

**ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN  
DE FÓSFORO TOTAL, FÓSFORO HIDROLIZABLE Y ORTOFOSFATOS EN  
AGUAS SUPERFICIALES EN EL LABORATORIO AMBIENTAL DE LA CRC**

**LILA MARCELA CLAROS GÓMEZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2008**

**ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN  
DE FÓSFORO TOTAL, FÓSFORO HIDROLIZABLE Y ORTOFOSFATOS EN  
AGUAS SUPERFICIALES EN EL LABORATORIO AMBIENTAL DE LA CRC**

**LILA MARCELA CLAROS GÓMEZ**

**Trabajo de grado en Modalidad de Pasantía, presentado como  
Requisito Parcial para optar al título de Químico**

**Directora: MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA, Ph.D.  
Codirector (C.R.C): DIEGO ZULUAGA VERA, Químico**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2008**

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

---

---

**MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA, Ph.D.**  
**Directora de trabajo de grado**

---

**TANIA MILENA GUTIEREZ, MSc**  
**Jurado**

---

**GERMAN CUERVO OCHOA, MSc**  
**Jurado**

**Fecha de sustentación: Popayán, 13 de Agosto**

## DEDICATORIA

*A **Díos**, por llenarme de entendimiento, acompañarme en cada paso que doy y darme la fuerza necesaria para culminar ésta etapa de mi vida.*

*A mi madre **María Stella** por ser ese ángel que cuida mis sueños y a mi padre **Jorge Eliecer** por enseñarme las cosas buenas y rectas de la vida.*

*A mis hermanos **Oscar Leonar, Jorge Asdrubal** (quien desde el cielo me cuida) y **José Antonio** por quererme y apoyarme en mis decisiones.*

*A mis sobrinos **Karen, Camilo y Felipe** por ser esas personitas quienes me regalan cada día nuevos motivos para seguir luchando.*

*A mi tía **Rosalba** por creer en mí y brindarme todo el apoyo necesario bajo cualquier circunstancia.*

*A **Oscar Eduardo**, por su gran amor, apoyo incondicional e infinita paciencia.*

*A mis amigos **Eliza, Vicky, Carito, Yohanotí, Yobis, Alejo, Juan Plablo y Farid**, por tantos momentos tristes y gratos que compartimos.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora, la profesora **Maite Del Pilar Rada Mendoza** por compartir sus conocimientos, su dedicación y paciencia para conmigo en el desarrollo de este proyecto.

A mi codirector **Diego Zuluaga** por sus aportes, guía y enseñanzas en el área químico – ambiental.

Al profesor de **Edwin Rengifo** por su colaboración en cuanto el manejo estadístico de los datos obtenidos en este proyecto.

A mis compañeros **Clarita, Mauricio, Lucia, Carolina, Jose y Carlos** en el laboratorio Ambiental de la CRC.

A mis jurados y profesores **Tania Gutierrez y German Cuervo** por su tiempo y dedicación en la evaluación de éste trabajo.

A todos los **profesores del departamento de química** que contribuyeron en mi formación profesional

**A mis compañeros**

# GRACIAS

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GENERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	4
3.1 Agua Residual	4
3.2 CONTAMINANTES DEL AGUA	5
3.3 CALIDAD DEL AGUA	6
3.4 PROCEDENCIA, IMPLICACIONES Y DETERMINACIÓN DE LOS FOSFATOS EN AGUAS SUPERFICIALES	11
3.4.1 El Fósforo en las Fuentes Hídricas	11
3.4.2 Procedencia de los fosfatos en los detergentes	13
3.4.3 Método para la Determinación de Fósforo	14
3.4.4 Complejo Coloreado Fosfomolibdato	15
3.5 TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL, FÓSFORO HIDROLIZABLE Y ORTOFOSFATOS	16
3.6 MARCO DE REFERENCIA PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
3.7 NORMA TÉCNICA ISO/IEC 17025	21
3.7.1 Estandarización de métodos analíticos	22
3.7.1.1 Intervalo lineal	22
3.7.1.2 Sensibilidad Analítica	22
3.7.1.2.1 Limite de detección	22
3.7.1.2.2 Límite de cuantificación	22
3.7.1.3 Sensibilidad de calibración	23
3.7.1.4 Precisión	23
3.7.1.4.1 Repetibilidad	23
3.7.1.4.2 Precisión Intermedia	23
3.7.1.4.3 Reproducibilidad	23
3.7.1.5 Exactitud	23
4. METODOLOGÍA	24
4.1 EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES	24
4.1.1 Equipos	24
4.1.2 Reactivos	24
4.1.3 Material de vidrio y plástico	25
4.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	25
4.2.1 Soluciones de fosfato empleadas para la construcción de la curva de calibración	25

