
Mercurio	Hg	0.001
Molibdeno	Mb	0.07
Níquel	Ni	0.02
Nitritos	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.1
<b>Nitratos</b>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10
Plata	Ag	0.01
Plomo	Pb	0.01
Selenio	Se	0.01
Sustancias activas al azul de metileno	ABS	0.5
Trihalometanos Totales	THMs	0.1

*(Ministerio de Salud, decreto 475 de 10 de marzo de 1998)*



**Tabla 2. Criterios de calidad química para características con implicaciones de tipo económico o acción indirecta sobre la salud <sup>(3)</sup>**

<b>Características</b>	<b>Expresada como</b>	<b>Valor admisible (ppm)</b>
Acidez	CaCO <sub>3</sub>	50
Alcalinidad Total	CaCO <sub>3</sub>	100
Calcio	Ca	60
Cloruros	Cl <sup>-</sup>	250
Dureza total	CaCO <sub>3</sub>	160
Fluoruros	F <sup>-</sup>	1.2
Fosfatos	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	0.2
Hidróxidos	CaCO <sub>3</sub>	< LD
Hierro total	Fe	0.3
Magnesio	Mg	36
Manganeso	Mn	0.1
<b>Sulfatos</b>	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	250
Zinc	Zn	10

(Ministerio de Salud, decreto 475 de 10 de marzo de 1998)

#### **4.5 DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGENO (DBO)**

DBO<sub>n</sub> es la Demanda Bioquímica de Oxígeno después de n días y que está asociada a ciertas condiciones experimentales.

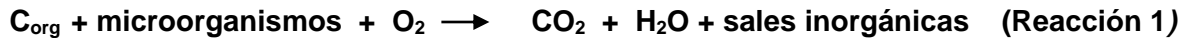
Este valor representa la cantidad de oxígeno que ha sido consumido en el transcurso de procesos aeróbicos de descomposición de materiales orgánicos causados por microorganismos.

Por consiguiente el DBO provee información de la proporción biológicamente convertible contenida en la muestra de agua y de su susceptibilidad a la oxidación por el uso del oxígeno. La DBO se mide en mg/L de O<sub>2</sub> usualmente medido dentro de un período de 5 días (DBO<sub>5</sub>). <sup>(4)</sup>

**4.5.1 Principio.** La actividad de los microorganismos (bacterias, hongos, algas, protozoos) que están presentes prácticamente en cada área de vida como una población mixta (grupos de microorganismos existentes junto a nosotros y con interacción mutua), generan una depuración de las materias orgánicas presentes en el agua. Ellos se alimentan de las sales y los compuestos orgánicos como el

azúcar, la celulosa, etc., entre otras y de las sustancias sintéticas convertibles por oxidación, generando la descomposición bioquímica de las mismas.

La expresión "descomposición total de materiales orgánicos" ( $C_{org}$ ) indica su oxidación a Dióxido de Carbono ( $CO_2$ ) y sales inorgánicas por microorganismos, como expresa la reacción **(1)**:



Además se producen nuevos microorganismos y energía.

Las condiciones para determinar el DBO se definen exclusivamente por la cantidad de los materiales orgánicos contenidos en la muestra (la cual afecta al desarrollo microbiano) o sea a mayor cantidad de material orgánico genera gran intercambio con las bacterias y por lo tanto un determinado valor de DBO. Los valores de DBO determinados después de cinco días ( $DBO_5$ ) se han adoptado como una solución de compromiso como prueba de período corto para relacionarla con la destrucción total del material orgánico presente. Con el efluente doméstico, a 20 °C, una degradación completa (= 100% DBO) se logra después de 20 días ( $DBO_{20}$ ).

Sin embargo, según Hutter <sup>(3)</sup>; después de 5 días el 70% de las sustancias biológicamente convertibles son degradadas. Las ventajas de tomar el  $DBO_5$  como medida del DBO de una muestra, es un hecho práctico a los fines de tener un valor en un tiempo corto y por el otro lado es porque los estudios realizados permiten hacer la extrapolación. Un gráfico de DBO puede dibujarse para un periodo dado de tiempo.

En su estado natural, los microorganismos consumen primero y completamente el material fácilmente disponible, antes de que ataquen a la próxima fuente de Carbono. El traslado al nuevo substrato tiene una fase de adaptación (en general corto tiempo) y que es un retraso en la velocidad de crecimiento de las bacterias afectando la conversión del material a degradar. Más allá de estas consideraciones y bajo condiciones normales, la adaptación de los microorganismos inoculados al medio, no influye en el tiempo del  $DBO_5$  y por lo tanto pueden obtenerse los valores de DBO comparables <sup>(5)</sup>.

**4.5.2 Interpretación con base al valor de DBO<sub>n</sub>.** Pueden hacerse aseveraciones con respecto a las características de la fuente y la actividad biológica de su microflora.

Por ejemplo, dónde una fuente de agua se ve sometida a cargas orgánicas fuertes, el agua puede ponerse anaerobia como resultado de una falta de oxígeno debido a la alta demanda de  $O_2$  por parte del mismo. En otro caso, la capacidad biológica de una planta de tratamiento que recoge agua de alcantarillas puede ser evaluada por comparación de los valores de DBO conocidos de una solución que contenga la misma microbiosfera que la que posee la planta de tratamiento.

En general se puede afirmar que: Un alto DBO indicará un alto contenido de material orgánico fácilmente degradable, en la muestra. Un bajo DBO indicara un bajo contenido de material orgánico, sustancias que son de difícil destrucción u otros problemas de la medición.

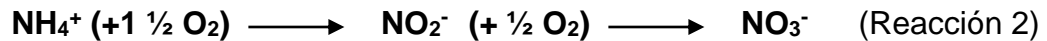
Los valores de DBO son generalmente determinados y evaluados en asociación con otros parámetros (por Ej.: TOC (Carbono Orgánico Total), DOC (Carbono Orgánico Disuelto), DQO (Demanda química de oxígeno)). Por ejemplo, si se considera una comparación de un valor de DBO moderado con el valor del DQO se puede tener: una diferencia pequeña indicando que una proporción grande del material orgánico puede degradarse fácilmente. Una diferencia grande indica que la carga orgánica no puede ser fácilmente consumida, o que un problema está presente.

La DBO descubre sólo la porción degradable de las sustancias orgánicas y como principio general su valor es inferior al de DQO el cual también incluye los materiales inorgánicos y otros materiales que no pueden oxidarse biológicamente.<sup>(4)</sup>

**4.5.3 Problemas en la Interpretación.** La biodegradación de los materiales presentes en el agua ocurre en dos fases:

1. La primera es el ataque inmediato sobre los materiales degradables fácilmente disponibles.
2. En la segunda fase ocurre el fenómeno de nitrificación que también involucra el consumo de  $O_2$ . Hay dos grupos de bacterias que generan la nitrificación las cuales catalizan la síntesis y cierran la relación.

Como se muestra en la Reacción (2) el primer grupo oxida el ión Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) al nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), el cual es el substrato para el segundo grupo y que genera el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ).



En general se dice que la nitrificación ocurre después de los 10 días pero puede ocurrir dentro de los 5 días que dura el análisis si la muestra no tiene una alta carga orgánica. Para evitar que este indeseable efecto ocurra, pueden adicionarse la N-Allylthiourea (ATH) ó la 2-cloro-6(tricloro metil) piridina (CTMP).

Puede hacerse también análisis con y sin inhibidor para cuantificar la DBO correspondiente a la nitrificación. En contraste con esto, los inhibidores pueden reducir la actividad biológica en el agua, o incluso matar completamente a los organismos.

Aún así, puede ser de interés determinar el DBO de una muestra de este tipo. Esto puede lograrse con una solución diluida en la que los venenos metabólicos están por debajo de la concentración en la que tendrían efecto en la descomposición aeróbica. <sup>(3)</sup>

**4.5.4 Procedimientos para evaluar la DBO.** Existen dos procedimientos normales que son equivalentes

**El primero** es el método por dilución dando la DBO de muestras diluidas luego de un período de n días, este es, en la mayoría de los casos, un procedimiento oficialmente aceptado. Es dispendioso e incluye una optimización en las condiciones de la prueba. El contenido del oxígeno es directamente medido en la propia muestra.

**El segundo** procedimiento es más simple y consiste en medir el consumo del  $\text{O}_2$  presente en la muestra cerrada durante un periodo de n días. Este método se usa para realizar solo seguimientos y se llama respirométrico. Se detalla en el capítulo 5 de metodología.

## 4.6 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS Y SULFATOS

**Espectroscopia:** Es una área de la física y la química dedicada al estudio de la generación, medición e interpretación de los espectros de energía que resultan de la emisión o absorción de energía radiante. <sup>(6)</sup>

**Espectrometría:** Es una rama de la espectroscopia relacionada con la medición de espectros. <sup>(6)</sup>

**Espectrofotometría:** Es uno de los métodos más habituales y versátiles en el campo de la investigación biológica, ya que permite determinar, no sólo cualitativa y cuantitativamente muchos compuestos, sino seguir la cinética de reacciones enzimáticas, claves en los diversos procesos de interés biológico.

Se conocen con el nombre de “*Métodos Fotométricos*” al conjunto de técnicas analíticas basadas en la medición de la radiación electromagnética, absorbida, reflejada o emitida por una sustancia presente en un sistema acuoso.

Con frecuencia, el nombre del método fotométrico específico, alude a la región del espectro electromagnético dentro de la cual se realiza la medición. Así por ejemplo, se habla de espectroscopia de RMN, Infrarroja, VIS o UV, para referirse a la región de las ondas de radio, al infrarrojo, al visible o al ultravioleta. Cada uno de estos métodos tiene un campo específico de aplicaciones. <sup>(6)</sup>

**4.6.1 Principio.** Según la teoría ondulatoria de Maxwell, la luz ordinaria se presenta como una vibración electromagnética que viaja en línea recta a velocidad uniforme,  $3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$  en el vacío, siendo la dirección de vibración de la onda perpendicular a la dirección de su propagación.

Una ecuación (1) muy simple relaciona esa velocidad, **C**, con las otras características ondulatorias, como son:

$$C = \lambda \cdot \nu \quad (\text{Ecuación 1})$$

$\lambda$  = la longitud de onda

$\nu$  = la frecuencia de la onda

Así mismo, desde principios de siglo, y con la aparición de la teoría cuántica, a la luz se la considera también como una corriente de paquetes discretos de energía que denominamos fotones. La cantidad de energía asociada a cada fotón depende de la frecuencia de la luz, de acuerdo con la ley de Planck:

$$E = h \cdot \nu \quad \text{(Ecuación 2)}$$

$$E = h \cdot c / \lambda \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Siendo **h** la constante de Planck =  $6,626 \times 10^{-34}$  J.s

La luz blanca engloba distintos componentes, cada uno de ellos con una longitud de onda (color) diferente, como pone de manifiesto su dispersión a través de un prisma. Una radiación electromagnética monocromática, contiene exclusivamente una sola longitud de onda ( $\lambda$ ) determinada. Es con estas radiaciones monocromáticas con las que se trabaja en espectrofotometría.

Los electrones en una molécula, al igual que en los átomos, tienden a ocupar los niveles más bajos de energía potencial, es lo que se llama estado fundamental. La interacción de átomos y moléculas con radiaciones de diferentes longitudes de onda se plasma en estados excitados que darán lugar a los espectros de absorción, cuando las moléculas absorben cuantos discretos de energía de diferentes  $\lambda$ , y a los espectros de emisión, cuando emiten dichos cuantos.

La espectroscopía UV-Vis, como la IR (infrarroja), es una técnica que mide la absorción, registrando por tanto la interacción de la materia con la luz y analizando la diferencia entre la intensidad de luz aplicada ( $I_0$ ) y la intensidad de luz transmitida ( $I$ ).

La parte de la molécula que es responsable de la absorción de la luz, se denomina cromóforo, que puede ser un grupo funcional o, en algunos casos, toda la molécula y se caracteriza, en general, por la presencia de dobles enlaces, normalmente conjugados.

En el estado normal (fundamental) de la molécula, los electrones están en los orbitales  $\pi$  y  $\sigma$  enlazantes, y hay un número par de ellos, salvo si es un radical.

Existen también electrones no enlazantes, por ejemplo en puentes de H y valencias libres; que se sitúan en el orbital  $\eta$ , entre el  $\pi$  y el  $\pi^*$ .

Las transiciones que se pueden dar al excitar la molécula son  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  y  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Las transiciones  $\sigma \rightarrow \pi^*$  y  $\pi \rightarrow \sigma^*$  están prohibidas, su probabilidad es cero, dado que los orbitales  $\sigma$  y  $\pi$  son perpendiculares entre sí. Las transiciones de menor energía ( y por tanto de mayor  $\lambda$ ) son las  $\pi \rightarrow \pi^*$  y corresponden a dobles enlaces (  $-C=C-$  ;  $-C=O$ ; etc.). Estas transiciones son las más habituales, junto con las  $\eta \rightarrow \pi^*$ , en la espectroscopia UV-V en las que aparecen como hombros en el espectro. Las transiciones  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  son de gran energía (por tanto de baja  $\lambda$ ) y no pueden recogerse en espectrofotómetros convencionales.

**4.6.2 Análisis cuantitativo.** La medida más común de absorción de luz es la Absorbancia (A), también denominada densidad óptica (DO). La absorbancia se define como la ecuación 4:

$$A = \log I_0 / I \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde  $I_0$  es la intensidad de la luz monocromática incidente sobre la muestra e  $I$  es la intensidad de la luz transmitida por la muestra.

Existe una dependencia lineal entre la Absorbancia (A) y la concentración (C), regulado por la ley de Lambert-Beer, según la ecuación 5:

$$A = \varepsilon.C.l \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde C es la concentración, normalmente en moles/ litro; l es el espesor de la cubeta expresado en cm (normalmente 1 cm) y  $\varepsilon$  es el denominado coeficiente de extinción molar, que es característico de cada sustancia y se expresa en  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ , con lo cual, la absorbancia resulta adimensional. <sup>(6)</sup>

Cuando  $\varepsilon$  es muy grande o se ignora el peso molecular (PM) de una sustancia, en vez del coeficiente de extinción molar se utiliza  $E_{cm}^{1\%}$ , que equivale a la absorbancia que presenta una solución al 1% de dicha sustancia en cubetas de 1 cm de espesor.

Cuando se desconoce el coeficiente de extinción molar, o éste varía en función de las condiciones experimentales, se puede calcular mediante la realización de una recta patrón, cuya pendiente nos dará el valor del mencionado coeficiente de extinción. Para la realización de la recta se preparan distintas disoluciones de la sustancia y se mide su absorbancia. La recta se ajusta por regresión lineal. La concentración problema puede también calcularse extrapolando sobre la recta el valor de su absorbancia.

La relación lineal entre concentración y absorbancia sólo es válida para un determinado rango de concentraciones, que varía de unas sustancias a otras. En el caso de que la disolución problema tenga una concentración que está fuera del rango de linealidad, deberán hacerse diluciones de la misma.

#### **4.7. DEFINICIONES DE PARÁMETROS A TENER EN CUENTA EN EL PROCESO DE ESTANDARIZACION**

**4.7.1 Exactitud.** La exactitud de un método es la aproximación mas estrecha a un resultado o el promedio de una serie de resultados que se aproximan al verdadero valor que es el aceptado. Normalmente se expresa en términos de error teniendo como referencia los patrones preparados en el laboratorio y un patrón externo certificado. <sup>(7)</sup>

**4.7.2 Precisión.** Indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones prefijadas. Usualmente se expresa en términos de la desviación estándar (S). La repetibilidad es una medida de la precisión de datos obtenidos por un solo operador trabajando siempre en las mismas condiciones (equipos, materiales y reactivos). La reproducibilidad es una medida de la precisión de los datos obtenidos entre dos o más analistas y/o laboratorios que utilizan el mismo método y similares condiciones. <sup>(8)</sup>

**4.7.3 Limite de detección** Es la cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco,  $Y_B$ , más tres veces la desviación estándar del blanco,  $S_B$ .

Esto con base a la ecuación 6 que define el Límite de detección (LDM) como:



$$\text{LDM} = Y_B + 3S_B$$

(Ecuación 6)

Aquí  $Y_B$  es igual al intercepto de la curva y  $S_B$  al error aleatorio en la dirección  $Y$  ( $S_{y/x}$ ). Una vez realizado las operaciones; esta señal resultante, se introduce en la ecuación de regresión ( $Y = mX + b$ ), de la curva de calibración para determinar la respectiva concentración. <sup>(7)</sup>

**4.7.4 Límite de cuantificación:** Considerado como el límite más bajo para mediciones cuantitativamente precisas. Se ha sugerido un valor de  $Y_B + 10S_B$  para este límite, aunque en la practica no se ha utilizado ampliamente. <sup>(7)</sup>

**4.7.5 Linealidad.** Se refiere a la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento. <sup>(8)</sup>

**4.7.6 Sensibilidad.** Es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración. Normalmente se mide como la pendiente de la curva de calibración. Como valor se puede reportar el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar. <sup>(8)</sup>

## 4.8 Pruebas Paramétricas

Son aquellas pruebas estadísticas que exigen que los datos a los que se aplican pertenezcan a una muestra aleatoria de una distribución de probabilidad de tipo normal o de Gauss, simétrica alrededor de la media, que las varianzas de los grupos que se comparan en una variable dependiente sean aproximadamente iguales. Viene determinada por dos parámetros, la media y la desviación típica. Se aplican principalmente a datos de tipo cuantitativo.

Las pruebas paramétricas más conocidas y usadas son la prueba t de Student, la prueba F, llamada así en honor a Fisher, y el coeficiente de correlación de Pearson, simbolizado por r.

**4.8.1 Análisis de varianza (ANOVA).** Es un técnica estadística que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación. El análisis de varianza sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El

procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar. Típicamente, el análisis de varianza se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de otro grupo de puntuaciones.

Con las pruebas ANOVA se verifica si la diferencia entre las medias muestrales es demasiado grande para explicarse por medio de los errores aleatorios

**4.8.2 Prueba de Duncan.** Comparaciones múltiples post hoc de las medias observadas. La prueba de rangos múltiples de Duncan, la de Student-Newman-Keuls (S-N-K) y la b de Tukey son pruebas de rangos que asignan rangos a medias de grupo y calculan un valor de rango. Estas pruebas no se utilizan con tanta frecuencia como las pruebas explicadas previamente. La prueba t de Waller-Duncan utiliza una aproximación Bayesiana. Esta prueba de rango emplea la media armónica del tamaño de la muestra cuando los tamaños de las muestras no son iguales. La Prueba de Duncan realiza comparaciones por pares utilizando un orden por pasos idéntico al orden usado por la prueba de Student-Newman-Keuls, pero establece un nivel de protección en la tasa de error para la colección de contrastes, en lugar de usar una tasa de error para los contrastes individuales. Utiliza el estadístico del rango estudentizado. La prueba Waller-Duncan realiza la prueba de comparaciones múltiples basada en un estadístico t. Utiliza la aproximación Bayesiana.

## 4.9 Pruebas No Paramétricas

Pruebas estadísticas libres de distribución para los datos. En la mayor parte de ellas los resultados estadísticos se derivan únicamente a partir de procedimientos de ordenación y recuento, por lo que su base lógica es de fácil comprensión.

En estos casos se emplea como parámetro de centralización la mediana, que es aquel punto para el que el valor de X está el 50% de las veces por debajo y el 50% por encima.

Las más conocidas en estas pruebas son la ji cuadrada de Pearson, los coeficientes de contingencia de Pearson y Cramer, la prueba U de Mann & Whitney, el coeficiente de correlación de rangos de Spearman, y el coeficiente de asociación ordinal de Goodman, Prueba de Kruskal-Wallis para comparar K

muestras, Prueba de Friedman para comparar K muestras pareadas (bloques), Coeficiente de correlación de Spearman para rangos, Prueba de rachas de Wald-Wolfowitz

**4.9.1 Prueba de Kruskal-Wallis para comparar k muestras independientes.** En estadística, el análisis de varianza de Kruskal-Wallis es una prueba no paramétrica para escalas ordinales que no asume que la población siga una distribución normal. El fundamento de esta prueba de K-W es comparar las sumas de los rangos de los sujetos correspondientes a cada uno de los grupos.

## **5. METODOLOGIA**

Los Métodos a validar comprenden: Respirometría para la determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno ( $DBO_5$ ), Espectrofotometría de Ultravioleta para la determinación de Nitratos, Turbidimetría para Sulfatos, en aguas superficiales, utilizando la metodología establecida por el IDEAM. <sup>(8)</sup>

### **5.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA**

Las muestras utilizadas para la validación del método se toman en cuatro sitios, en el Río Ejido sobre el tramo del Barrio Edén (después de la descarga de A.R.D), en el Río Molino próximo a la Bocatoma, en un Vertimiento de aguas residuales domesticas sobre el Barrio Pandiguando; y en una Quebrada próxima a la Granja INEM. La ubicación de los sitios se reporta en el Mapa del Municipio de Popayán en la figura1. Los análisis y el desarrollo del trabajo se realizan en el Laboratorio Ambiental de la CRC ubicado en el Vivero Forestal La Florida, Vereda González del Municipio de Popayán.

### **5.2 DOCUMENTACIÓN Y MONTAJE DE LAS METODOLOGÍAS**

Para el montaje y validación de las metodologías analíticas se sigue el procedimiento descrito en el protocolo para estandarización de métodos analíticos, suministrados por el IDEAM <sup>(8)</sup>, cuyo objetivo es obtener en forma experimental y para las condiciones particulares del Laboratorio, los valores de los parámetros que servirán como criterios de confianza del método analítico.

### **5.3 METODOLOGÍAS ANALÍTICAS SELECCIONADAS PARA LA VALIDACION DE LOS METODOS**

De acuerdo a los instrumentos y materiales que existen en el Laboratorio de la CRC, se selecciona el Método Respirométrico para la  $DBO_5$ . En la determinación de Nitratos se selecciona el Método Espectrofotométrico y en la determinación de Sulfatos se selecciona el Método Turbidimétrico.

Figura 1 mapa

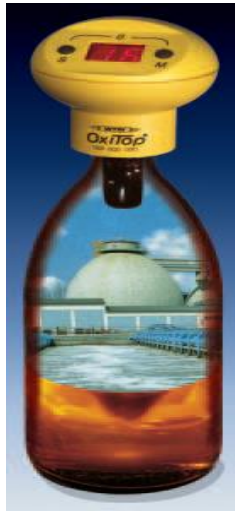
**5.3.1. Método para la medición de la DBO<sub>5</sub>.** Con el propósito de determinar la DBO<sub>5</sub>, las muestras se toman durante las horas de la mañana, en la descarga doméstica sobre el Río Molino en el Barrio Pandiguando, se toma 6 submuestras de 300 mL, por un tiempo de una hora cada 10 minutos para completar una muestra compuesta de 1.8 L. En el Río Ejido ubicado en el Barrio Edén (después de la descarga de A.R.D) se toman 10 submuestras de 300 mL, las cuales se mezclan para formar una muestra compuesta de 3L, y se llevan al laboratorio para su inmediato procesamiento. Se deben eliminar algunas interferencias que pueden afectar el normal desarrollo de la prueba e inducir a resultados equívocos. Por esta razón, se tienen en cuenta las recomendaciones siguientes de acuerdo a MERCK. <sup>(10)</sup>

- Se debe tomar un volumen adecuado de la muestra en un recipiente muy limpio.
- Se debe Neutralizar ajustando el valor de pH entre 6.5 y 7.5
- Si no se conoce el valor aproximado de DBO esperado, se debe tomar como guía el valor de DQO. Normalmente **DBO = 0.8 DQO.**
- Con este estimativo, se define el volumen de muestra a tomar según la tabla 3

**5.3.1.1 Técnica Respirométrica;** Se aplica la técnica de La Respirometría, utilizando una botella respirométrica de 500 mL de capacidad, que permite medir el consumo de oxígeno realizado por microorganismos en la muestra colocada en dicha botella.

A diferencia de la prueba tradicional de la DBO<sub>5</sub>, los microorganismos no solo consumen el oxígeno disuelto en el agua de la muestra, sino el oxígeno presente en la cámara superior de la botella, el cual puede ser de 20 a 50 veces mas grande que el oxígeno disuelto en la fase líquida de la Botella, como se aprecia en la figura 2.

**Figura 2. Botella Oxitop para el Método Respirométrico**



Las botellas respirométricas se esterilizan previamente en autoclave ALL AMERICAN Model No. 25X a una presión comprendida entre 15-20 psi durante 45 minutos. Dichas botellas, van provistas de una tapa hermética dotada de un sensor electrónico OXITOP, el cual registra electrónicamente la presión negativa dentro de la botella, mostrando un resultado de dos cifras en forma digital, de cero a cincuenta.

**5.3.1.1.1 Preparación del agua de dilución.** El agua de dilución se utiliza como blanco, se prepara con agua desionizada y una fuente de nutrientes tales como solución Tampón de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), soluciones de: sulfato de Magnesio, Cloruro de Calcio y de Cloruro Férrico.

**5.3.1.1.2 Preparación de la solución patrón de glucosa ácido glutámico.** La solución patrón se prepara disolviendo 150mg de glucosa y 150mg de ácido glutámico (previamente secos a  $105^\circ\text{C}$  durante una hora) completando a 1000mL con agua de dilución

**5.3.1.1.3 Determinación del Volumen de semilla de inóculo.** Esta semilla de microorganismos, se obtiene de aguas residuales domésticas, ubicadas alrededor del Vivero forestal La Florida, Vereda González del municipio de Popayán. Con base en ensayos previos realizados por el laboratorio de la CRC y teniendo en cuenta que el valor de DBO óptimo para la solución patrón debe estar entre

260±30<sup>(14)</sup>, se encontró que muestras de semilla de inóculo de este sitio presentan resultados comprendido dentro de este rango debido a la carga microbial presente en él.

Para definir el volumen de semilla de inóculo se ensayan varios volúmenes en la Solución patrón de glucosa-ácido glutámico y se selecciona como el más apropiado aquél con el que se obtengan valores de DBO<sub>5</sub> más cercanos a 260±30 de acuerdo al STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER<sup>(14)</sup> y que presenten una adecuada repetibilidad.

**5.3.1.1.4. Determinación del Volumen de Muestra.** Con el propósito de determinar el volumen de muestra a tomar para esta medición, se debe inicialmente determinar la Demanda Química de Oxígeno (DQO), ya que el 80% de este valor corresponde teóricamente a la DBO esperado<sup>(9)</sup>. Para medir la DQO se utiliza el método de oxidación con dicromato de potasio en presencia de ácido sulfúrico y sulfato de mercurio durante dos horas, al cabo de las cuales el dicromato en exceso se determina fotométricamente.

Con base en el valor de DBO<sub>5</sub> esperado, se determina el volumen de muestra a tomar interpolando en la tabla 3. A este volumen se agrega el volumen de semilla de inóculo determinado anteriormente. Se tapa herméticamente y se coloca en una cámara de incubación durante cinco días, a una temperatura de 20 ± 0.5°C como se aprecia en la figura 3. Para absorber el CO<sub>2</sub> producido se agrega dos lentejas de NaOH sólido, por medio de un beaker de caucho suspendido internamente del cuello de la botella. El resultado mostrado debe multiplicarse por el factor de escala que se aplique según el volumen de muestra tomado (ver tabla 3). Si la muestra ha sido diluida, el factor de dilución debe multiplicarse por el valor obtenido en la operación anterior<sup>(10)</sup>.

**TABLA 3. Factores de escala según volúmenes y DBO esperado<sup>(10)</sup>**

DBO esperado (mg/L)	Volumen a tomar de muestra (mL)	Factor de escala OXITOP
0 - 40	432	1
0 - 80	365	2
0 - 200	250	5
0 - 400	164	10
0 - 800	95	20.1
0 - 2000	43.5	50.3
0 - 4000	22.7	100.5



**Figura 3. Montaje de las botellas Oxitop para determinación de DBO**



Diariamente se hace la lectura de la presión al interior de la Botella (sin destaparla) y de la temperatura que registra la cámara de incubación. Con estos datos, se calcula la cantidad de oxígeno consumido y se expresa en términos de mg/L.

$$\text{DBO}_m = L - (\text{DBO}_s \times V_s/V_c) - Z \quad (\text{Ecuación 7})$$

DBO<sub>m</sub>: DBO de muestra

L : Lectura de la botella multiplicada por el factor de escala ver tabla 3

DBO<sub>s</sub>: DBO de semilla o inóculo (Lectura de la botella multiplicada por factor de escala ver tabla 3)

V<sub>s</sub> : Volumen de semilla en cada muestra

V<sub>c</sub> : Volumen de control de semilla

Z : DBO de agua de dilución

**5.3.2 Método para determinar Nitratos.** Las muestras para determinación de Nitratos se toma durante las horas de la mañana, en el Río Molino cerca de la bocatoma, se toman 6 submuestras de 300 mL, por un tiempo de una hora cada 10 minutos para formar una muestra compuesta de 1.8 L, y se llevan al laboratorio para su inmediato procesamiento. Para determinaciones durante el tiempo del ensayo es necesario el almacenamiento de las muestras a 4°C.

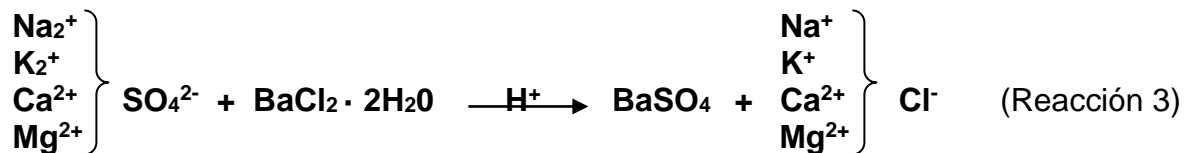
En la determinación directa de ión Nitrato por espectrofotometría ultravioleta, se aprovecha la banda de absorción de esta sustancia a 220 nm para determinar cuantitativamente el contenido de nitrato. Se minimizan las interferencias ocasionadas por la presencia de materia orgánica, mediante la filtración de las muestras a través de membranas de 0,45 μ antes de realizar las mediciones, ya que de esta manera la absorbancia a 270nm no son significativas. Se hace una

curva de calibración de Absorbancia (Lectura de Absorbancia a 220nm) en función de la concentración con solución de patrones y en la curva se interpolan las lecturas de Absorbancia de la muestras respectivas <sup>(11)</sup>.

La acidificación con HCl 1N está designada para prevenir la interferencia de concentraciones de hidróxido o carbonato hasta de 1000 mg CaCO<sub>3</sub>/L. El cloruro no tiene efecto en la determinación.

**5.3.3 Método para determinar sulfato.** Las muestras para determinación de Sulfatos se toman en el Río Molino próximo a la Bocatoma y en la Quebrada cerca de la Granja del INEM, durante las horas de la mañana. Se toman 6 submuestras de 300 mL, para formar una muestra compuesta de 1.8 L y se llevan al laboratorio para su inmediato procesamiento. Para determinaciones durante el tiempo del ensayo es necesario el almacenamiento de las muestras a 4°C. Las muestras se filtran por medio de un papel filtro de 0.45μ para eliminar interferencias causadas por materia orgánica.

Este método está basado en la TURBIDEZ que produce el sulfato al reaccionar con el Bario, formando Sulfato de Bario. La muestra es tratada con Cloruro de Bario, en presencia de ácido acético, formándose el precipitado blanco de Sulfato de Bario, el cual produce una turbidez en el agua de acuerdo a la reacción 3.



Se requiere de un solvente acondicionador, que contiene Bactogelatina, para modificar la viscosidad de la muestra y así permitir que el precipitado de BaSO<sub>4</sub> se mantenga en suspensión, produciendo valores de turbidez estables, que permitan la medida a una longitud de onda de 420 nm y una celda de 1 cm <sup>(12)</sup>. La intensidad de esta turbidez es proporcional a la concentración de los sulfatos. La concentración del Ion sulfato se determina por interpolación en una curva de calibración con solución de patrones a diferentes concentraciones. Para evitar interferencias de materia orgánica en suspensión, se hace filtración a través de una membrana de 0.45μ de diámetro de poro.

## 5.4 ESTANDARIZACION DE LOS MÉTODOS

Antes de iniciar el proceso de estandarización de cada método se hace el montaje, se verifica que el equipo funciona en condiciones óptimas para la lectura de muestras, para lo cual se establecen por mediciones programadas los valores de: límite de detección instrumental, límite de detección del método, límite de cuantificación, intervalo lineal del método, linealidad, sensibilidad, exactitud, precisión, porcentaje de recuperación de acuerdo a lo reportado por IDEAM <sup>(8)</sup> y MILLER, J.C. <sup>(7)</sup>

**5.4.1 Diseño Experimental.** El diseño experimental utilizado para determinar sulfatos y Nitratos consiste en la evaluación de las muestras y el registro de resultados para cada grupo diario de ensayos, en cada uno de los métodos a validar. En total para cada método a evaluar, se realizan 7 tratamientos que consisten en siete ensayos durante siete días continuos. El grupo básico en cada ensayo está formado por 8 muestras a saber:

**Tabla 4. Grupo Básico de muestras**

Bl	Blanco de reactivos
Std 1	Estándar de concentración baja, que permita calcular el LDM
Std 2	Estándar de concentración media; aproximadamente al 50% del rango
Std 3	Estándar de concentración alta; aproximadamente al 90% del rango
M1	Muestra natural para ver efectos de la matriz real, concentración <50% del rango
M2	Muestra natural para ver efectos de la matriz real, concentración mayor que la de M1
M1ab	M1 fortificada con un nivel bajo, máximo el 30% del valor de M1
M1aa	M1 fortificada con un nivel alto, mínimo el 50% del valor de M1

Este grupo básico de muestras comprende entre dos y 15 réplicas. En esta etapa de corrida de los ensayos, es donde se obtienen todos los datos primarios y requiere que en su ejecución se cumplan ciertas condiciones mínimas como son:

- 1 El grupo básico de muestras se analiza en el mismo día corriendo todas las muestras

- 2 El proceso se inicia siempre a la misma hora y lo suficientemente temprano para que se pueda cumplir con el análisis de todas las muestras, teniendo en cuenta que pueden ocurrir imprevistos.
- 3 Todo el material de vidrio se lava previamente de acuerdo con el procedimiento establecido en el Laboratorio para cada uso.
- 4 El formato de captura de datos se diligencia en el mismo momento en que se obtienen los datos.

## 5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Con el objeto de validar los métodos utilizados para la valoración de Nitratos, Sulfatos y DBO se determina el coeficiente de variación, límites de detección, porcentaje de error, desviación estándar<sup>(7)</sup>, además de estadísticas como el Análisis de Varianza (ANOVA), pruebas paramétricas, no paramétricas utilizando el paquete estadístico SPSS <sup>(13)</sup>, con el objeto de resolver si hay diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de cada uno de los métodos y de saber si hay repetibilidad en sus datos.

## 5.6 ELABORACIÓN Y PRESENTACIÓN DE DOCUMENTOS

Como resultado de la validación se elaboran tres documentos que serán entregados única y exclusivamente al laboratorio ambiental de la CRC dada su confidencialidad, los cuales son:

**5.6.1. Protocolo de validación:** Se toma como referencia para la validación de los diferentes métodos haciendo los ajustes correspondientes para las características particulares de cada analito y de la técnica utilizada.

**5.6.2. Carpeta de soporte:** Contiene todos los documentos originales producidos durante el proceso de validación, las notas y observaciones del analista, hojas de captura de datos, cálculos, y demás información que permita la revisión del proceso y/o su replicación por otro analista o por otro laboratorio.

**5.6.3. Parámetros de validación:** Son los resultados finales del proceso, expresados en forma clara y de acuerdo con las convenciones que se utilicen por la literatura especializada en el tema.

## 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 6.1 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO RESPIROMÉTRICO PARA DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO<sub>5</sub>)

**6.1.1. Determinación de la cantidad de semilla o inóculo.** Con el propósito de definir el volumen apropiado de inóculo en la determinación de la DBO<sub>5</sub>, se realizan tres tratamientos que comprenden tres ensayos realizados durante 5 días, cada uno con 15 réplicas, relacionados en tabla 5.