	Pág.
4.2.2 Soluciones usadas en la elaboración del reactivo mixto	26
4.2.3 Soluciones y reactivos empleados para la digestión de fósforo total y fósforo hidrolizable	26
4.3 SITIO DE MUESTREO	27
4.3.1 Ubicación Geográfica de la zona de muestreo	27
4.3.2 Recolección, Manipulación y Preservación de la Muestra	30
4.4 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACION DE ORTOFOSFATOS	31
4.4.1 Calibración del espectrofotómetro	31
4.4.2 Selección de la longitud de onda	31
4.5 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN	32
4.6 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ORTOFOSFATOS	32
4.6.1 Intervalo lineal	32
4.6.2 Sensibilidad Analítica	32
4.6.3 Sensibilidad de Calibración	33
4.6.4 Precisión	33
4.6.4.1 Repetibilidad	33
4.6.4.2 Precisión intermedia	33
4.6.4.3 Reproducibilidad	33
4.6.5 Precisión del método	33
4.6.6 Exactitud	34
4.6.7 Exactitud del método de extracción	34
4.7 ESTABILIDAD DE LOS IONES ORTOFOSFATOS	34
4.7.1 Estabilidad de los estándares	34
4.7.2 Estabilidad de la muestra del río Molino (M <sub>6</sub> )	34
4.8 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE ORTOFOSFATOS EN AGUAS SUPERFICIALES	35
4.8.1 Parte Experimental de la Estandarización	35
4.9 PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN FÓSFORO TOTAL, FÓSFORO HIDROLIZABLE Y ORTOFOSFATOS	37
4.10 ANÁLISIS FISCOQUÍMICO DE MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO MOLINO	39
4.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	39
4.12 ELABORACIÓN Y PRESENTACIÓN DE DOCUMENTOS	40

	Pág.
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	41
5.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ORTOFOSFATOS	41
5.1.1 Calibración del espectrofotómetro	41
5.1.2 Selección de la longitud de onda	41
5.2 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN	42
5.3 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ORTOFOSFATOS	50
5.3.1 Intervalo lineal	50
5.3.2 Sensibilidad Analítica	50
5.3.3 Sensibilidad de Calibrado	52
5.3.4 Precisión	52
5.3.4.1 Repetibilidad	52
5.3.4.2 Precisión intermedia	52
5.3.4.3 Reproducibilidad	53
5.3.5 Precisión del método	54
5.3.6 Exactitud	54
5.3.7 Exactitud de método de extracción	55
5.4 ESTABILIDAD DE LOS IONES ORTOFOSFATOS	55
5.4.1 Estabilidad de los estándares	55
5.4.2 Estabilidad de la muestra del río Molino (M <sub>6</sub> )	57
5.5 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE ORTOFOSFATOS EN AGUAS SUPERFICIALES	58
5.6 MUESTREO EN AGUAS SUPERFICIALES DEL RÍO MOLINO	60
5.6.1 ORTOFOSFATOS	60
5.6.2 FÓSFORO HIDROLIZABLE	63
5.6.3 FÓSFORO TOTAL	66
5.7 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL AGUA DEL RÍO MOLINO	71
5.7.1 Análisis fisicoquímico y microbiológico del agua de las estaciones de muestreo A, B, C y D del río Molino	71
5.7.2 Análisis fisicoquímico de pH, conductividad, oxígeno disuelto de las estaciones de muestreo 1 - 12 del río Molino	74
5.7.2.1 pH	78
5.7.2.2 Conductividad	79
5.7.2.3 Oxígeno Disuelto	80
CONCLUSIONES	85



BIBLIOGRAFÍA  
ANEXOS

## LISTA DE TABLAS

		<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1</b>	Características químicas del agua potable que tienen mayores consecuencias económicas e indirectas sobre la salud humana	7
<b>Tabla 2</b>	Parámetros analizados al río Molino	39
<b>Tabla 3</b>	Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de P- PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de P-PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L), Tiempo: 10 min.	43
<b>Tabla 4</b>	Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de P- PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de P-PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L), Tiempo: 15 min.	44
<b>Tabla 5</b>	Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de P- PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de P-PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L), Tiempo: 20 min.	45
<b>Tabla 6</b>	Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de P- PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de P-PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L), Tiempo: 25 min.	46
<b>Tabla 7</b>	Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de P- PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de P-PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L), Tiempo: 30 min.	47
<b>Tabla 8</b>	Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de P- PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de P-PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L), Tiempo: 35 min.	48
<b>Tabla 9</b>	Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de P- PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de P-PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L), Tiempo: 40 min.	49
<b>Tabla 10</b>	Absorbancias del blanco y las soluciones patrón de ortofosfatos y sus desviaciones estándar y coeficientes de variación respectivos	51
<b>Tabla 11</b>	Límites de detección y cuantificación	51
<b>Tabla 12</b>	Repetibilidad del método	52
<b>Tabla 13</b>	Valores de concentraciones de los tres patrones de ortofosfatos y la muestra M <sub>6</sub> obtenidos durante los diez días, con sus respectivos coeficientes de variación para calcular la precisión intermedia	53
<b>Tabla 14</b>	Valores de concentraciones de los dos patrones de ortofosfatos obtenidos durante las ocho semanas, con sus respectivos coeficientes de variación	54
<b>Tabla 15</b>	Precisión del método.	54
<b>Tabla 16</b>	Exactitud	67

<b>Tabla 17</b>	Porcentajes de recuperación de la muestra del río Blanco	Pág. 55
<b>Tabla 18</b>	Resultados de la estandarización	69
<b>Tabla 19</b>	Parámetros de calidad del río Molino en la época de invierno. Fecha de muestreo: 18 de julio de 2007	72
<b>Tabla 20</b>	Parámetros de calidad del río Molino en la época de verano. Fecha de muestreo: 4 de Septiembre de 2007	72
<b>Tabla 21</b>	Valores de pH, conductividad y oxígeno disuelto para las muestras de agua tomadas semanal y mensualmente en las doce estaciones de muestreo del río Molino	75
<b>Tabla 22</b>	Correlaciones no paramétricas entre el pH, conductividad, oxígeno disuelto y ortofosfatos	78

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura No.1.</b> Cuenca alterada por la actividad humana	12
<b>Figura No. 2.</b> Polioxometalato de $\alpha$ - Keggin en sus modelos atómico y poliédrico	16
<b>Figura No.3.</b> Sistema óptico del espectrofotómetro Agilent 8453 UV-Visible	18
<b>Figura No. 4.</b> Mapa Hidrográfico de la Subcuenca del Río Molino	28
<b>Figura No. 5.</b> Espectrofotómetro Ultravioleta - Visible, Agilent 8453	31
<b>Figura No.6.</b> Barrido de longitudes de onda (nm) vs absorbancias de soluciones patrón de ortofosfato de concentraciones 0,01 0,03, 0,05 y 0,10 mg de $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ .	42
<b>Figura No.7.</b> Curva de calibración de Ortofosfatos (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ), Tiempo: 10 min.	43
<b>Figura No.8.</b> Curva de calibración de Ortofosfatos (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ), Tiempo: 15 min.	44
<b>Figura No.9.</b> Curva de calibración de Ortofosfatos (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ), Tiempo: 20 min.	45
<b>Figura No.10.</b> Curva de calibración de Ortofosfatos (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ), Tiempo: 25 min.	46
<b>Figura No.11.</b> Curva de calibración de Ortofosfatos (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ), Tiempo: 30 min.	47
<b>Figura No.12.</b> Curva de calibración de Ortofosfatos (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ), Tiempo: 35 min.	48
<b>Figura No.13.</b> Curva de calibración de Ortofosfatos (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ), Tiempo: 40 min.	49
<b>Figura No.14.</b> Estabilidad de los estándares 00,0099, 0,0298 y 0,0497 mg de P- $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ preparados diariamente correspondientes al tratamiento 1 y guardados (G), correspondientes al tratamiento 2, durante diez días.	56
<b>Figura No.15.</b> Grafica de superposición de las muestras del río molino, en sus diferentes formas de preservación.	57
<b>Figura No.16.</b> Muestreos (1 - 24) vs la concentración de ortofosfatos (mg de P- $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ) para las diferentes estaciones de muestreo (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10).	62

	<b>Pág.</b>
Muestras (1, 5, 9, 13, 18 y 22) vs la concentración de ortofosfatos mg de P- $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ para los diferentes estaciones de muestreo (2, 9, 11 y 12).	63
<b>Figura No.17.</b>	
Muestras (1 - 24) vs la concentración de fósforo Hidrolizable (mg de P- $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ) para las diferentes estaciones de muestreo (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10).	65
<b>Figura No.18.</b>	
Muestras (1, 5, 9, 13,18 y 22) vs la concentración de fósforo Hidrolizable mg de P- $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ para los diferentes estaciones de muestreo (2, 9, 11 y 12).	66
<b>Figura No.19.</b>	
Muestras (1 - 24) vs la concentración de fósforo total (mg de P- $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ) para las diferentes estaciones de muestreo (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10).	68
<b>Figura No.20</b>	
Muestras (1, 5, 9, 13,18 y 22) vs la concentración de fósforo total mg de P- $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ para los diferentes estaciones de muestreo (2, 9, 11 y 12).	69
<b>Figura No.21</b>	
Histograma No. 1 de pH vs frecuencia de las muestras de agua del río Molino.	79
<b>Figura No.22</b>	
Histograma No. 2 de conductividad vs frecuencia de las muestras de agua del río Molino.	80
<b>Figura No.23</b>	
Histograma No. 3 de oxígeno disuelto vs frecuencia de las muestras de agua del río Molino.	81
<b>Figura No.24</b>	

## LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

<b>A</b>	Absorbancia
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>b</b>	Espesor de la celda
<b>C</b>	Concentración (mg/L)
<b>Cts</b>	Cuentas: terminología empleada en la calibración únicamente por AGILENT TECHNOLOGIES. Oerator´s Manual. Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System.
<b>CRC</b>	Corporación Autónoma Regional del Cauca
<b>CQE</b>	Council on Environmental Quality
<b>DBO</b>	Demanda Bioquímica de Oxígeno
<b>DBO<sub>5</sub></b>	Demanda Bioquímica de Oxígeno después de 5 días
<b>DQO</b>	Demanda Química de Oxigeno
<b><math>\epsilon</math></b>	Absortividad molar
<b>EPA</b>	Environmental Protección Agency
<b>H<sub>0</sub></b>	Hipótesis nula
<b>IDEAM</b>	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales
<b>mg/L</b>	Miligramos por litro
<b>msnm</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>OD</b>	Oxígeno disuelto
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>p</b>	Probabilidad o riesgo de rechazar H <sub>0</sub> equivocadamente
<b>r</b>	Coefficiente de correlación
<b>s</b>	Desviación estándar
<b>SS</b>	Sólidos sedimentables
<b>SST</b>	Sólidos suspendidos totales