**Tabla 5. Tratamientos para definir el volumen de semilla de inóculo**

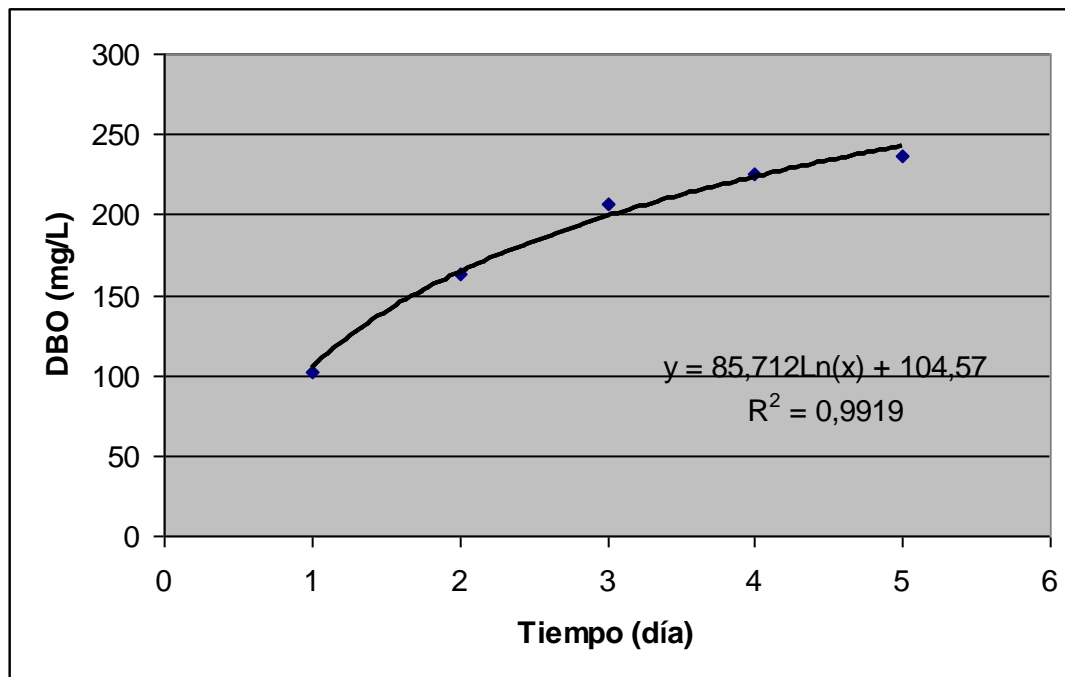
Tratamiento	Volumen de Blanco (Agua Dilución) (mL)	Volumen de Solución Patrón mL)	Volumen de Semilla inóculo (mL)
1	432	164	2
2	432	164	3
3	432	164	8

Los resultados de estos ensayos se presentan en las tablas 6 a 8 y en las figuras 4 a 6.

**Tabla 6. Valoración de la DBO<sub>5</sub> de Solución patrón con 2 mL de inóculo en función del tiempo**

Replica	DBO (mg/L)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
1	117,2	187,0	226,9	236,8	246,7
2	107,2	167,0	206,9	226,8	236,7
3	107,2	167,0	216,9	226,8	236,7
4	117,2	167,0	216,9	236,8	246,7
5	107,2	167,0	216,9	226,8	236,7
6	97,2	157,0	206,9	226,8	236,7
7	87,2	147,0	196,9	216,8	236,7
8	97,2	167,0	196,9	226,8	236,7
9	97,2	157,0	196,9	216,8	236,7
10	97,2	157,0	196,9	216,8	236,7
11	97,2	157,0	196,9	216,8	226,7
12	107,2	167,0	206,9	226,8	236,7
13	107,2	157,0	206,9	226,8	236,7
14	97,2	167,0	196,9	216,8	226,7
15	97,2	157,0	206,9	226,8	236,7
<b>Promedio:</b>	<b>102,6</b>	<b>163,0</b>	<b>206,2</b>	<b>224,8</b>	<b>236,7</b>

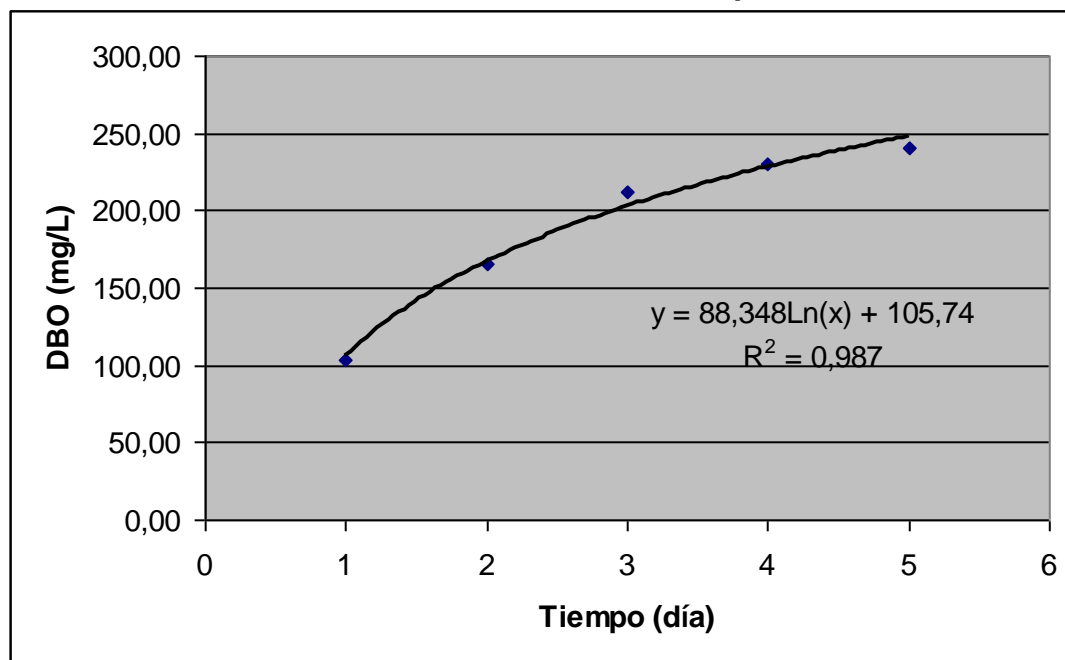
**Figura 4. Valoración de la DBO de Solución patrón con 2 mL de inóculo en función del tiempo**



**Tabla 7. Valoración de la DBO de la solución patrón valorado con 3 mL de inóculo en función del tiempo**

Replica	DBO (mg/L)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
1	95,3	164,8	214,2	224,0	234,0
2	95,3	154,8	204,2	224,0	234,0
3	25,3	134,8	184,2	214,0	224,0
4	95,3	154,8	204,2	224,0	234,0
5	85,3	154,8	204,2	224,0	234,0
6	105,3	164,8	214,2	234,0	244,0
7	115,3	174,8	224,2	234,0	244,0
8	105,3	164,8	214,2	234,0	244,0
9	115,3	174,8	224,2	234,0	244,0
10	125,3	184,8	224,2	244,0	254,0
11	115,3	174,8	214,2	234,0	244,0
12	125,3	164,8	214,2	234,0	244,0
13	135,3	184,8	224,2	244,0	254,0
14	115,3	174,8	214,2	234,0	234,0
15	95,3	154,8	204,2	224,0	234,0
<b>Promedio:</b>	<b>103,3</b>	<b>165,4</b>	<b>212,2</b>	<b>230,7</b>	<b>240,0</b>

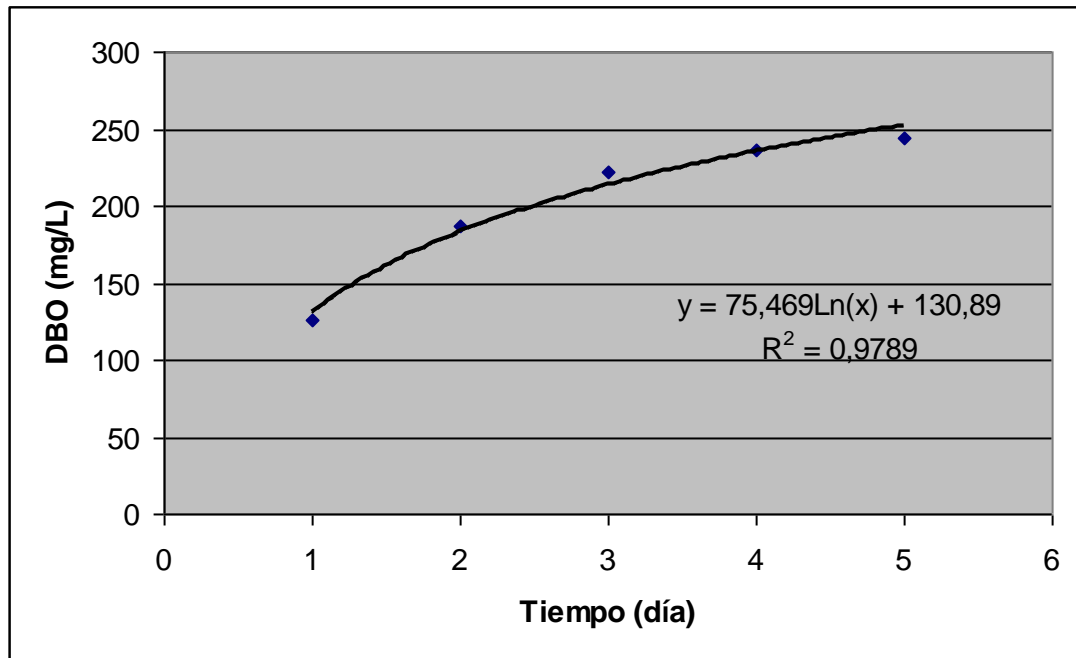
**Figura 5. Valoración de la DBO de la solución patrón valorado con 3 mL de inóculo en función del tiempo**



**Tabla 8. Valoración de la DBO de la solución patrón valorado con 8 mL de inóculo en función del tiempo**

Replica	DBO <sub>5</sub> (mg/L)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
1	121,5	188,9	227,9	237,0	246,5
2	121,5	188,9	217,9	237,0	246,5
3	101,5	168,9	217,9	237,0	246,5
4	121,5	188,9	217,9	237,0	236,5
5	121,5	178,9	217,9	227,0	236,5
6	121,5	178,9	217,9	227,0	236,5
7	121,5	188,9	217,9	237,0	236,5
8	121,5	188,9	227,9	237,0	246,5
9	121,5	188,9	217,9	237,0	246,5
10	141,5	198,9	227,9	237,0	246,5
11	131,5	198,9	227,9	237,0	246,5
12	131,5	188,9	217,9	237,0	246,5
13	131,5	198,9	227,9	237,0	246,5
14	141,5	198,9	227,9	247,0	246,5
15	131,5	168,9	227,9	237,0	246,5
<b>Promedio:</b>	<b>125,5</b>	<b>187,5</b>	<b>222,6</b>	<b>236,3</b>	<b>243,8</b>

**Figura 6. Valoración de la DBO de la solución patrón valorado con 8 mL de inóculo en función del tiempo**



En las tablas 6 a 8 y figuras 4 a 6 se observa una tendencia logarítmica en las gráficas respectivas de los 3 ensayos, indicando un desarrollo normal de la prueba, que implica una siembra adecuada, bacterias aclimatadas y buena respuesta del equipo. La DBO aumenta a medida que pasa el tiempo en forma logarítmica como se observa en la ecuación correspondiente a cada gráfica, de tal manera que inicialmente pequeños cambios en el tiempo producen grandes cambios en el valor de  $DBO_5$ , hasta el tercer día, a partir del cual los incrementos ya no son significativos.

En las tablas 9, 10, 11, 12 y 13 se reportan los resultados del análisis estadístico para las pruebas de la  $DBO_5$  con los volúmenes de inóculo en función del tiempo, que comprenden: Coeficiente de variación, porcentaje de error, estadísticos descriptivos, intervalos de confianza, error típico, desviación etc.; prueba de análisis de varianza la cual se hizo con el propósito de saber si hay diferencia significativa entre los tratamientos y la prueba de Duncan que indica entre cuales tratamientos está la diferencia y Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

En las tablas 9 y 10 se observa que la  $DBO_5$  para los 3 ensayos presenta un coeficiente de variación que está dentro de lo permitido por Standard Methods <sup>(14)</sup>, que es máximo 5%, y que el valor de la  $DBO_5$  se encuentra en el rango



establecido por dicha entidad comprendido entre  $260 \pm 30$ . Por lo tanto se puede apreciar que con los tres volúmenes ensayados hay presencia de microorganismos suficientes y aptos para oxidar la materia orgánica biodegradable.

El análisis de varianza reportado en la tabla 11, indica que hay diferencia significativa (sig. < 0.05) entre los tratamientos, es decir entre los diferentes dosis de volumen de inóculo ensayadas, pero no muestra entre cuales de ellas existe la diferencia. Por esto se aplica la prueba de Duncan (tabla 12), de donde se deduce que los tratamientos con 2 y 3 mL de inóculo no presentan diferencias significativas, de igual forma los tratamientos con 3 y 8 mL, pero, si hay diferencias significativa entre los tratamientos 2 y 8 mL de inóculo, por lo tanto si se toma 3 mL de inóculo es equivalente a tomar 2 u 8mL, Al aplicar la Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis se aprecia en la tabla 13 que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, en donde se aprecia además que existe una amplia variabilidad de los datos de DBO<sub>5</sub> correspondientes al ensayo con 3 mL de inóculo y por esto esta variable no se diferencia ni del ensayo con 2 ni con 8 mL. Por las anteriores razones se selecciona la dosis de 3 mL como la más apropiada.

**Tabla 9. Estadística de la Valoración de la DBO<sub>5</sub> de la solución patrón valorado con diferentes volúmenes de inóculo en función del tiempo**

Inoculo	Número de Replica	Promedio DBO <sub>5</sub>	Desviación Estándar	Coefficiente Variación	Exactitud (% Error)
2 mL	15	236,7 mg/L	5,3 mg/L	2,2 %	8,9 %
3 mL	15	240,0 mg/L	8,2 mg/L	3,4 %	7,6 %
8 mL	15	243,8 mg/L	4,5 mg/L	1,8 %	6,2 %

**Tabla 10 Descriptivos. Demanda Bioquímica de Oxígeno (mg/l)**

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
2 ml de Inóculo	15	236,6600	5,3452	1,3801	233,6999	239,6201
3 ml de Inóculo	15	240,0300	8,2808	2,1381	235,4443	244,6157
8 ml de Inóculo	15	243,8133	4,5774	1,1819	241,2785	246,3482
Total	45	240,1678	6,8050	1,0144	238,1233	242,2122

**Tabla 11 ANOVA. Demanda bioquímica de oxígeno (mg/L)**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	384,203	2	192,102	4,880	,012
Intra-grupos	1653,333	42	39,365		
Total	2037,537	44			

**Tabla 12. Prueba de Duncan para DBO<sub>5</sub>**

<b>DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (mg/L)</b>			
Duncan <sup>a</sup>			
TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
2 ml de Inóculo	15	236,6600	
3 ml de Inóculo	15	240,0300	240,0300
8 ml de Inóculo	15		243,8133
Sig.		,149	,106

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa tamaño de la muestra de la media armónica = 15,000.

**Tabla 13. Prueba de Kruskal-Wallis**

<b>Estadísticos de contraste<sup>a,b</sup></b>	
	DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (mg/L)
Chi-cuadrado	5,654
gl	2
Sig. asintót.	,059

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: TRATAMIENTOS

## 6.1.2 Evaluación del método Respirométrico en diferentes muestras de agua

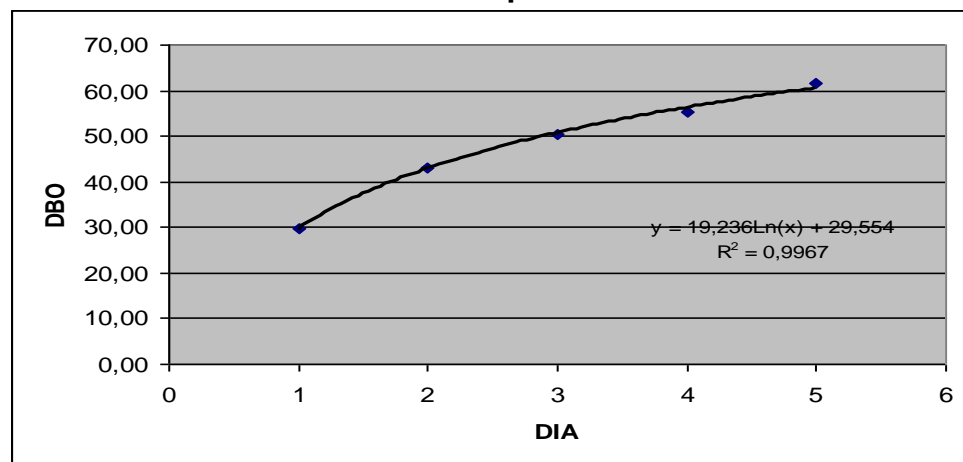
**6.1.2.1 Muestra del Río Ejido.** Para este ensayo se toma una muestra de agua del Río Ejido ubicado en el Barrio Edén, donde recibe algunas descargas de vertimientos residuales domésticos, antes del punto de muestreo generando alta carga contaminante. Estas aguas son caracterizadas principalmente por contener sustancias biodegradables y compuestos químicos domésticos como detergentes, microorganismos. Los resultados se reportan en la tabla 14. Los resultados indican que esta muestra presenta una DBO<sub>5</sub> promedio de 61.48 mg/L, superior al valor normal, (10 mg/L) reportado por la UNESCO <sup>(15)</sup>, para aguas impactadas por descargas de aguas residuales, particularmente cerca del punto de vertimiento, comportamiento esperado debido al vertimiento de las aguas mencionado anteriormente.

De acuerdo a la figura 7, la DBO<sub>5</sub> también presenta un comportamiento logarítmico similar al encontrado con el patrón de Glucosa.

**TABLA 14. Valoración de la DBO de la Muestra del Río Ejido en función del tiempo.**

Replica	DBO (mg/L)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
1	29,4	43,1	48,86	54,74	60,62
2	29,4	41,1	46,86	54,74	58,62
3	29,4	43,1	50,86	54,74	60,62
4	29,4	43,1	50,86	56,74	62,62
5	29,4	43,1	50,86	54,74	62,62
6	31,4	45,1	52,86	56,74	62,62
7	29,4	43,1	50,86	54,74	62,62
<b>Promedio:</b>	<b>29,69</b>	<b>43,10</b>	<b>50,29</b>	<b>55,31</b>	<b>61,48</b>

**Figura 7. Valoración de la DBO de la Muestra del Río Ejido en función del tiempo**



De acuerdo con la tabla 15, los resultados Estadísticos para este ensayo muestra un coeficiente de variación de 2.56%, aceptable de acuerdo al rango exigido por Standard Methods <sup>(14)</sup>, que es máximo 5%, indicando que hay buena repetibilidad, manifestada en el bajo valor de desviación estándar (1.57 mg/L).

**TABLA 15. Datos Estadísticos de la DBO<sub>5</sub> para muestras de Río Ejido**

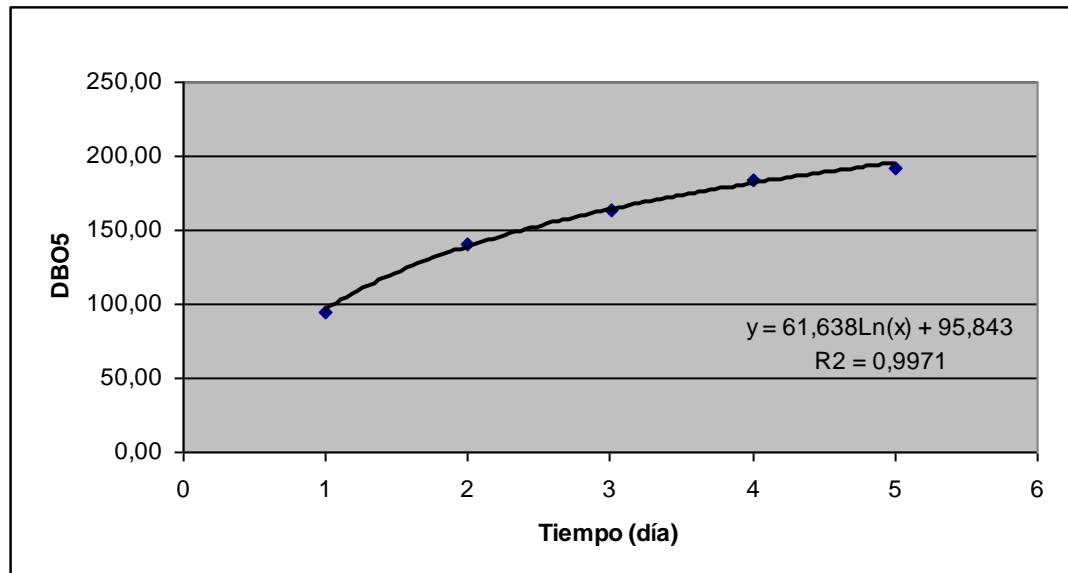
Inóculo	Numero de Replicas	Muestras	Promedio DBO <sub>5</sub>	Desviación Estándar	Coeficiente Variación
3 mL	7	Río Ejido	61.48 mg/L	1,57mg/L	2,56 %

**6.1.2.2 Muestra del Vertimiento de Aguas Residuales Domesticas.** Para este ensayo se tomó un vertimiento de aguas residuales domesticas ubicado en el Barrio Pandiguando. Los resultados se presentan en la tabla 16 y figura 8, de ellas se deduce que la DBO presenta un comportamiento logarítmico similar al de los tratamientos con solución patrón, donde pequeños cambios en el tiempo producen grandes cambios en el valor de DBO, hasta el tercer día, a partir del cual los incrementos ya no son significativos. Además, se observa que esta muestra presenta una DBO<sub>5</sub> de 192.1 mg/L, que según los rangos de clasificación de las aguas residuales domésticas planteados por Metcalf y Eddy <sup>(16)</sup>, está por debajo del rango de clasificación de concentración media a fuerte (220 - 400 mg/L de DBO<sub>5</sub>).

**TABLA 16. Valoración de la DBO de la Muestra del Vertimiento de Aguas Residuales Domésticas en función del tiempo.**

Replica	DBO (mg/L)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
1	88,92	128,47	158,2	178,02	187,84
2	88,92	128,47	158,2	178,02	177,84
3	88,92	128,47	158,2	178,02	187,84
4	98,92	148,47	168,2	188,02	197,84
5	98,92	148,47	168,2	188,02	197,84
6	98,92	148,47	168,2	188,02	197,84
7	98,92	148,47	168,2	188,02	197,84
<b>Promedio:</b>	<b>94,63</b>	<b>139,90</b>	<b>163,91</b>	<b>183,73</b>	<b>192,13</b>

**Figura 8. Valoración de la DBO de la Muestra del Vertimiento de Aguas Residuales Domésticas en función del tiempo**



Los resultados del análisis estadístico se reportan en la tabla 17, observándose un bajo coeficiente de variación (4.09%) de acuerdo a Standard Methods<sup>(14)</sup> que es máximo 5% indicando así repetibilidad de los datos. También se observa que la muestra del vertimiento presenta un valor de DBO<sub>5</sub>, 3 veces superior a la del Río Ejido como es de esperarse debido a su composición.

**TABLA 17. Datos Estadísticos para muestras de Vertimiento de Aguas Residuales Domésticas en función del tiempo**

Inoculo	Número de Replicas	Muestras	Promedio DBO <sub>5</sub>	Desviación Estándar	Coefficiente Variación
3 mL	7	Vertimiento A.R.D	192,1 mg/L	7,8 mg/L	4,09 %

A.R.D.: Aguas Residuales Domésticas

**6.1.3 Ensayo de agua de dilución para hallar límites de detección para la DBO.** El Agua de Dilución o Blanco contiene agua desionizada y una fuente de nutrientes tales como solución Tampón de fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>Cl), solución de sulfato de Magnesio, solución de Cloruro de Calcio, solución de cloruro férrico.

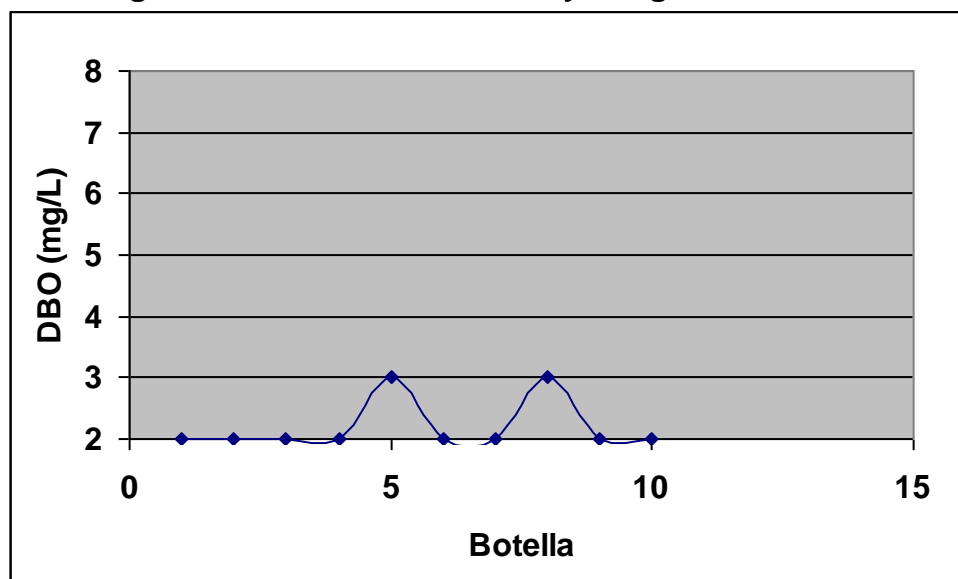
En la tabla 18 y figura 9 se reportan los datos correspondientes al agua de dilución para el cual se utilizaron 10 replicas; en el quinto día se obtuvo una DBO<sub>5</sub> promedio de 2.2 mg/L para el blanco, cuyo coeficiente de variación es de 19.2%,

superior a lo establecido por el Standard Methods<sup>(14,)</sup> que es máximo 5%, sin embargo, se obtiene una precisión adecuada de 0.5 mg/L. En la figura 10 se aprecia que únicamente 2 botellas de un total de 10, presentan un valor DBO<sub>5</sub> superior a 2 mg/L.

**TABLA 18. DBO<sub>5</sub> Agua de Dilución para hallar Límites de Detección**

Replica	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
1	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2
3	2	2	2	2	2
4	2	2	2	2	2
5	3	3	3	3	3
6	2	2	2	2	2
7	2	2	2	2	2
8	2	3	3	3	3
9	2	2	2	2	2
10	1	2	2	2	2
<b>Promedio:</b>	<b>2</b>	<b>2,2</b>	<b>2,2</b>	<b>2,2</b>	<b>2,2</b>

**Figura 9. Relación entre DBO<sub>5</sub> y el Agua de dilución**



Este ensayo también permite determinar el límite de detección instrumental, (concentración de analito mínima para producir una señal) mediante los resultados reportados en la tabla 19, valor correspondiente a 0.7 mg/L, El Límite de Detección del Método (LDM) es de 3.5 mg/L, este valor produce mayor confiabilidad, ya que corresponde a la concentración mínima que puede ser detectada. Además se calcula el Límite de Cuantificación, que aún cuando es menos utilizado en la práctica, se considera como el límite más bajo para

mediciones cuantitativamente precisas, siendo en este caso de 6.4 mg/L. Como se puede apreciar este método no es aconsejable para evaluar muestras con baja carga orgánica, ya que su coeficiente de variación es grande. Además el Límite de Detección del Método (LDM) no permitiría evaluar muestras con acertada confiabilidad, para valores inferiores a 3.5 mg/L.

**Tabla 19. Límites de Detección para DBO**

Replica	Muestra	Promedio DBO <sub>5</sub>	Desviación Estándar	Coeficiente Variación	LDI (8)	LDM (7)	LCM (7)
10	Agua de dilución	2,4 mg/L	0,5 mg/L	19.2%	0,7 mg/L	3,5 mg/L	6.4 mg/L

**LDI** Límite detección instrumental (1.645 s)

**LDM** Límite detección del Método (X + 3 s)

**LCM** Límite de cuantificación (X + 10 s)

s = Desviación estándar del blanco

X = Valor promedio de DBO<sub>5</sub> para el blanco

## 6.2 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINACIÓN DE NITRATOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA

Con el propósito de implementar el método para la determinación de nitratos en muestras de aguas superficiales, es necesario inicialmente definir y estandarizar la curva de calibración, su linealidad y determinar los límites de detección y sensibilidad del método

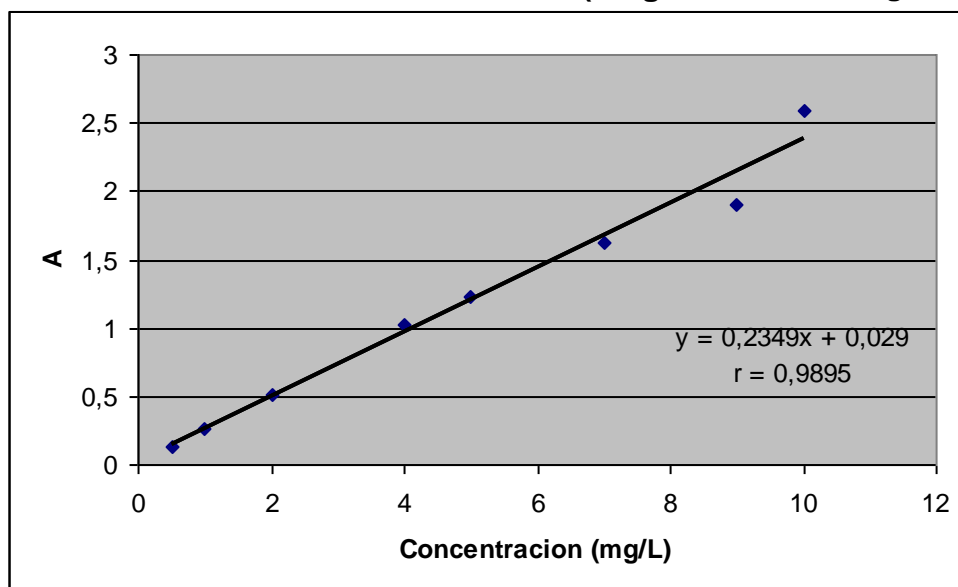
**6.2.1 Estandarización del método para determinación de Nitratos.** En el desarrollo de la estandarización de la técnica de monitoreo espectrofotométrico por ultravioleta para determinar nitratos en aguas, se elabora un protocolo inicial que permita definir los parámetros analíticos: precisión, exactitud, linealidad, límite de detección, sensibilidad, y de esta forma evaluar la eficiencia del método. Con el propósito de eliminar interferencias causadas por la materia orgánica en la lectura de nitratos para las muestras a 220 nm se utiliza el proceso de filtración de ellas a través de un papel filtro de 0.45 µ.

Inicialmente se busca determinar el rango de concentraciones de nitratos (mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/L) adecuado para elaborar la curva de calibración, con base en los valores usualmente encontrados en aguas superficiales<sup>(11)</sup>. Para ello se elige un rango comprendido entre 0,5 y 10 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/L, Los resultados se presentan en la tabla 20 y figura 10.

**Tabla 20. Curva de calibración de Nitrato (rango de 0.5 a 10 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/L)**

Concentración Nitrato (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/L)	Absorbancia
0,5	0,12977
1	0,26078
2	0,50941
4	1,0222
5	1,2334
7	1,6308
9	1,9034
10	2,587

**Figura 10. Curva de calibración de Nitrato (rango de 0.5 a 10 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/L)**



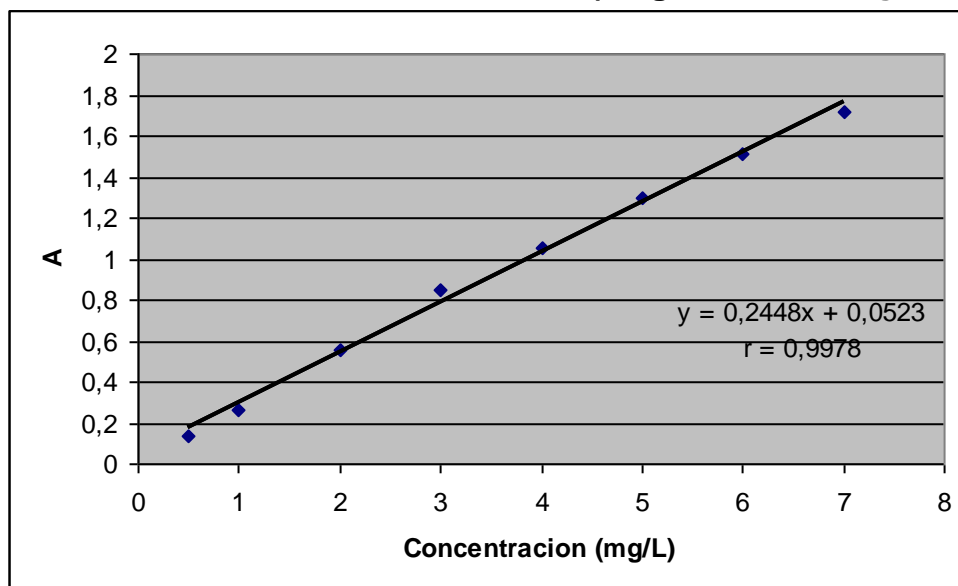
Aun cuando se observa una buena linealidad ( $r = 0.9895$ ), los datos correspondientes a las concentraciones de 9 y 10 mg/L, se alejan considerablemente de la línea recta. Por ello se elabora otra curva con un rango de concentraciones comprendido entre 0.5 y 7 mg/L y entre 0.5 y 6 mg/L. Los resultados se presentan en las tablas 21, 22 y figuras 11, 12



**Tabla 21. Curva de calibración de Nitrato (rango de 0.5 a 7 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/L)**

Concentración Nitrato (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/L)	Absorbancia
0,5	0,13595
1	0,2667
2	0,55582
3	0,85093
4	1,0531
5	1,2989
6	1,5148
7	1,7173

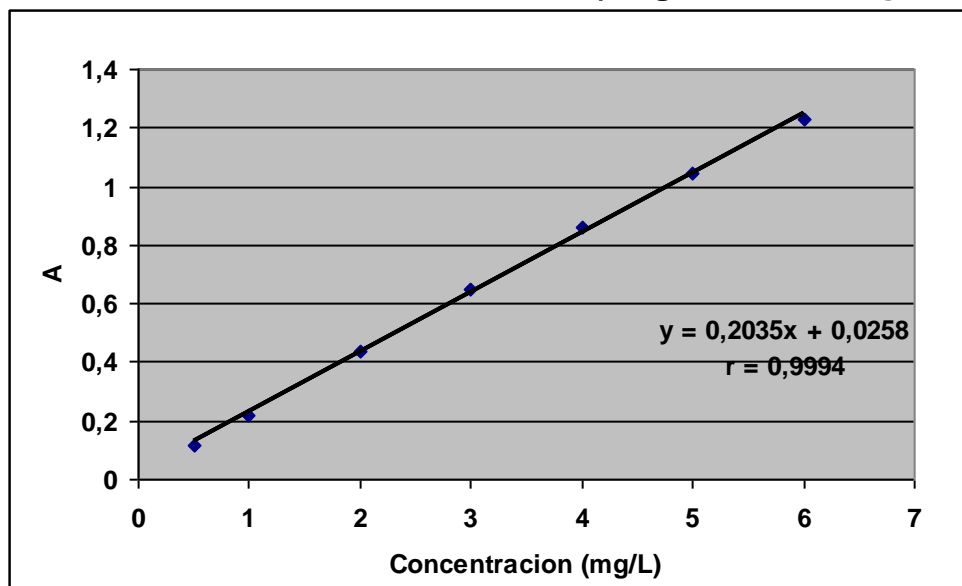
**Figura 11. Curva de calibración de Nitrato (rango de 0.5 a 7 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/L)**



**Tabla 22. Curva de calibración de Nitrato (rango de 0.5 a 6 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/L)**

Concentración Nitrato (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/L)	Absorbancia
0,5	0,11344
1	0,22194
2	0,44028
3	0,65194
4	0,85863
5	1,0437
6	1,2263

Figura 12. Curva de calibración de Nitrato (rango de 0.5 a 6 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/L)



De las tablas 21, 22 y figuras 11, 12 se deduce que la mejor linealidad ( $r = 0.9994$ ) la presenta la curva realizada con el rango de 0.5 a 6 mg/L de nitratos, por lo tanto, la máxima concentración adecuada para trabajar es la de 6 mg/L.

Con base en el rango seleccionado, se elaboran cinco curvas durante 5 días continuos para definir límites de detección, con rangos de concentración comprendidos entre 0.01, 0.05, 0.1, 1, 3, 5 y 6 mg/L, con 3 réplicas diarias para cada concentración, para un total de 15 replicas por concentración. Los resultados completos de la estandarización de la curva de nitratos se presentan en el anexo (tabla 1) y en la tabla 23 esta el resumen.