**T**

Transmitancia

**UNESCO**

La Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura

**UV - Vis**

Ultravioleta – Visible

## RESUMEN

En el Departamento del Cauca nacen las principales arterias fluviales del país (como son los ríos Magdalena, Cauca y Caquetá); a pesar de esta gran riqueza hídrica, su aprovechamiento disminuye enormemente por la presencia de múltiples factores adversos (resultado de sus diferentes usos), como son la contaminación, debido a la incorporación de diversos residuos en las fuentes abastecedoras, las cuales generan efectos desfavorables en el ciclo hidrológico; dichos factores hacen que la calidad del agua esté cada día más deteriorada.

Para tener una idea del grado de contaminación de estos grandes e importantes ríos, se hace necesario evaluar a sus contribuyentes (afluentes) y así, poder determinar las causas y posibles acciones, tendientes a mitigar sus efectos; es por esto, que de manera puntual se escogió al río Molino, por ser éste el receptor de la mayoría de las aguas servidas de la ciudad de Popayán, el cual posteriormente desemboca en el río Cauca.

Para determinar qué factores antrópicos afectan al río Molino, fue necesario conocer las características fisicoquímicas de ésta fuente, desde su nacimiento en el oriente del municipio de Popayán, durante su recorrido, donde abastece de agua al acueducto de Tulcán (suministrando agua potable a una parte de la población de la ciudad de Popayán), cuando atraviesa a la ciudad (en donde recibe la mayor contaminación urbana), hasta su vertido final en el río Cauca.

Por todo lo anterior, en este proyecto se planteó estandarizar los métodos para la determinación de fósforo total, fósforo hidrolizable y ortofosfatos por Espectrofotometría de Ultravioleta Visible, en la infraestructura del Laboratorio Ambiental de la CRC; este trabajo se realizó bajo el convenio 069 celebrado entre la Universidad del Cauca y la Corporación Autónoma Regional del Cauca en el año 2002.

En el desarrollo de este proyecto, se hallaron los valores para los parámetros de calidad estadística que establecen el rendimiento del método, como son: Intervalo lineal (0,0099 a 0,4975 mg P-PO<sup>3-4</sup>/L), linealidad (0,99958), límite de detección del método (2.8896X10<sup>-3</sup> mg P-PO<sup>3-4</sup>/L) y límite de cuantificación (9.5084 X10<sup>-3</sup> mg P-PO<sup>3-4</sup>/L) al igual que la exactitud y la precisión, mediante la utilización de muestras de referencia tomadas en el río Blanco, soluciones patrón de ortofosfatos y un estándar certificado del IDEAM.

La concentración de los iones ortofosfatos, fósforo hidrolizable y fósforo total en las muestras de agua superficial del río Molino, oscilaron entre 0,01 y 1,8 mg P-PO<sup>3-4</sup>/L, 0,01 y 3,6 mg P- PO<sup>3-4</sup>/L, 0,01 y 4,0 mg P- PO<sup>3-4</sup>/L, respectivamente, dando a conocer que este río presenta valores muy elevados en cuanto estos parámetros.

Simultáneamente a la cuantificación de fosfatos en esta fuente hídrica, se analizaron algunos indicadores de calidad, mediante análisis fisicoquímicos (pH, conductividad, oxígeno disuelto, Demanda Bioquímica de Oxígeno, Demanda



Química de Oxígeno, color, turbidez, nitratos, fosfatos, sólidos suspendidos totales, grasas y aceites) y microbiológicos (coliformes fecales y totales), realizados en las épocas de invierno y verano, con el fin de establecer la calidad de este recurso.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Corporación Autónoma Regional del Cauca, a través de la oficina de Investigaciones Ambientales y teniendo en cuenta la necesidad de conocer, monitorear y administrar los recursos naturales en el departamento del Cauca, ha implementado y puesto en funcionamiento el Laboratorio Ambiental de la CRC, es así como actualmente el laboratorio cuenta con equipos de alta tecnología, instalaciones apropiadas, reactivos, recursos necesarios y personal capacitado, lo que le permite ofrecer a sus usuarios, respuestas a las necesidades en materia de análisis ambientales.

Conscientes 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 su acreditación ante el IDEAM, ya que los laboratorios que produzcan información cuantitativa, física y biótica para los estudios o análisis ambientales requeridos por las autoridades ambientales competentes y los demás que produzcan información de carácter oficial relacionada con la calidad del medio ambiente y de los recursos naturales renovables, deberán poseer un certificado de acreditación correspondiente, otorgado por el IDEAM.

Con el objeto de completar el portafolio de servicios que ofrece el laboratorio ambiental de la CRC para su acreditación, se requiere estandarizar, entre algunas metodologías, las relacionadas a la determinación de fósforo total, fósforo hidrolizable y ortofosfatos por Espectrofotometría Ultravioleta Visible, con el objeto de generar información confiable y brindar apoyo Corporativo en los monitoreos de aguas superficiales y residuales en el departamento del Cauca; adicionalmente, estas determinaciones son importantes: 1. A nivel ambiental, debido a que la población contribuye con altas descargas de contaminantes a base de detergentes (una de las principales fuentes de fosfatos), los cuales producen un proceso llamado eutrofización<sup>(1)</sup>, que provoca el crecimiento abrupto y repentino de la biota foto-sintetizadora, reduciendo así el contenido de oxígeno en el agua. 2. A nivel de la salud, cuando se introduce un exceso de sales de fosfato por vía oral, pueden resultar tóxicas al reducir la concentración de  $Ca^{2+}$  en la circulación y por precipitación del fosfato de calcio en tejidos blandos <sup>(2)</sup>.

Como una aplicación a las metodologías anteriormente estandarizadas para la determinación de fósforo total, fósforo hidrolizable y ortofosfatos se realizó el monitoreo durante seis meses en el río Molino, fuente hídrica que antes de entrar en la ciudad de Popayán, tiene una concesión para agua potable al acueducto Tulcán de la misma ciudad (resolución 387 del 25 de abril del 2003), debido a que posee buenas características tanto fisicoquímicas como microbiológicas. Una vez determinadas las concentraciones de fósforo total, fósforo hidrolizable y ortofosfatos, se evaluó si dicho contenido afectaba o no a la calidad de las aguas del río Molino y si los vertimientos de aguas residuales provenientes del casco urbano favorecían el incremento en el contenido de estos compuestos.

Adicionalmente, se realizó un tratamiento estadístico apropiado, que garantizó la obtención de datos confiables, para que el laboratorio pueda adelantar el proceso de validación ante el IDEAM, con el objeto de aplicarlos al monitoreo de la calidad ambiental de las aguas superficiales y residuales.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Realizar el montaje y la estandarización de los métodos analíticos para la determinación de Fósforo total, Fósforo hidrolizable y ortofosfatos en aguas superficiales.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Implementar los métodos analíticos para la determinación de Fósforo total, Fósforo hidrolizable y ortofosfatos, mediante Espectrofotometría Ultravioleta Visible.
- Facilitar la utilización del método en el laboratorio ambiental de la C.R.C mediante un registro documental de los resultados obtenidos para cada método, así como de los pasos detallados a seguir en cada uno de los procedimientos.
- Evaluar estadísticamente los métodos estandarizados para cada parámetro, mediante pruebas de ANOVA (Análisis de Varianza).
- Analizar si el contenido de Fósforo total, Fósforo hidrolizable y ortofosfatos de los vertimientos de aguas residuales provenientes de la zona urbana, incrementan o no el contenido de estos compuestos, si dicho contenido afecta o no a la calidad de las aguas del río Molino y su impacto sobre el río Cauca.

### **3. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE**

El agua es un compuesto esencial para el desarrollo de la vida en nuestro planeta, sin embargo, es necesario tener en cuenta que a pesar de su importancia, en lo que respecta al agua de consumo, este es un bien que empieza a ser escaso, debido al aumento creciente de la población mundial y a la relativamente poca disponibilidad de este recurso. La situación es más preocupante si se tiene en cuenta que una buena proporción de este recurso está contaminado por el vertido indiscriminado de residuos generados por la actividad del hombre en centros urbanos e industriales, ya que cada segundo, la industria, las ciudades y las zonas agrícolas, entre otras, vierten toneladas de residuos a los ríos. Este deterioro de la calidad del agua supone un grave problema ambiental, económico y social <sup>(3)</sup>.

Cualquier sustancia que impida el uso normal del agua debe considerarse como un contaminante de la misma, ya que incluso, el agua potable, no es pura en un sentido químico; para su potabilización, se hace necesario eliminar los sólidos en suspensión y destruir las bacterias nocivas para la salud, aunque aún pueden quedar disueltas muchas sustancias que afectan su calidad <sup>(4)</sup>.

Parte de la complejidad del problema de la contaminación del agua, nace de la gran variedad de los usos normales de ésta, ya que el agua que resulta apropiada para algunos usos y que se considera no contaminada para ellos, puede ser contaminada para otros.

#### **3.1 Agua Residual**

Cuando un producto de desecho se incorpora al agua, el líquido resultante recibe el nombre de agua residual, las cuales son un conjunto de aguas que son contaminadas durante su empleo en actividades realizadas por la humanidad; 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 al igual que los trabajos acuíferos, debido a los vertidos de aguas cargadas de residuos orgánicos procedentes de las labores de transformación de productos vegetales, o de los excrementos de los animales. Otra fuente de contaminación de las aguas son las industrias, ya que muchas de ellas, como la papelera, química, textil y siderúrgica, entre otras, necesitan agua para desarrollar su actividad. Las centrales térmicas también necesitan una gran cantidad de agua para ser operativas; en este caso, el agua residual que no presenta contaminantes orgánicos o inorgánicos, tiene una temperatura mucho más elevada que la de los cauces donde desemboca, ocasionando graves trastornos en los ecosistemas acuáticos <sup>(5)</sup>.