En ella se puede observar que los valores de absorbancia correspondientes a las concentraciones de 0.01 y 0.05 mg/L, presentan un coeficiente de variación muy alto de 178 y 75% respectivamente, muy superior al 10 % máximo valor admitido para este parámetro<sup>(17)</sup>. Por lo tanto estas dos concentraciones se descartan para el rango de trabajo. El coeficiente de variación para los valores de absorbancia correspondientes a las concentraciones de 0.1 a 6 mg/L, es inferior al 10%, implicando que las lecturas de las 15 replicas para cada una de las concentraciones tienen buena repetibilidad y que las soluciones presentan buena estabilidad, lo que asegura que el método analítico reporte datos con adecuado y comprobable grado de confianza.

**TABLA 23. Estandarización de la Curva de Nitratos**

Concentración (mg/L)	Número Replica	Absorbancia	Desviación Estándar	Coefficiente Variación (%)
0,01	15	2,0444E-03	0,0035	1,7830E+02
0,05	15	9,4670E-03	0,0071	7,5217E+01
0,1	15	2,5458E-02	0,0019	7,7127E+00
0,5	15	1,2591E-01	0,0039	3,1377E+00
1	15	2,5116E-01	0,0032	1,3042E+00
3	15	7,4103E-01	0,0048	6,5965E-01
5	15	1,1680E+00	0,0792	6,7867E+00
6	15	1,4171E+00	0.0125	8,8260E-01

De esta forma se define el rango de trabajo de 0.1 a 6 mg/L, sus absorbancias con su estadística se observan en la tabla 24. Además en esta tabla se indica el límite de detección instrumental (0.01mg/L), límite detección del método (0.10 mg/L) y el límite de cuantificación (0.30 mg/L) que son límites que permiten el trabajo de las muestras que llegan al laboratorio.

En la figura 13 se observa que si hay una relación lineal entre la absorbancia de las soluciones estándar obtenidas con el equipo (Espectrofotómetro ultravioleta visible -AGILENT 8453) y su respectiva concentración ya que su coeficiente de correlación es alto, ( $r = 0.9997$ ). Además se determinó la sensibilidad del equipo como 0.2355 mg/L que es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración.

**Tabla 24. Tratamiento Estadístico para la estandarización de la curva de Nitratos**

Concentración (mg/L)	Número Replica	Absorbancia	Desviación Estándar	Coefficiente Variación (%)	LDI (8)	LDM (7)	LCM (7)	linealidad	sensibilidad
0,01	15	2,0444E-03	0,0035	1,7830E+02	0.01	0,1	0,3	0.9997	0.2355 mg/L
0,05	15	9,4670E-03	0,0071	7,5217E+01					
0,1	15	2,5458E-02	0,0019	7,7127E+00					
0,5	15	1,2591E-01	0,0039	3,1377E+00					
1	15	2,5116E-01	0,0032	1,3042E+00					
3	15	7,4103E-01	0,0048	6,5965E-01					
5	15	1,1680E+00	0,0792	6,7867E+00					
6	15	1,4171E+00	0.0125	8,8260E-01					

**LDI** Límite detección instrumental (1.645 SB)

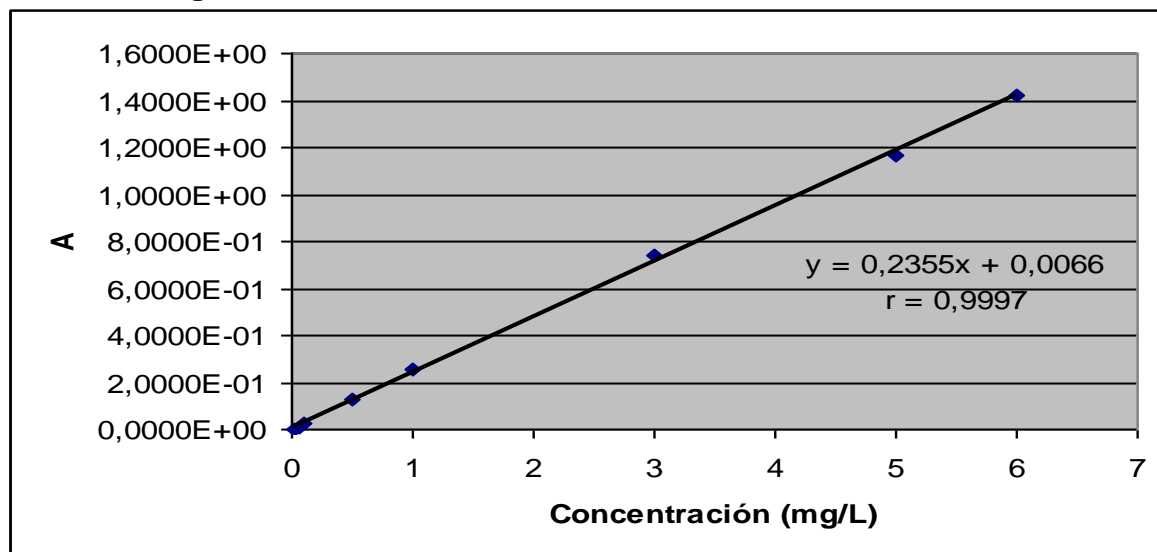
**LDM** Límite detección del Método (LDM= YB + 3 SB)

**LCM** Límite de cuantificación (LDM= YB + 10 SB)

YB: Intercepto de curva

SB: Error aleatorio en dirección Y

**Figura 13. Curva de calibración de Nitrato estandarizada**



En la tabla 25 se relaciona la estadística descriptiva de los resultados correspondientes a las curvas de calibración de nitratos en función del tiempo, durante los 5 días del ensayo y permite observar el comportamiento de las absorbancias por día para cada una de las soluciones estándar de Nitrato durante el proceso de estandarización de la curva. Se deduce de esta tabla que la desviación típica para los valores de absorbancia para cada uno de los días, es baja y está comprendida en el orden de  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  para la mayoría de los datos.

En la tabla 26 se relaciona la estadística de contrastes multivariados. En ella se aprecia que hay diferencia significativa entre los diferentes días del tratamiento para los diferentes valores de absorbancia (sig. = 0.000). Además se observa que la interacción días con absorbancia también demuestra diferencia significativa para la mayoría de las pruebas aplicadas (sig. = 0.000)

**Tabla 25. Estadística descriptiva**

**Estadísticos descriptivos**

	CONCENTRACION	Media	Desv. típ.	N
ABSORBANCIA DE NITRATOS DÍA UNO	,00	,0000	,0000	3
	,01	1,057E-03	3,556E-03	3
	,05	1,030E-02	2,972E-03	3
	,10	2,574E-02	5,091E-04	3
	,50	,1256	5,005E-03	3
	1,00	,2531	2,633E-03	3
	3,00	,7431	7,030E-03	3
	5,00	1,0523	,1339	3
	6,00	1,4065	1,192E-02	3
	Total	,4020	,5125	27
ABSORBANCIA DE NITRATOS DÍA DOS	,00	,0000	,0000	3
	,01	1,565E-03	6,342E-04	3
	,05	1,123E-02	4,131E-04	3
	,10	2,562E-02	2,613E-03	3
	,50	,1244	9,603E-04	3
	1,00	,2519	3,079E-04	3
	3,00	,7401	1,296E-03	3
	5,00	1,1838	1,762E-02	3
	6,00	1,4090	1,404E-02	3
	Total	,4164	,5321	27
ABSORBANCIA DE NITRATOS DÍA TRES	,00	,0000	,0000	3
	,01	2,773E-03	2,668E-03	3
	,05	1,095E-02	1,680E-03	3
	,10	2,519E-02	5,022E-04	3
	,50	,1229	3,407E-03	3
	1,00	,2462	1,455E-03	3
	3,00	,7409	6,260E-04	3
	5,00	1,2058	1,258E-02	3
	6,00	1,4301	9,166E-03	3
	Total	,4205	,5406	27
ABSORBANCIA DE NITRATOS DÍA CUATRO	,00	,0000	,0000	3
	,01	4,272E-03	6,606E-03	3
	,05	1,080E-02	2,389E-03	3
	,10	2,445E-02	3,373E-03	3
	,50	,1269	3,933E-03	3
	1,00	,2521	4,260E-03	3
	3,00	,7422	8,113E-03	3
	5,00	1,1999	9,444E-03	3
	6,00	1,4248	4,488E-03	3
	Total	,4206	,5381	27
ABSORBANCIA DE NITRATOS DÍA CINCO	,00	,0000	,0000	3
	,01	5,550E-04	3,979E-03	3
	,05	4,044E-03	1,678E-02	3
	,10	2,630E-02	2,324E-03	3
	,50	,1298	3,838E-03	3
	1,00	,2524	7,802E-04	3
	3,00	,7389	5,816E-03	3
	5,00	1,1983	3,517E-03	3
	6,00	1,4150	5,798E-03	3
	Total	,4184	,5361	27

**Tabla 26. Estadística de contrastes multivariados**

Contrastes <sup>c</sup>						
Efecto		Valor	F	GI de hipótesis	GI del gl	Sig.
DIAS	Traza de	,793	14,368 <sup>a</sup>	4,000	15,000	,000
	Lambda de	,207	14,368 <sup>a</sup>	4,000	15,000	,000
	Traza de	3,832	14,368 <sup>a</sup>	4,000	15,000	,000
	Raíz mayor de	3,832	14,368 <sup>a</sup>	4,000	15,000	,000
DIAS *	Traza de	1,569	1,453	32,000	72,000	,096
	Lambda de	,025	3,072	32,000	56,912	,000
	Traza de	18,192	7,675	32,000	54,000	,000
	Raíz mayor de	17,118	38,515 <sup>b</sup>	8,000	18,000	,000

a. Estadístico

b. El estadístico es un límite superior para la F el cual ofrece un límite inferior para significación

c. Diseño:  
Diseño intra sujetos:

En la tabla 27 se describe la estadística relacionada con las medias marginales estimadas, donde se aprecian los intervalos de confianza. Dicho valor es amplio cuando se trata de absorbancias correspondientes a concentraciones inferiores a 0.1 mg/L, corroborando así que el coeficiente de variación para estos valores es grande como se menciona anteriormente. Mientras que el intervalo de confianza para valores de absorbancia correspondientes a concentraciones superiores a 0.1 mg/L es mucho más estrecho, indicando un bajo coeficiente de variación para esos datos.

**Tabla 27. Medias marginales estimadas**

1. CONCENTRACIÓN (mg/L)

Medida: MEASURE\_1

CONCENTRACIÓN (mg/L)	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
,00	4,441E-17	,004	-8,623E-03	8,623E-03
,01	2,044E-03	,004	-6,579E-03	1,067E-02
,05	9,467E-03	,004	8,442E-04	1,809E-02
,10	2,546E-02	,004	1,683E-02	3,408E-02
,50	,126	,004	,117	,135
1,00	,251	,004	,243	,260
3,00	,741	,004	,732	,750
5,00	1,168	,004	1,159	1,177
6,00	1,417	,004	1,408	1,426

En la tabla 28 se relaciona la estadística correspondiente a las medias marginales estimadas de absorbancia para cada una de las concentraciones en cada día de ensayo. En ella se observa que los valores de absorbancia correspondientes a las concentraciones de 0.01 y 0.05 mg/L varían entre los diferentes días del ensayo, indicando que no hay repetibilidad en sus medidas en función del tiempo, corroborando así que presentan coeficientes de variación muy altos y que por lo tanto, se deben descartar del intervalo adecuado de medida, como se menciono anteriormente. Mientras que para concentraciones iguales o superiores a 0.1 mg/L, los valores de absorbancia presentan variaciones muy pequeñas confirmando lo manifestado anteriormente, en el sentido de que sus coeficientes de variación son pequeños y por lo tanto dichas concentraciones son las adecuadas para el rango de trabajo.

**Tabla 28. Medias marginales estimadas**

**3. CONCENTRACIÓN (mg/L) \* DIAS**

Medida: MEASURE\_1

CONCENTRACIÓN (mg/L)	DIAS	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
				Límite inferior	Límite superior
,00	1	,000	,026	-5,451E-02	5,451E-02
	2	,000	,004	-9,200E-03	9,200E-03
	3	,000	,003	-6,601E-03	6,601E-03
	4	,000	,003	-6,637E-03	6,637E-03
	5	2,220E-16	,004	-8,066E-03	8,066E-03
,01	1	1,057E-03	,026	-5,345E-02	5,556E-02
	2	1,565E-03	,004	-7,635E-03	1,076E-02
	3	2,773E-03	,003	-3,827E-03	9,374E-03
	4	4,272E-03	,003	-2,366E-03	1,091E-02
	5	5,550E-04	,004	-7,511E-03	8,621E-03
,05	1	1,030E-02	,026	-4,421E-02	6,481E-02
	2	1,123E-02	,004	2,034E-03	2,043E-02
	3	1,095E-02	,003	4,354E-03	1,755E-02
	4	1,080E-02	,003	4,166E-03	1,744E-02
	5	4,044E-03	,004	-4,021E-03	1,211E-02
,10	1	2,574E-02	,026	-2,877E-02	8,025E-02
	2	2,562E-02	,004	1,642E-02	3,482E-02
	3	2,519E-02	,003	1,859E-02	3,179E-02
	4	2,445E-02	,003	1,781E-02	3,108E-02
	5	2,630E-02	,004	1,823E-02	3,437E-02
,50	1	,126	,026	7,105E-02	,180
	2	,124	,004	,115	,134
	3	,123	,003	,116	,130
	4	,127	,003	,120	,134
	5	,130	,004	,122	,138
1,00	1	,253	,026	,199	,308
	2	,252	,004	,243	,261
	3	,246	,003	,240	,253
	4	,252	,003	,245	,259
	5	,252	,004	,244	,260
3,00	1	,743	,026	,689	,798
	2	,740	,004	,731	,749
	3	,741	,003	,734	,748
	4	,742	,003	,736	,749
	5	,739	,004	,731	,747
5,00	1	1,052	,026	,998	1,107
	2	1,184	,004	1,175	1,193
	3	1,206	,003	1,199	1,212
	4	1,200	,003	1,193	1,207
	5	1,198	,004	1,190	1,206
6,00	1	1,406	,026	1,352	1,461
	2	1,409	,004	1,400	1,418
	3	1,430	,003	1,424	1,437
	4	1,425	,003	1,418	1,431
	5	1,415	,004	1,407	1,423



Como se demostró anteriormente en la tabla 26 al hacer la estadística de contrastes multivariados, existe diferencia significativa entre los tratamientos, pero no muestra entre cuales hay diferencia, por esto se aplica la prueba de Duncan para saber entre cuales tratamientos existe la diferencia en cada uno de los días del ensayo. Los resultados se presentan en la tabla 29.

**Tabla 29. Prueba de Duncan para las curvas de calibración de Nitratos**

ABSORBANCIA DE NITRATOS DÍA UNO							
Dunca a.							
CONCENTRAC (mg/L)	N	Subconjun					
		1	2	3	4	5	6
,00	3	,000					
,01	3	1,057E-					
,05	3	1,030E-					
,10	3	2,574E-					
,50	3		,125				
1,0	3			,253			
3,0	3				,743		
5,0	3					1,052	
6,0	3						1,406
Sig.		,52	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos  
 Basado en la suma de  
 El término error es Media cuadrática (Error) =  
 a. Usa el tamaño muestral de la media  
 b. Alfa =

ABSORBANCIA DE NITRATOS DÍA DOS								
Duncan a,b								
CONCENTRACIÓN (mg/L)	N	Subconjunto						
		1	2	3	4	5	6	7
,00	3	,0000						
,01	3	1,565E-03						
,05	3	1,123E-02						
,10	3		2,562E-02					
,50	3			,1244				
1,00	3				,2519			
3,00	3					,7401		
5,00	3						1,1838	
6,00	3							1,4090
Sig.		,102	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.  
 Basado en la suma de cuadrados tipo III  
 El término error es Media cuadrática (Error) = 5,753E-05.  
 a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000  
 b. Alfa = ,05.

## Continuación Tabla 29

### ABSORBANCIA DE NITRATOS DÍA TRES

Duncan<sup>a,b</sup>

CONCENTRACIÓN (mg/L)	N	Subconjunto								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
,00	3	,0000								
,01	3	2,773E-03	2,773E-03							
,05	3		1,095E-02							
,10	3			2,519E-02						
,50	3				,1229					
1,00	3					,2462				
3,00	3						,7409			
5,00	3							1,2058		
6,00	3								1,4301	
Sig.		,540	,082	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es Media cuadrática (Error) = 2,961E-05.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

### ABSORBANCIA DE NITRATOS DÍA CUATRO

Duncan<sup>a,b</sup>

CONCENTRACIÓN (mg/L)	N	Subconjunto								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
,00	3	,0000								
,01	3	4,272E-03	4,272E-03							
,05	3		1,080E-02							
,10	3			2,445E-02						
,50	3				,1269					
1,00	3					,2521				
3,00	3						,7422			
5,00	3							1,1999		
6,00	3								1,4248	
Sig.		,352	,161	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es Media cuadrática (Error) = 2,994E-05.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

## Continuación Tabla 29

### ABSORBANCIA DE NITRATOS DÍA CINCO

Duncan<sup>a,b</sup>

CONCENTRACIÓN (mg/L)	N	Subconjunto						
		1	2	3	4	5	6	7
,00	3	,0000						
,01	3	5,550E-04						
,05	3	4,044E-03						
,10	3		2,630E-02					
,50	3			,1298				
1,00	3				,2524			
3,00	3					,7389		
5,00	3						1,1983	
6,00	3							1,41:50
Sig.		,491	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es Media cuadrática (Error) = 4,422E-05.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

De la tabla 29 se concluye que: los valores de absorbancia correspondientes a las concentraciones inferiores a 0.1 mg/L no son significativamente diferentes entre sí en cada uno de los días de ensayo, indicando nuevamente que por debajo de esta concentración no es adecuado para el rango de trabajo. El valor de absorbancia correspondiente a la concentración de 0.1 mg/L difiere significativamente de las dosis inferiores en la mayoría de los días del ensayo, por lo tanto se puede considerar adecuada para el rango de trabajo.

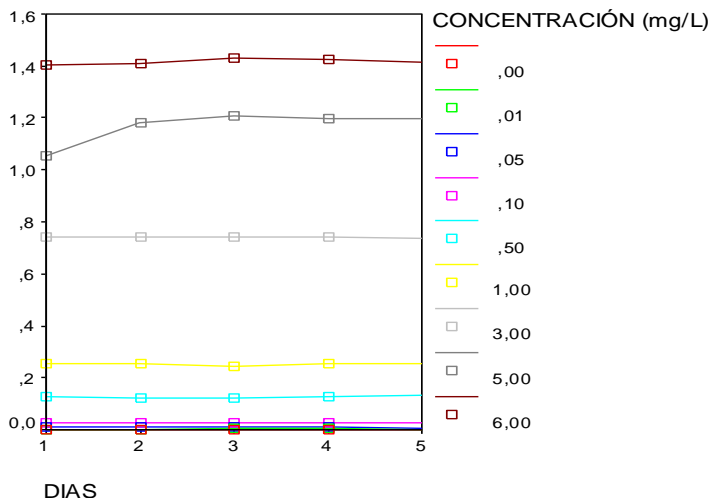
A partir de la concentración de 0.5 mg/L los valores de absorbancia correspondientes a cada concentración son significativamente diferentes entre sí para cada uno de los días del ensayo, mostrando que dichas concentraciones son adecuadas para el rango de trabajo.

Estas deducciones se confirman al observar la figura 14 en donde se muestra la relación entre los valores de absorbancia para cada concentración en función del tiempo del ensayo. En ella se observa que, por debajo de 0.1 mg/L todas las líneas correspondientes a cada concentración se unen formando una sola, mientras que a partir de esta concentración, cada una de ellas esta representada por una línea diferente.

Además tanto la tabla 29 de Duncan como la figura 14 permiten demostrar en general la estabilidad de cada una de las soluciones estándar por medio de su absorbancia a través del tiempo.

Con base en las consideraciones anteriores se puede deducir que el límite de detección del método estaría en 0.1 mg/L.

**Figura 14. Gráfico de perfil de Absorbancia de Nitratos en función del tiempo**



**6.2.2 Validación del método para la determinación de nitratos.** Una vez definidas las concentraciones que hacen parte de la curva de trabajo, y el límite de detección del método, se está asegurando que el método está implementado y que el equipo funciona en condiciones óptimas para la lectura de la muestras. Se procede entonces a definir el plan para la validación, donde se define el tipo y número de soluciones estándar, además se concreta las muestras naturales de agua que participaran durante los siete días del proceso.

**El grupo básico de soluciones estándar** comprende las concentraciones de 0.1, 0.5, 3 y 5 mg/L, preparadas a partir de una solución estándar de 100 mg/L. **El grupo de muestras** utilizado para la validación corresponden a muestras del Río Molino (M1) próximo a la Bocatoma, a partir de ésta se preparan las dos muestras, una fortificada de baja (**M1ab**) y otra de alta concentración (**M1aa**), en las tablas 30 y 31 se reportan los resultados de las concentraciones obtenidas durante los siete días del ensayo.

**Tabla 30. Resultados sobre las concentraciones de las soluciones estándar de Nitrato en función del tiempo**

Concentración Solución Estándar	Concentración Experimental (mg/L)						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7
0,1	0,09966	0,09982	0,09855	0,10157	0,10518	0,10629	0,10470
0,1	0,09213	0,09963	0,09863	0,10117	0,10239	0,10985	0,10407
0,1	0,11299	0,09746	0,09770	0,09978	0,10238	0,11912	0,10173
0,5	0,54412	0,52605	0,52520	0,53280	0,53551	0,55783	0,52630
0,5	0,53734	0,53564	0,52656	0,52919	0,53823	0,56228	0,52503
0,5	0,51103	0,53806	0,52588	0,53254	0,53933	0,58299	0,52448
3	3,12605	3,13483	3,11952	3,11303	3,11544	3,13789	3,09283
3	3,10921	3,12168	3,11413	3,11782	3,11812	3,12380	3,09003
3	3,20110	3,11459	3,11455	3,11909	3,11498	3,14158	3,09075
5	5,01952	5,04158	5,03097	5,04370	5,03818	5,06788	4,99279
5	5,11201	5,03309	5,03606	5,03224	5,03734	5,06152	5,01443
5	5,16419	5,03394	5,03988	5,03903	5,03479	5,06109	5,00636

**Tabla 31. Resultados sobre las concentraciones de las muestras del Río Molino en función del Tiempo**

Muestra Río	Concentración Experimental (mg/L)						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7
M1	1,90051	1,70849	1,70484	1,70467	1,72821	1,74862	1,73292
M1	1,80704	1,70675	1,70496	1,70115	1,72126	1,7521	1,72647
M1	1,81557	1,71061	1,70577	1,70102	1,72686	1,73975	1,71672
M1ab	2,18498	2,16924	2,17794	2,17246	2,19088	2,18305	2,1821
M1ab	2,19499	2,17039	2,17942	2,18379	2,18316	2,1856	2,17968
M1ab	2,18137	2,18774	2,18655	2,17938	2,18574	2,18386	2,18505
M1aa	2,48507	2,51807	2,51082	2,51061	2,51723	2,53903	2,51735
M1aa	2,52041	2,52406	2,51803	2,51196	2,52087	2,55388	2,51824
M1aa	2,52359	2,51858	2,51447	2,52007	2,52126	2,54743	2,51167

En las tablas 32 y 33 se reporta la estadística para las concentraciones de las soluciones estándar y muestras obtenidas durante los días del ensayo. En ambas tablas se observa que los coeficientes de variación y la precisión correspondientes a cada concentración encontrada son bajos, lo cual significa que existe una buena repetibilidad en las medidas durante este proceso, favoreciendo el desarrollo de la validación. La tabla 32 deja ver además que la exactitud existente durante el proceso de validación para cada una de las concentraciones de las soluciones estándar, es aceptable, ya que es inferiores al 10%, <sup>(17)</sup>.

**Tabla 32. Tratamiento estadístico de validación para soluciones estándar de Nitrate**

Concentración Solución estándar	Número de Replica	Concentración Experimental (mg/L)	Desviación Estándar	Coefficiente Variación (%)	Exactitud (% error)
0,1	3	0,10261	0,00561	5,45134	2,6092
0,5	3	0,53602	0,01576	2,93965	7,20367
3	3	3,12052	0,02068	0,66195	4,01748
5	3	5,04479	0,03541	0,70158	0,89581

En la tabla 33 se reportan los resultados de tratamiento estadístico para las concentraciones de las muestras del río fortificadas, obtenidas durante los siete días del ensayo. En todos los casos se observa un bajo coeficiente de variación, indicando repetibilidad de los resultados durante el tiempo del ensayo. Al fortificar la muestra **M1** con 0.50 mg/L, se debería obtener una concentración de 2.2364 mg/L en la muestra **M1ab**, la concentración encontrada experimentalmente es inferior, implicando un porcentaje de error del 2.42% bajo, atribuible a procesos de manipulación o al error del material de medida, que corresponde a un porcentaje de recuperación del 89%. La fortificación de la muestra **M1** con 0.84 mg/L implicaría obtener en la muestra **M1aa** una concentración de 2.550 mg/L, la concentración encontrada es ligeramente superior, con un error experimental del 1.17% muy bajo atribuible a las mismas causas explicadas anteriormente y que corresponde a un porcentaje de recuperación del 93%

**Tabla 33. Tratamiento estadístico de validación para las muestras**

Muestra	Número Replica	Concentración Experimental (mg/L)	Desviación Estándar	Coefficiente Variación (%)	Porcentaje de Recuperación (%)
M1	3	1,73639	0,04898	2,81742	
M1ab	3	2,18225	0,00624	0,28590	89
M1aa	3	2,52013	0,0138	0,54766	93

M1= Río Molino

M1ab= Muestras fortificada (con 0.50mg/L) de baja concentración

M1aa = Muestras fortificada (con 0.84 mg/L) de alta concentración

### 6.3 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO TURBIDIMÉTRICO PARA DETERMINACIÓN DE SULFATOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA.

Con el propósito de implementar el método para la determinación de Sulfatos en muestras de aguas superficiales, es necesario inicialmente definir y estandarizar la curva de calibración, su linealidad y determinar los límites de detección y sensibilidad del método

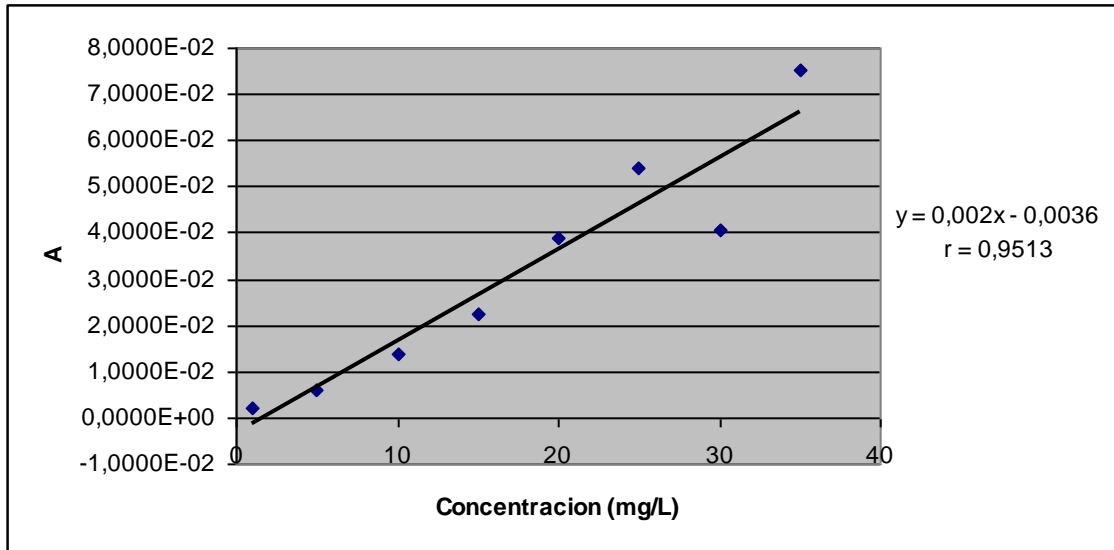
**6.3.1 Estandarización del método para determinación de Sulfatos.** En el desarrollo de la estandarización de la técnica turbidimétrica para determinar sulfatos en aguas, se elabora un protocolo inicial que permita definir los parámetros analíticos: precisión, exactitud, linealidad, límite de detección, sensibilidad, y de esta forma evaluar la eficiencia del método. Con el propósito de eliminar interferencias causadas por la materia orgánica en la lectura de Sulfatos para las muestras a 420 nm se filtran a través de un papel filtro de 0.45  $\mu$ .

Inicialmente se busca determinar el rango de concentraciones de Sulfatos ( $\text{mgSO}_4^{2-}$  /L) que presente la mejor relación lineal, para ello se eligió un rango comprendido entre 1 y 35 mg/L de sulfato, considerando los valores usualmente encontrados en aguas superficiales<sup>(12)</sup>. Los resultados se presentan en la tabla 34 y figura 15.

**Tabla 34. Curva de calibración de Sulfatos (Rango 1-35mg/L)**

<b>Concentración Sulfato (mg/L)</b>	<b>Absorbancia</b>
1	1.9641e-3
5	5.7955e-3
10	1.3971e-2
15	2.2628e-2
20	3.8891e-2
25	5.3993e-2
30	4.0581e-2
35	7.5206e-2

**Figura 15. Curva de calibración de Sulfato (Rango 1-35mg/L)**



De acuerdo a la figura 15, se puede observar que los datos de absorbancia están muy dispersos y no se ajustan a una línea recta, esto también se refleja en el bajo coeficiente de correlación ( $r = 0.95$ ), ya que en la practica analítica las gráficas de calibración proporcionan frecuentemente valores numéricos de  $r$  mayores que  $0.99^{(8)}$ , esto permite concretar que los datos de absorbancia no están linealmente relacionados con los de concentración.

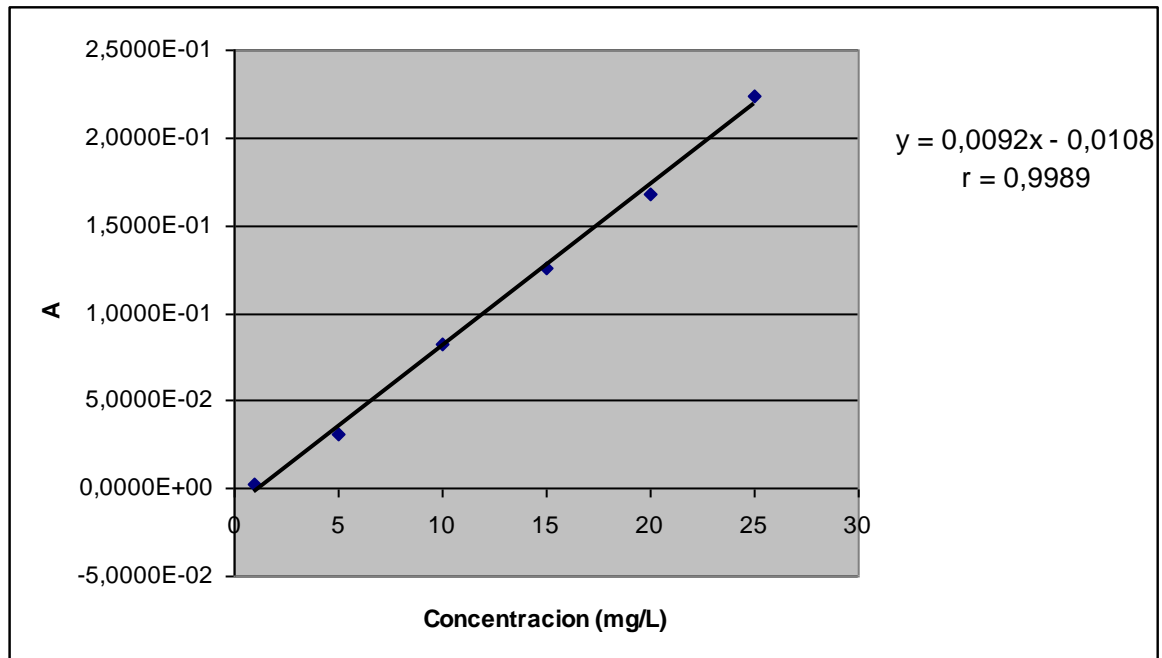
Por ello se elabora otra curva con un rango de concentración comprendido entre 1 y 25 mg/L, los resultados se presentan en la tabla 35 y figura 16.

**Tabla 35. Curva de calibración de Sulfatos (Rango 1-25mg/L)**

Concentración Sulfato (mg /L)	Absorbancia
1	2,4014E-03
5	3,1240E-02
10	8,1885E-02
15	1,2615E-01
20	1,6817E-01
25	2,2325E-01



**Figura 16. Curva de calibración de Sulfato (Rango 1-25mg/L)**



De la figura 16 se deduce que la máxima concentración aceptable para trabajar es 25 mg/L, ya que hasta este valor se obtiene una relación lineal con alto coeficiente de correlación ( $r = 0.9979$ ),

De acuerdo al rango seleccionado, se elaboran curvas para definir límites de detección, con rangos comprendidos entre 0.5, 1, 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L. Cada curva se analiza durante 7 días continuos. En la tabla 36 y figura 17 se presentan todos los datos de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones durante el proceso de estandarización de la curva de Sulfatos.

**Tabla 36. Estandarización de la Curva de calibración de Sulfatos**

<b>Concentración SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (mg/L)</b>	<b>Replica</b>	<b>Absorbancia</b>
0,5	1	5,3439E-03
0,5	2	1,7490E-03
0,5	3	1,1086E-03
0,5	4	4,7350E-03
0,5	5	2,8625E-03
0,5	6	4,7498E-03
0,5	7	2,3012E-03
1	1	1,1568E-02
1	2	1,1956E-02
1	3	1,2062E-02
1	4	1,1286E-02
1	5	1,2112E-02
1	6	1,3383E-02
1	7	1,2060E-02
5	1	3,3031E-02
5	2	3,3033E-02
5	3	3,1969E-02
5	4	3,2073E-02
5	5	3,2269E-02
5	6	3,6951E-02
5	7	3,1900E-02
10	1	6,6139E-02
10	2	7,3621E-02
10	3	6,7321E-02
10	4	6,9232E-02
10	5	6,9700E-02
10	6	7,4747E-02
10	7	6,8866E-02
15	1	1,0103E-01
15	2	1,0857E-01
15	3	1,0094E-01
15	4	1,0523E-01
15	5	1,0495E-01
15	6	1,0224E-01
15	7	1,0210E-01
20	1	1,3481E-01
20	2	1,3980E-01
20	3	1,4075E-01
20	4	1,3660E-01

<b>Continuación Tabla 36</b>		
20	5	1,4230E-01
20	6	1,3601E-01
20	7	1,3598E-01
25	1	1,7984E-01
25	2	1,7161E-01
25	3	1,7777E-01
25	4	1,7165E-01
25	5	1,7925E-01
25	6	1,7194E-01
25	7	1,7533E-01

En la tabla 37 se relacionan los resultados del tratamiento estadístico aplicado a los datos de la estandarización. En ella se puede observar que los valores de absorbancia correspondientes a la concentración de 0.5 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L, presentan un coeficiente de variación muy alto de 51%, muy superior al 10% máximo valor admitido para este parámetro<sup>(16)</sup>. Por lo tanto esta concentración se descarta para el rango de trabajo. Para las concentraciones de 1 a 25 mg/L, el coeficiente de variación es inferior al 10%, esto demuestra que hay repetibilidad en los datos de absorbancia durante los siete días del ensayo y que las soluciones son estables, certificando que el método reporta datos con adecuado y comprobable grado de confianza.

Además en esta tabla se indica el límite de detección instrumental (0.002mg/L), límite de detección del método (0.50 mg/L) y el límite de cuantificación (1.33 mg/L), que son límites adecuados para el trabajo en el laboratorio. También se determina la sensibilidad del equipo como 0.0069 mg/L que es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración.

En la figura 17 se observa una correlación lineal altamente significativa ( $r=0.9994$ ), entre la absorbancia de las soluciones estándar obtenidas con el equipo (Espectrofotómetro ultravioleta visible -AGILENT 8453) y su respectiva concentración.