Para evitar los problemas que pueden causar los contaminantes de las aguas residuales, existen sistemas de depuración que sirven para devolverles las características físicas y químicas originales.

### **3.2 CONTAMINANTES DEL AGUA**

Los ríos constituyen la principal fuente de abastecimiento de agua potable de las poblaciones humanas y su contaminación limita la disponibilidad de este recurso, imprescindible para la vida <sup>(6)</sup>.

La EPA (Environmental Protection Agency) de los Estados Unidos, estima que casi la tercera parte del recorrido de los ríos de la nación se hallan característicamente contaminados, al igual que en todo el mundo, en el sentido de que se superan los criterios para la calidad del agua <sup>(7)</sup>.

Existen dos formas a través de las cuales se puede contaminar el agua: una de ellas es por medio de contaminantes naturales, es decir, durante el ciclo natural del agua ya que puede entrar en contacto con ciertos constituyentes contaminantes que se vierten en las aguas, la atmósfera y la corteza terrestre, como por ejemplo, sustancias minerales y orgánicas disueltas o en suspensión, tales como arsénico, cadmio, arcillas, materia orgánica, bacterias etc; otra forma es a través de los contaminantes generados por el hombre o de origen humano y que son producto de los desechos líquidos y sólidos que se vierten directa o indirectamente en el agua, por ejemplo, los vertimientos de aguas residuales, las sustancias provenientes de desechos industriales y los químicos empleados en el control de plagas agrícolas y/o enfermedades.

Los vertidos de aguas residuales domésticas son la fuente de la mayor parte de contaminación antropogénica que pueda hallarse en aguas naturales (río, lagos y mares). En consecuencia, la limpieza de las aguas residuales, constituye un importante aspecto a los esfuerzos actuales para controlar la contaminación del agua.

Los ríos, por su caudal y su capacidad de dilución, son capaces de soportar la mayor cantidad de contaminantes; sin embargo, la presencia de residuos domésticos, fertilizantes, pesticidas y desechos industriales, alteran la flora y la fauna acuáticas. A diferencia de ello, en las aguas no contaminadas, existe cierto equilibrio entre los animales y los vegetales, el cual se rompe por la presencia de materiales extraños. Así, algunas especies desaparecen mientras que otras caen en una explosión demográfica; además, las aguas adquieren una apariencia y olor desagradables.

Los indicios de contaminación del agua son evidentes, incluso para el observador más casual; la diversidad de esta contaminación y sus efectos, indican la complejidad del problema. Para ayudar al estudio sistemático de los contaminantes del agua, estos se clasificaran en nueve categorías que se citan a continuación <sup>(27)</sup>.

1. Residuos con requerimiento de oxígeno
2. Agentes patógenos
3. Nutrientes vegetales
4. Compuestos orgánicos sintéticos
5. Petróleo
6. Sustancias químicas inorgánicas y minerales
7. Sedimentos
8. Sustancias radioactivas
9. Calor

Es inevitable que haya un cierto solapamiento entre las categorías, pues algunos residuos contienen más de un contaminante, como es el caso de las aguas residuales domésticas sin tratar, ya que contienen residuos que requieren oxígeno y pueden contener agentes patógenos, así como nutrientes vegetales <sup>(7)</sup>.

### **3.3 CALIDAD DEL AGUA**

El término calidad del agua es relativo y está referido a su composición, en la medida en que ésta es afectada por la concentración de sustancias producidas por procesos naturales y actividades humanas; como tal, es un término neutral que no puede ser clasificado como bueno o malo sin hacer referencia al uso para el cual el agua es destinada <sup>(8)</sup>.

La calidad, es el resultado de comparar las características físicas, químicas y microbiológicas encontradas en el agua analizada, con el contenido reportado por las normas que regulan el recurso en función de su uso. Esta relación de parámetros fisicoquímicos y biológicos, define su composición, grado de alteración y utilidad del cuerpo hídrico.

Es por ello que en la actualidad es tan importante conocer las características fisicoquímicas del agua para consumo humano, como también para 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, la adecuación a múltiples aplicaciones analíticas de los laboratorios y como herramienta de control para regular y optimizar el funcionamiento de las plantas de purificación y tratamiento de aguas, entre muchos otros fines.

De acuerdo con lo anterior, tanto los criterios como los estándares y objetivos de la calidad del agua variarán, dependiendo de si se trata de agua para consumo

humano (agua potable), uso agrícola, industrial, recreación ó para mantener la calidad ambiental, etc.

Las características químicas del agua para consumo humano en relación con los elementos y compuestos químicos que tienen consecuencias económicas e indirectas sobre la salud en Colombia, señaladas en la resolución 2115 para agua potable, se muestran a continuación en la tabla 1.