**TABLA 37. Tratamiento Estadístico para la estandarización de la curva de Sulfatos**

Concentración (mg/L)	Número Replica	Absorbancia	Desviación Estándar	Coefficiente Variación (%)	LDI (8)	LDM (7)	LCM (7)	linealidad	sensibilidad
0.5	7	3,2643E-03	0,00166966	5,1149E+01	0.002	0,5	1,33	0.9994	0.0069
1	7	1.2061E-2	0,00065891	5,4632E+00					
5	7	3.3032E-02	0,0017922	5,4256E+00					
10	7	6.9947E-02	0,00315372	4,5088E+00					
15	7	1.0358E-01	0,00279755	2,7009E+00					
20	7	1,3804E-01	0,00287113	2,0800E+00					
25	7	1,7534E-01	0,00366361	2,0894E+00					

**LDI** Limite detección instrumental (1.645 SB)

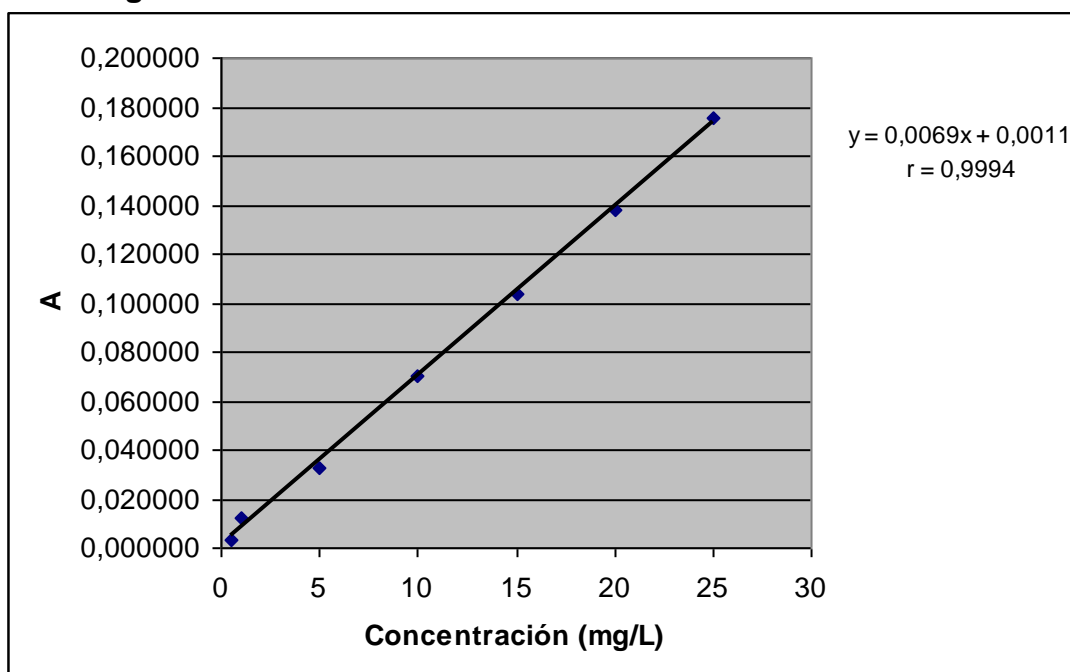
**LDM** Limite detección del Método (LDM= YB + 3 SB)

**LCM** Límite de cuantificación (LDM= YB + 10 SB)

YB: Intercepto de curva

SB: Error aleatorio en dirección Y

**Figura 17. Estandarización de la Curva de calibración de Sulfato**



En la tabla 38 se relaciona la estadística de contrastes multivariados para dicha estandarización. En ella se aprecia que el tiempo no influye en la variabilidad de las curvas de calibración o sea que no hay diferencia significativa para las absorbancias de las concentraciones durante los siete días (sig. > 0.05) del ensayo, esta independencia con respecto al tiempo se confirma con la

significancia obtenida de las pruebas de esfericidad de Mauchly relacionadas en las tablas 39 y 40 que también son superiores a 0.05.

**Tabla 38. Contrastes multivariados: Influencia del Tiempo**

Contrastes multivariados <sup>b</sup>						
Efecto		Valor	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Significación
TIEMPO	Traza de Pillai	.857	.997 <sup>a</sup>	6.000	1.000	.645
	Lambda de Wilks	.143	.997 <sup>a</sup>	6.000	1.000	.645
	Traza de Hotelling	5.980	.997 <sup>a</sup>	6.000	1.000	.645
	Raíz mayor de Roy	5.980	.997 <sup>a</sup>	6.000	1.000	.645

a. Estadístico exacto  
b.  
Diseño: Intercept  
Diseño intra sujetos: TIEMPO

**Tabla 39. Prueba de esfericidad de Mauchly: influencia del tiempo**

Prueba de esfericidad de Mauchly <sup>b</sup>							
Medida: MEASURE_1							
Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado aprox.	gl	Significación	Epsilon <sup>a</sup>		
					Greenhouse e-Geisser	Huynh-Feldt	Límite-inferior
TIEMPO	.000	30.375	20	.142	.385	.640	.167

Contrasta la hipótesis nula de que la matriz de covarianza error de las variables dependientes transformadas es proporcional a una matriz identidad.

a. Puede usarse para corregir los grados de libertad en las pruebas de significación promediadas. Las pruebas corregidas se muestran en la tabla Pruebas de los efectos inter-sujetos.

b.  
Diseño: Intercept  
Diseño intra sujetos: TIEMPO

**Tabla 40. Prueba de efectos intrasujetos**

**Pruebas de efectos intra-sujetos.**

Medida: MEASURE_1						
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
TIEMPO	Esfericidad asumida	2.748E-05	6	4.581E-06	.671	.674
	Greenhouse-Geisser	2.748E-05	2.311	1.189E-05	.671	.547
	Huynh-Feldt	2.748E-05	3.842	7.154E-06	.671	.613
	Límite-inferior	2.748E-05	1.000	2.748E-05	.671	.444
Error(TIEMPO)	Esfericidad asumida	.000	36	6.826E-06		
	Greenhouse-Geisser	.000	13.864	1.772E-05		
	Huynh-Feldt	.000	23.052	1.066E-05		
	Límite-inferior	.000	6.000	4.095E-05		

La tabla 41 justifica una vez mas que a medida que pasa el tiempo, los valores promedio de absorbancia obtenidos para cada curva de calibración de Sulfatos no son significativamente diferentes entre si, se puede ver que las medias oscilan entre 0.077 y 0.075 un intervalo muy pequeño, al igual que los intervalos de confianza, lo cual indica la repetibilidad que hay entre las curvas de calibración durante los siete días en los cuales se realizo el ensayo.

**Tabla 41. Medias marginales estimadas**

**TIEMPO**

Medida: MEASURE\_1

TIEMPO	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
1	.075	.025	.014	.137
2	.076	.025	.015	.138
3	.075	.026	.013	.138
4	.075	.025	.015	.136
5	.077	.026	.014	.140
6	.076	.024	.017	.136
7	.075	.025	.013	.136

En la tabla 42 también se aprecia que los valores promedios de absorbancia correspondientes a cada concentración durante los siete días del ensayo no varían significativamente, presentando errores típicos muy bajos y coeficientes de variación bajos, confirmando nuevamente la repetibilidad de los datos

**Tabla 42. Medias marginales estimadas**

**Estimaciones**

Variable dependiente: ABSOR

CONCEN	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
.50	.003 <sup>a</sup>	.001	.001	.005
1.00	.007 <sup>a</sup>	.001	.005	.009
5.00	.033 <sup>a</sup>	.001	.031	.035
10.00	.070 <sup>a</sup>	.001	.068	.072
15.00	.104 <sup>a</sup>	.001	.102	.106
20.00	.138 <sup>a</sup>	.001	.136	.140
25.00	.175 <sup>a</sup>	.001	.173	.177

a. Las covariables que aparecen en el modelo se evalúan en los siguiente valores: DIA = 4.0000.

En la tabla 43 se relaciona la prueba estadística de Bonferroni, cuyo propósito es comparar entre sí todos los datos promedio de absorbancia correspondientes a cada concentración, para determinar la diferencia significativa entre ellos. De ellas se deduce que al comparar el valor promedio de absorbancia para la concentración de 0.5 mg/L con los valores de absorbancia promedio de las otras concentraciones se encuentra que es significativamente diferente con respecto a las absorbancias de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L, pero no lo es con respecto al valor de absorbancia correspondiente a la concentración de 1 mg/L, ya que su significancia es de 0.473, superior a sig. 0.05, adjudicando así una similitud entre ellas.

El valor promedio de absorbancia correspondiente a la concentración de 1 mg/L, es significativamente diferente a los valores de absorbancia promedio de las otras concentraciones a excepción del valor de absorbancia correspondiente a la concentración de 0.5 mg/L donde también presenta una significancia de 0.473 superior a sig. 0.05, confirmando la similitud entre ellas.

Además en esta tabla se aprecia que existen diferencias altamente significativas entre los valores promedio de absorbancias correspondientes a todas las demás concentraciones (5, 10, 15, 20 y 25 mg/L) ya que presentan un sig. = 0.000, comportamiento esperado para el desempeño normal de la curva de trabajo.

**Tabla 43. Comparaciones múltiples de Bonferroni**

Comparaciones por pares						
Variable dependiente: ABSOR						
(I) CONCEN	(J) CONCEN	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
.50	1.00	-.003	.001	.473	-.008	.001
	5.00	-.030*	.001	.000	-.034	-.025
	10.00	-.067*	.001	.000	-.071	-.062
	15.00	-.100*	.001	.000	-.105	-.096
	20.00	-.135*	.001	.000	-.139	-.130
	25.00	-.172*	.001	.000	-.177	-.168
1.00	.50	.003	.001	.473	-.001	.008
	5.00	-.026*	.001	.000	-.031	-.022
	10.00	-.063*	.001	.000	-.068	-.059
	15.00	-.097*	.001	.000	-.102	-.093
	20.00	-.132*	.001	.000	-.136	-.127
	25.00	-.169*	.001	.000	-.173	-.164
5.00	.50	.030*	.001	.000	.025	.034
	1.00	.026*	.001	.000	.022	.031
	10.00	-.037*	.001	.000	-.041	-.032
	15.00	-.071*	.001	.000	-.075	-.066
	20.00	-.105*	.001	.000	-.109	-.101
	25.00	-.142*	.001	.000	-.147	-.138
10.00	.50	.067*	.001	.000	.062	.071
	1.00	.063*	.001	.000	.059	.068
	5.00	.037*	.001	.000	.032	.041
	15.00	-.034*	.001	.000	-.038	-.029
	20.00	-.068*	.001	.000	-.073	-.064
	25.00	-.105*	.001	.000	-.110	-.101
15.00	.50	.100*	.001	.000	.096	.105
	1.00	.097*	.001	.000	.093	.102
	5.00	.071*	.001	.000	.066	.075
	10.00	.034*	.001	.000	.029	.038
	20.00	-.034*	.001	.000	-.039	-.030
	25.00	-.072*	.001	.000	-.076	-.067
20.00	.50	.135*	.001	.000	.130	.139
	1.00	.132*	.001	.000	.127	.136
	5.00	.105*	.001	.000	.101	.109
	10.00	.068*	.001	.000	.064	.073
	15.00	.034*	.001	.000	.030	.039
	25.00	-.037*	.001	.000	-.042	-.033
25.00	.50	.172*	.001	.000	.168	.177
	1.00	.169*	.001	.000	.164	.173
	5.00	.142*	.001	.000	.138	.147
	10.00	.105*	.001	.000	.101	.110
	15.00	.072*	.001	.000	.067	.076
	20.00	.037*	.001	.000	.033	.042

Basadas en las medias marginales estimadas.

\*. La diferencia de las medias es significativa al nivel .05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.



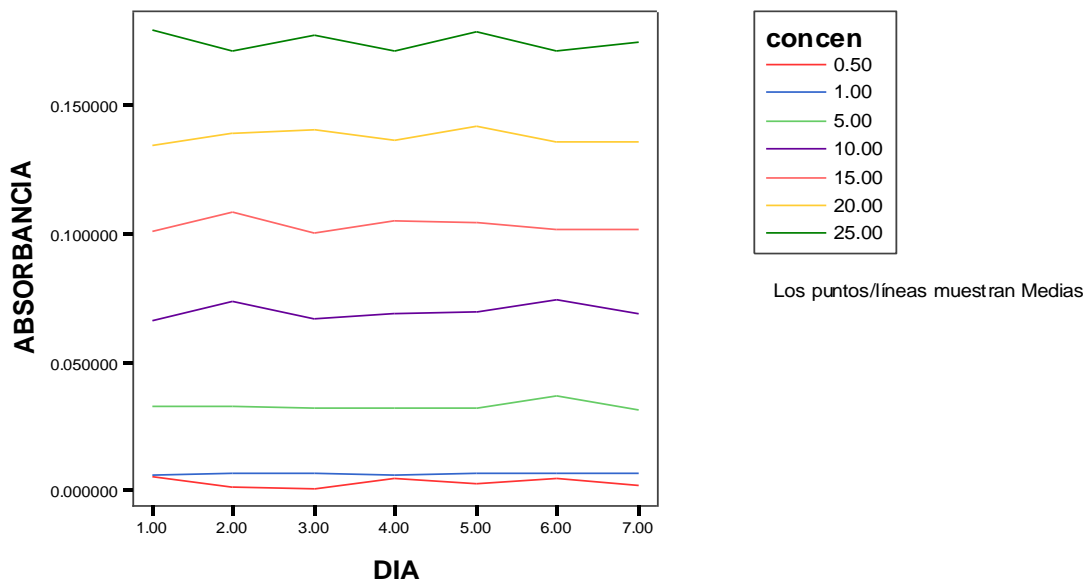
Por lo tanto se puede deducir de este tratamiento estadístico, que los valores promedio de absorbancia correspondientes a las concentraciones de 0.5 y 1 mg/L no son significativamente diferentes entre sí, indicando que no es adecuado utilizar concentraciones por debajo de 1 mg/L para el rango de trabajo. Mientras que partir de la concentración de 5 mg/L los valores de absorbancia correspondientes a cada concentración son significativamente diferentes entre sí para cada uno de los días del ensayo, mostrando que dichas concentraciones sí son adecuadas para el rango de trabajo.

Estas deducciones se confirman al observar la figura 18 en donde se muestra la relación entre los valores de absorbancia para cada concentración de sulfatos en función del tiempo del ensayo. En ella se observa que, para las concentraciones de 0.5 y 1 mg/L las líneas correspondientes a cada concentración tienden a unirse, mientras que a partir de esta concentración, cada una de ellas esta bien definidas y separadas por una línea diferente.

Además tanto la tabla 43 como la figura 18 permiten demostrar en general las diferencias y la estabilidad de cada una de las soluciones estándar por medio de su absorbancia a través del tiempo.

Con base en las consideraciones anteriores se puede deducir que el límite de detección del método estaría en 1 mg  $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$ , aún cuando se detectan valores inferiores a esta concentración, como se demuestra al determinar este límite mediante la ecuación: **LDM** Limite detección del Método ( $\text{LDM} = \text{YB} + 3 \text{ SB}$ ), obtenida del tratamiento estadístico relacionado en la tabla 36, pero su determinación no sería confiable estadísticamente.

**Figura 18. Gráfico de perfil de Absorbancia de Sulfato en función del tiempo**



**6.3.2 Validación del método para la determinación de Sulfatos.** Una vez definidas las concentraciones que hacen parte de la curva de trabajo para la determinación de Sulfatos, y el límite de detección del método, se está asegurando que el método está implementado y que el equipo funciona en condiciones óptimas para la lectura de la muestras. Se procede entonces a definir el plan para la validación, donde se define el tipo y número de soluciones estándar, además se concreta las muestras naturales de agua que participaran durante los siete días del proceso.

**El grupo básico de soluciones estándar** comprende las concentraciones de 1, 10 y 20 mg/L, preparadas a partir de una solución estándar de 100 mg/L de sulfato. **El grupo de muestras** utilizado para la validación corresponden a muestras del Río Molino (M1) próximo a la Bocatoma, a partir de esta se preparan las dos muestras: fortificadas: una fortificada de baja (**M1ab**) y otra de alta concentración (**M1aa**), además se utiliza otra muestra (**M2**) tomada de la quebrada de la Granja INEM, en la tabla 44 y 45 se reporta los resultados de las concentraciones obtenidas durante siete días en dicha validación

**Tabla 44. Resultados sobre las concentraciones de Sulfatos de las soluciones estándar en función del tiempo**

Concentración Solución estándar	Concentración (mg/L)						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7
1	1,06043	1,05500	1,08586	1,07857	0,97883	0,91643	1,07011
1	1,06614	1,07857	1,10757	1,07143	1,03966	0,97754	1,07671
10	9,94286	9,98571	9,98571	9,07914	9,22529	8,76486	9,24500
10	10,00000	9,11157	9,08357	9,11443	9,94429	10,00000	9,44857
20	19,80000	19,60857	19,95714	19,53571	19,37571	20,00000	19,94286
20	19,82857	19,58000	19,94286	19,57857	19,38143	20,02857	19,96143

**Tabla 45. Resultados sobre las concentraciones de Sulfatos de las muestras en función del Tiempo**

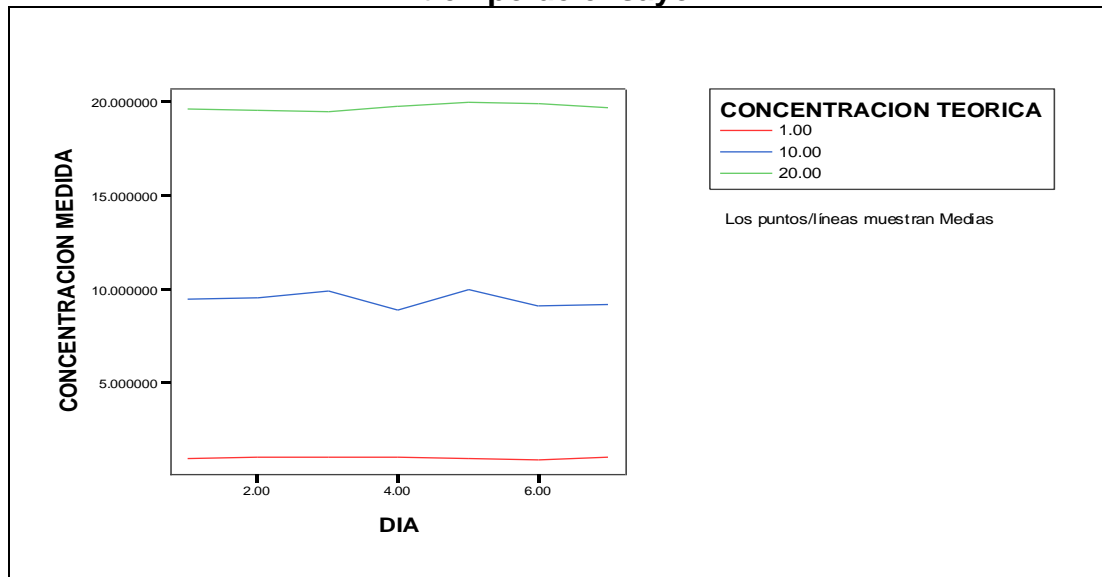
Muestra Río	Concentración (mg/L)						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7
M1	2,64420	2,57333	2,51319	2,73159	2,64116	2,63246	2,65797
M1	2,60870	2,56783	2,52464	2,74928	2,65797	2,61449	2,64290
M2	12,96710	13,48652	13,84043	13,95652	13,89580	13,86609	13,05754
M2	13,80507	13,78986	13,69696	13,81594	13,75246	13,76971	12,91594
M1ab	3,39159	3,29217	3,35449	3,34058	3,21246	3,39710	3,11942
M1ab	3,26391	3,09444	3,49159	3,25246	3,25871	3,40974	3,26928
M1aa	4,02401	4,09581	4,11913	4,03291	3,71667	3,94725	4,04348
M1aa	4,11072	3,98702	4,07449	4,17920	3,72014	3,99768	4,07319

En las tabla 46 se reportan los resultados de tratamiento estadístico para las concentraciones de las soluciones estándar obtenidas durante los siete días del ensayo. En ella se observa que los coeficientes de variación, correspondientes a cada concentración determinada son inferiores al 10% , el porcentaje de error es inferior al 5%, indicando repetibilidad en las medidas durante este proceso, favoreciendo el desarrollo de la validación del método. Estos resultados se aprecian también en la figura 19 en donde se observa que en general se encuentra los mismos valores de concentración para cada solución estándar en función del tiempo de ensayo, la concentración que mas variación presenta es la correspondiente a 10 mg/L, indicando que sus resultados se alejan mas del real, sin embargo la diferencia es aceptable ya que el error es del 5%.