**Tabla 1.** Características químicas del agua potable que tienen mayores consecuencias económicas e indirectas sobre la salud humana <sup>(9)</sup>

Elementos y compuestos químicos	Expresadas como	Valor máximo aceptable (mg/L)
Calcio	Ca	60
Alcalinidad Total	CaCO <sub>3</sub>	200
Cloruros	Cl <sup>-</sup>	250
Aluminio	Al <sup>3+</sup>	0,2
Dureza Total	CaCO <sub>3</sub>	300
Hierro Total	Fe	0,3
Magnesio	Mg	36
Manganeso	Mn	0,1
Molibdeno	Mo	0,07
Sulfatos	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	250
Zinc	Zn	3
<b>Fosfatos</b>	<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	<b>0,5</b>

Los índices de calidad del recurso hídrico, permiten comparar la calidad en diferentes lugares y momentos, para facilitar la valoración de los vertidos contaminantes y de los procesos de autodepuración.

Los principales índices de calidad del agua son: Oxígeno disuelto (OD), coliformes fecales, pH, Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>), Demanda Química de Oxígeno (DQO), nitratos, nitritos, fosfatos, temperatura, turbidez, color y sólidos suspendidos totales. A continuación, se describe a cada uno de estos índices y la importancia que estos representan para su uso.

**Color:** El agua no contaminada suele tener ligeros colores rojizos, pardos, amarillentos o verdosos, debido, principalmente, a los compuestos húmicos, férricos o a los pigmentos verdes de las algas que contienen. Una coloración rojiza de alta intensidad es debida a la presencia de hierro como humato férrico. Las

aguas contaminadas pueden tener muy diversos colores pero, en general, no se pueden establecer relaciones claras entre el color y el tipo de contaminación.

**Olor y sabor:** Compuestos químicos presentes en el agua como son los fenoles, diversos hidrocarburos, cloro, materias orgánicas en descomposición o esencias liberadas por diferentes algas u hongos, pueden dar olores y sabores muy fuertes al agua, aunque estén en muy pequeñas concentraciones. Las sales o los minerales dan sabores salados o metálicos, en ocasiones sin ningún olor.

**Temperatura:** Muchos parámetros biológicos del agua están relacionados con la temperatura, ya que las corrientes de agua están sometidas a variaciones de ésta a lo largo de su recorrido como una situación normal, debido, entre otras razones, a las fluctuaciones del clima y a las variaciones altitudinales; adicionalmente, experimentan variaciones de temperatura en períodos de 24 horas en un mismo sitio, debido a la cantidad de energía solar recibida, la cual varía con la hora del día, con la estación del año y con la latitud.

El aumento de temperatura disminuye la solubilidad de gases (oxígeno) y aumenta, en general, la de las sales; de igual manera, aumenta la velocidad de las reacciones del metabolismo, acelerando la putrefacción. Según la UNESCO (1996), el rango típico de temperatura se encuentra entre 0 y 30°C <sup>(10)</sup>.

**Materiales en suspensión:** Partículas como arcillas, limo y otras, aunque no lleguen a estar disueltas, son arrastradas por el agua de dos maneras: en suspensión estable (disoluciones coloidales), o en suspensión que, sólo dura mientras el movimiento del agua las arrastra.

Los materiales suspendidos coloidalmente como arenas, limos y materia orgánica fina, sólo precipitarán después de haber sufrido coagulación o floculación (reunión de varias partículas).

La determinación de sólidos sedimentables (SS) y suspendidos totales (SST) son de gran valor para evaluar la concentración de residuos domésticos y de aguas ligeramente contaminadas.

La determinación de los sólidos sedimentables (SS) tiene dos aplicaciones muy importantes: 1. En el análisis de los residuos industriales, con el fin de determinar la necesidad y el diseño de tanques primarios de sedimentación en las plantas que emplean tratamiento biológico y 2. En las plantas de tratamiento de residuos para determinar la eficiencia de unidades de sedimentación <sup>(11)</sup>.



La determinación de los sólidos totales suspendidos (SST) se emplea para evaluar la concentración de los residuos domésticos e industriales; ésta prueba tiene particular valor por la cantidad de sólidos sedimentables en las unidades primarias de sedimentación, y permiten determinar la carga del resto de los materiales a las unidades secundarias de tratamiento biológico.

**Conductividad:** Este parámetro indica el contenido de sales disueltas o de minerales en el agua, y se ve influenciado por las actividades domésticas e industriales, las cuales modifican los valores naturales de este parámetro.

El agua pura tiene una conductividad eléctrica muy baja, mientras que el agua natural tiene iones en disolución, su conductividad es mayor y proporcional a la cantidad y características de esos electrolitos. Por esto, se usan los valores de conductividad como un índice aproximado de concentración de solutos.

Según la UNESCO (1996) <sup>(10)</sup>, el rango típico de conductividad en corrientes superficiales se encuentra entre 10 y 100  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

**Turbidez:** El término turbio se aplica a las aguas que contienen materia en suspensión, la cual interfiere con el paso de la luz a través del agua, o aquellas en las que está restringida la visión de la profundidad.