**Tabla 46. Tratamiento estadístico de validación para soluciones estándar**

Concentración Solución Estándar	Número Replica	Concentración Experimental (mg/L)	Desviación Estándar	Coficiente Variación (%)	Exactitud (% error)
1.0	2	1,047	0,05229	4,993	4,74
10.0	2	9,495	0,47181	4,969	5,05
20.0	2	19,752	0,24331	1,232	1,24

**Figura 19. Gráfico de perfil de concentraciones de Sulfato en función del tiempo de ensayo**



En la tabla 47 se reportan los resultados de tratamiento estadístico para las concentraciones de las muestras de río naturales y fortificadas, obtenidas durante los siete días del ensayo. En todos los casos se observa un bajo coeficiente de variación, indicando repetibilidad de los resultados durante el tiempo del ensayo. Al fortificar la muestra **M1** con 0.70 mg/L, se debería obtener una concentración de 3.326 mg/L en la muestra **M1ab**, la concentración encontrada experimentalmente es ligeramente inferior, implicando un porcentaje de error del 0.09% muy bajo, atribuible a procesos de manipulación o al error del material de medida, que corresponde aun porcentaje de recuperación del 95.7%. La fortificación de la muestra **M1** con 1.36 mg/L implicaría obtener en la muestra **M1aa** una concentración de 3.986 mg/L, la concentración encontrada es ligeramente superior, con un error experimental del 0.6% muy bajo atribuible a las mismas causas explicadas anteriormente, y que corresponde aun porcentaje de recuperación del 102%..

**Tabla 47. Tratamiento estadístico de validación para las muestras**

<b>Muestra</b>	<b>Número Replica</b>	<b>Concentración Experimental (mg/L)</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Coefficiente Variación (%)</b>	<b>Porcentaje de Recuperación (%)</b>
M1	2	2,626	0,070	2,666	
M2	2	13,615	0,372	2,732	
M1ab	2	3,296	0,115	3,477	95.7
M1aa	2	4,009	0,142	3,530	102

M1= Río Molino

M2= Quebrada cerca de Granja INEM

M1ab= Muestras fortificada (con 0.70mg/L) de baja concentración

M1aa = Muestras fortificada (con 1.36 mg/L) de alta concentración

De todas las consideraciones anteriores se puede deducir que el método para la determinación de Sulfatos en muestras de aguas superficiales queda debidamente implementado.

## 7. CONCLUSIONES

1. El inóculo de Aguas Residuales Domésticas de la vereda Gonzáles, presenta características adecuadas para la validación de la técnica y su volumen óptimo es de 3 mL.
2. El método Respirométrico utilizado para evaluar el parámetro de  $\text{DBO}_5$ , asegura reproducibilidad.
3. La muestra del Río Ejido presenta un valor de  $\text{DBO}_5$  de 61.48 mg/L, indicando una fuerte contaminación probablemente por descargas de aguas residuales.
4. El  $\text{DBO}_5$  para la muestra del Vertimiento de Aguas Residuales Domésticas es de 192.1 mg/L inferior al rango de clasificación de concentración media a fuerte (220- 400 mg/L) según Metcalf.
5. El método respirométrico es adecuado para cuantificar  $\text{DBO}_5$  superiores o iguales a 6.4 mg/L.
6. El método para determinación de Nitratos en el rango entre 0.1 a 6 mg/L es lineal, sensible, preciso y exacto para análisis de aguas superficiales.
7. El método para determinación de Sulfatos es lineal, sensible, preciso y exacto para análisis de aguas superficiales, en el rango comprendido entre 1 a 25 mg/L.
8. Se logró la validación de los métodos analíticos: Respirométrico para la determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno ( $\text{DBO}_5$ ), Espectrofotometría de Ultravioleta en la determinación de Nitratos, y

Turbidimetría para Sulfatos como parte fundamental dentro del proceso de acreditación bajo la norma ISO 17025 que adelanta la CRC para análisis de aguas.

## BIBLIOGRAFIA

1. NORRIS, R. & C. HAWKINS. Monitoring river health. *Hydrobiología* 435: 5-17. 2000.
2. QUE ES EL AGUA. Tomado de Internet el 3 de marzo de 2005. <http://www.aguamarket.com>
3. MINISTERIO DE SALUD. Normas Técnicas de Calidad del Agua Potable. Decreto 475 de marzo 10 de 1998
4. La Importancia del DBO en los análisis de agua. Tomado de Internet el 1 de Febrero de 2005. <http://www.catlab.com.ar/notas.php?idm=98&accion1=notas>
5. Min, B. D. Logan, B.E. 2004. A Simplified HBOD Test Protocol Based on Oxygen Measurements using a Fiber Optic (HBOD) Probe. *Water Environ. Res.*, 76(1):39-47.
6. HARRIS, D. Análisis Químico Cuantitativo. 3ed. México. Grupo Editorial Iberoamerica. 1992. p. 35-62, 495-566.
7. MILLER, J.C. and MILLER J.N. Estadística para Química Analítica. 2ª ed. Addison-Wesley Iberoamerican, S.A. Estados Unidos. 1993. 211 p.
8. IDEAM. Programa de Físicoquímica Ambiental. Protocolo estandarización de métodos analíticos. Bogotá, 1999. 10 p.
9. PAEZ, L. MERCK. Comunicación Personal. 2005
10. MERCK. Instrumentos para medir la Demanda Bioquímica de Oxígeno, Método Respirométrico.



11. IDEAM. Programa de Fisicoquímica Ambiental. Protocolo para Análisis de Aguas. Nitrato. Monitoreo por Espectrofotometría Ultravioleta. 1997. 8 P.
12. IDEAM. Programa de Fisicoquímica Ambiental. Protocolo para Análisis de Aguas. Sulfato. Turbidimetría. 1997
13. SPSS, Statistical Package for the Social Sciences, Version 8.
14. STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 20<sup>th</sup> Edition. Respirometric Method. Section 5210 D.
15. UNESCO. Water Quality Assessments. Londres. Reino Unido. 1996
16. METCALF Y EDDY. Ingeniería de Aguas Residuales. Tratamiento, Vertido y Reutilización. Tercera Edición. Madrid, España. (1995).
17. SÁNCHEZ, Diana. Validación de Métodos para la Determinación en Aguas Superficiales de Metales Alcalinos (Sodio y Potasio) por Absorción Atómica a la Llama y Alcalinotérreos (Calcio y Magnesio) por Volumetría con EDTA. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Facultad de Ciencias y Educación, Proyecto de Licenciatura en Química. Bogotá. 2002. 90 P
18. AGILENT TECHNOLOGIES. Operator's Manual. Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System. Germany. 99 p. 2000
19. CALDERÓN, Felipe. PAVLOVA, Margarita. Investigación sobre el uso de Botellas Respirométricas para la Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno. Dr. Calderón Laboratorios Ltda. Bogotá D.C., Colombia S.A. Septiembre 22 de 2004
20. CALDERÓN, Felipe. PAVLOVA, Margarita. Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>). Determinación Mediante el uso de Botellas Respirométricas el Efecto de la Concentración del Buffer de Fosfato sobre el pH y el Resultado del Proceso. Dr. Calderón Laboratorios Ltda. Bogotá D.C., Colombia S.A. Abril 29 de 2001

21. CARDENAS, J. Manual de Calidad de Aguas para Estudiantes. Bogota. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Facultad de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2002
22. CENTRO NACIONAL DEL AGUA. Programa de Capacitación, Plantas de tratamiento. Aguas del Huila S.A. 134 p.
23. CORPORACION AUTONOMA REGIONAL DEL CAUCA. Portafolio Laboratorio Ambiental. Popayán. 6 p.
24. CUBILLÁN, *Dalia. et al.* Optimization of the potentiometric technique with ion selective electrode for evaluating sulfate ion in aqueous samples. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia v.25 n.2 Maracaibo Venezuela. 2002
25. EATON, A. et al. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health. 19 th ed. 1995. p. 4.136-4.137, 4.85-4.86, 5.1-5.12
26. GIRALDO, G. Manual de Análisis de Aguas. Manizales. Universidad Nacional de Colombia. 1995
27. GONZALES, A. PALMA R. ORTIZ, J. Validación de Metodologías Alternas para Análisis Bacteriológico de Aguas para Consumo Humano. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de salud. Santa fe de Bogota. Enero de 1998
28. HILLEBOE, H. Manual de Tratamiento de Aguas. 16ed. México. Limusa. 1996. 11-69
29. IDEAM, Programa de Fisicoquímica Ambiental. Muestreo. Principios Generales y Requisitos de Norma según Norma ISO 17025. Bogotá, 1998.
30. IDEAM, Programa de Fisicoquímica Ambiental. Guía para el aseguramiento de la Calidad Analítica en Laboratorios de Química Ambiental. Bogotá, junio 1998.

31. IDEAM, Programa de Fisicoquímica Ambiental. Manual de aseguramiento de calidad. Bogotá, 2002.
32. IDEAM, Programa de Fisicoquímica Ambiental. Protocolo para la elaboración de PSO. Bogotá, 2001.
33. IDEAM, Programa de Fisicoquímica Ambiental. Descripción de la Norma ISO/IEC 17025 : 1999 Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Ensayo y Calibración. Bogota
34. INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACION. Documentación, Presentación de Tesis, Trabajos de Grado y Otros Trabajos de Investigación. 5ed. Bogotá: ICONTEC. 2004. 34p
35. LANGE, E. Manual para el Análisis Simple de la Calidad del Agua. Ámsterdam Los Países Bajos. Fundación IWT. 1994. p. 6.1-6.13
36. LEIVA, Pablo et al. El medio Ambiente en Colombia. Bogotá: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. 1998. p. 88-142
37. LOGAN, B.E. and G.A. Wagenseller. 1993. The HBOD Test: a New Method for Determining Biochemical Oxygen Demand. *Water Environ. Res.* 65(7):862-868.
38. LOGAN, B.E. and D. Kohler. 1999. Oxygen Mass Transfer Coefficients for Different Sample Containers used in the Headspace BOD (HBOD) Test. Submitted.
39. MESA, C. et al. 1 ed. Bogotá: Fundación Friedrich Ebert de Colombia-Fescol. 1998p. 23-61
40. MONTGOMERY, H.A.C. The Determination of Biochemical Oxygen Demand by Respirometric Methods. *Water Res.*, 1/1:632-640, 1967.

41. PABON, V. Las Corporaciones Autónomas Regionales: Un Nuevo Modelo de Organización Territorial para la Administración del Medio Ambiente en Colombia. Ponencia Presentada en el I Congreso Nacional sobre Biodiversidad en Cali. Universidad del Cauca. 1994. 17p.
42. RENNIE, P.J. SUMNER, A.M. BASKETTER, F.B. Determination of Nitrate in Raw, Potable, and Waste Waters by Ultraviolet Spectrophotometry. *Analyst*. 104:837. September 1979.
43. RIOS, S. CONSTAIN, L. Caracterización Microbiológica de las Aguas de la Ciudad de Popayán. Popayán. Trabajo de Grado (Biología). Universidad del Cauca. 1996. 36 p.
44. SANTELLI, R; SALGADO, P. "Turbidimetric determination of sulphate in waters Employing flow Inyection and Lead Sulphate Formation". *Anal. Chim. Acta* 300 (1995), 149-153.
45. SAWYER, C. McCARTY, P. QUIMICA PARA INGENIERIA AMBIENTAL. 4ed. New York. McGraw Hill. 2001. p. 645-651, 636-643, 596-611, 569-586.
46. SKOOG, D.A. Análisis Instrumental. 4ed. Madrid España. Mc graw-Hill 1994.
47. STOKER, H. SEAGER, S. Química Ambiental Contaminación del Aire y del Agua. 1ed. Barcelona. Editorial Blume. 1981. 159-312
48. YOUNG, J.C. and E.R. Baumann. 1976. The Electrolytic Respirometer- Factors Affection Oxygen Uptake Measurements. *Water Res.* 10:1031.
49. YOUNG, J.C. and E.R. Baumann. 1976. The Electrolytic Respirometer- Use in Water Pollution Control Plant Laboratories. *Water Res.* 10:1141.

## ANEXOS

**TABLA 1. Estandarización de la Curva de Nitratos**

Día	Concentración (mg/L)	Replica	Absorbancia
1	0,01	1	4,0001E-03
1	0,01	2	2,0638E-03
1	0,01	3	-2,8938E-03
2	0,01	4	8,4736E-04
2	0,01	5	1,7981E-03
2	0,01	6	2,0499E-03
3	0,01	7	5,8294E-03
3	0,01	8	9,1080E-04
3	0,01	9	1,5798E-03
4	0,01	10	1,8096E-03
4	0,01	11	-7,4966E-04
4	0,01	12	1,1755E-02
5	0,01	13	-8,2140E-04
5	0,01	14	-2,5528E-03
5	0,01	15	5,0392E-03
1	0,05	1	7,4764E-03
1	0,05	2	1,3400E-02
1	0,05	3	1,0020E-02
2	0,05	4	1,1543E-02
2	0,05	5	1,0765E-02
2	0,05	6	1,1395E-02
3	0,05	7	1,2823E-02
3	0,05	8	9,5678E-03
3	0,05	9	1,0472E-02
4	0,05	10	1,2786E-02
4	0,05	11	8,1511E-03
4	0,05	12	1,1474E-02
5	0,05	13	-1,5232E-02
5	0,05	14	1,5384E-02
5	0,05	15	1,1981E-02
1	0,1	1	2,5207E-02
1	0,1	2	2,5785E-02
1	0,1	3	2,6222E-02
2	0,1	4	2,4708E-02
2	0,1	5	2,3578E-02
2	0,1	6	2,8562E-02
3	0,1	7	2,5684E-02
3	0,1	8	2,5206E-02
3	0,1	9	2,4680E-02
4	0,1	10	2,6112E-02
4	0,1	11	2,0563E-02
4	0,1	12	2,6661E-02
5	0,1	13	2,4724E-02
5	0,1	14	2,8969E-02

Continuación TABLA 1			
5	0,1	15	2,5206E-02
1	0,5	1	1,2555E-01
1	0,5	2	1,3056E-01
1	0,5	3	1,2055E-01
2	0,5	4	1,2365E-01
2	0,5	5	1,2397E-01
2	0,5	6	1,2545E-01
3	0,5	7	1,2599E-01
3	0,5	8	1,2355E-01
3	0,5	9	1,1926E-01
4	0,5	10	1,2886E-01
4	0,5	11	1,2234E-01
4	0,5	12	1,2941E-01
5	0,5	13	1,2693E-01
5	0,5	14	1,3418E-01
5	0,5	15	1,2837E-01
1	1	1	2,5161E-01
1	1	2	2,5618E-01
1	1	3	2,5163E-01
2	1	4	2,5202E-01
2	1	5	2,5160E-01
2	1	6	2,5220E-01
3	1	7	2,4553E-01
3	1	8	2,4522E-01
3	1	9	2,4788E-01
4	1	10	2,5425E-01
4	1	11	2,4723E-01
4	1	12	2,5492E-01
5	1	13	2,5162E-01
5	1	14	2,5318E-01
5	1	15	2,5237E-01
1	3	1	7,3496E-01
1	3	2	7,4761E-01
1	3	3	7,4660E-01
2	3	4	7,4160E-01
2	3	5	7,3924E-01
2	3	6	7,3949E-01
3	3	7	7,4082E-01
3	3	8	7,4159E-01
3	3	9	7,4035E-01
4	3	10	7,4858E-01
4	3	11	7,3304E-01
4	3	12	7,4485E-01
5	3	13	7,4080E-01
5	3	14	7,4354E-01
5	3	15	7,3238E-01
1	5	1	9,7161E-01
1	5	2	1,2069E+00
1	5	3	9,7850E-01

Continuación TABLA 1			
2	5	4	1,1927E+00
2	5	5	1,1635E+00
2	5	6	1,1952E+00
3	5	7	1,1997E+00
3	5	8	1,1975E+00
3	5	9	1,2203E+00
4	5	10	1,2077E+00
4	5	11	1,1894E+00
4	5	12	1,2026E+00
5	5	13	1,1979E+00
5	5	14	1,2020E+00
5	5	15	1,1950E+00
1	6	1	1,3980E+00
1	6	2	1,4201E+00
1	6	3	1,4013E+00
2	6	4	1,4191E+00
2	6	5	1,3930E+00
2	6	6	1,4150E+00
3	6	7	1,4276E+00
3	6	8	1,4225E+00
3	6	9	1,4403E+00
4	6	10	1,4300E+00
4	6	11	1,4219E+00
4	6	12	1,4226E+00
5	6	13	1,4215E+00
5	6	14	1,4103E+00
5	6	15	1,4133E+00