En los ríos, gran parte de la turbiedad se debe a partículas coloidales de rocas en condiciones de desbordamiento, ya que gran parte de la capa superior del suelo es arrastrada por el agua hacia las corrientes que las reciben; una gran parte de este material es de naturaleza inorgánica, como por ejemplo arcilla y barro, pero también tiene una parte considerable de materia orgánica <sup>(11)</sup>.

**pH:** Es una variable importante en la calidad del agua, ya que tiene mucha influencia en la bioquímica de los procesos que ocurren en los cuerpos de agua.

Las aguas naturales poseen un pH entre 6,0 y 8,5, pero pueden tener pH ácidos por el  $\text{CO}_2$  disuelto desde la atmósfera o proveniente de los seres vivos ó por el ácido sulfúrico procedente de algunos minerales ó por ácidos húmicos disueltos del mantillo del suelo <sup>(11)</sup>.

Por otro lado, la principal sustancia básica en el agua natural es el carbonato cálcico que puede reaccionar con el  $\text{CO}_2$ , formando un sistema tampón carbonato / bicarbonato.

**Oxígeno Disuelto (OD):** Es uno de los indicadores más empleados para evaluar la calidad del agua.

Las aguas superficiales limpias suelen estar saturadas de oxígeno, lo que es fundamental para la vida; si el nivel de oxígeno disuelto es bajo, nos indica contaminación con materia orgánica, mala calidad del agua e incapacidad para mantener determinadas formas de vida. Según la UNESCO (1996) <sup>(10)</sup> valores menores a 2 mg/L de oxígeno disuelto en una fuente, causan la muerte a la mayoría de peces.

**Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>):** Es la cantidad de oxígeno disuelto requerido por los microorganismos para la oxidación aerobia de la materia orgánica biodegradable presente en el agua. Se denomina DBO<sub>5</sub> porque se mide después de cinco días de incubación y su valor da idea de la calidad del agua desde el punto de vista de la materia orgánica presente; además, permite prever cuánto oxígeno será necesario para la depuración de esas aguas e ir comprobando cuál está siendo la eficacia del tratamiento depurador en una planta.

Según la UNESCO (1996) <sup>(10)</sup>, concentraciones de DBO<sub>5</sub> menores de 2 mg/L indican aguas poco contaminadas, mientras que valores de DBO<sub>5</sub> mayores de 10 mg/L indican aguas impactadas por descargas de aguas residuales, particularmente cerca del punto de vertimiento.

**Demanda Química de Oxígeno (DQO):** Es la cantidad de oxígeno que se necesita para oxidar los materiales contenidos en el agua con un oxidante químico (normalmente dicromato de potasio en medio ácido). Se determina en dos horas y, en la mayoría de los casos, guarda una buena relación con la DBO<sub>5</sub> por lo que es de gran utilidad al no necesitar los cinco días que requiere la incubación para la DBO<sub>5</sub>; sin embargo, la DQO no diferencia entre materia biodegradable y el resto de materia orgánica, de igual manera no suministra información sobre la velocidad de degradación en condiciones naturales.

Según la UNESCO (1996) <sup>(10)</sup>, valores de DQO menores de 20 mg/L indican aguas poco contaminadas.

**Compuestos orgánicos:** Los aceites y grasas procedentes de restos de alimentos o de procesos industriales (automóviles, lubricantes, etc.), son difíciles de metabolizar por las bacterias y flotan formando películas en el agua que dañan a los seres vivos. Así, por ejemplo, los fenoles pueden estar en el agua como resultado de contaminación industrial y cuando reaccionan con el cloro que se añade como desinfectante, forman clorofenoles, que son un serio problema porque dan al agua muy mal olor y sabor <sup>(11)</sup>.

**Nitrógeno total:** El nitrógeno se presenta en diferentes formas químicas en las aguas naturales y contaminadas; una de estas formas son los nitratos, los cuales habitualmente tiene origen en la nitrificación del nitrógeno orgánico, pero también pueden proceder de la disolución de los abonos químicos y ocasionalmente, de las aguas residuales de ciertas industrias. Las aguas lluvias suelen contener nitratos provenientes del óxido de nitrógeno y del amoníaco presente en la atmósfera.

Los nitratos participan al igual que los fosfatos de la eutrofización de oxígeno; sin embargo, en periodos de débil oxigenación pueden jugar un papel de donantes de oxígeno y evitar anaerobiosis.

**Fósforo total:** El fósforo total incluye distintos compuestos tales como ortofosfatos, polifosfatos y fósforo orgánico; su determinación se hace convirtiendo todos ellos en ortofosfatos que son los que se determinan por análisis químico.

El fósforo, al igual que el nitrógeno, es un nutriente esencial para la vida, pero su exceso en el agua provoca eutrofización; la mayor fuente de contaminación por fosfatos son los detergentes, los cuales además de que producen espumas, disminuyen mucho el poder autodepurador de los ríos al dificultar la actividad bacteriana. Los fosfatos interfieren también en los procesos de floculación y sedimentación en las estaciones depuradoras.

### **3.4 PROCEDENCIA, IMPLICACIONES Y DETERMINACIÓN DE LOS FOSFATOS EN AGUAS SUPERFICIALES**

#### **3.4.1 El Fósforo en las Fuentes Hídricas**

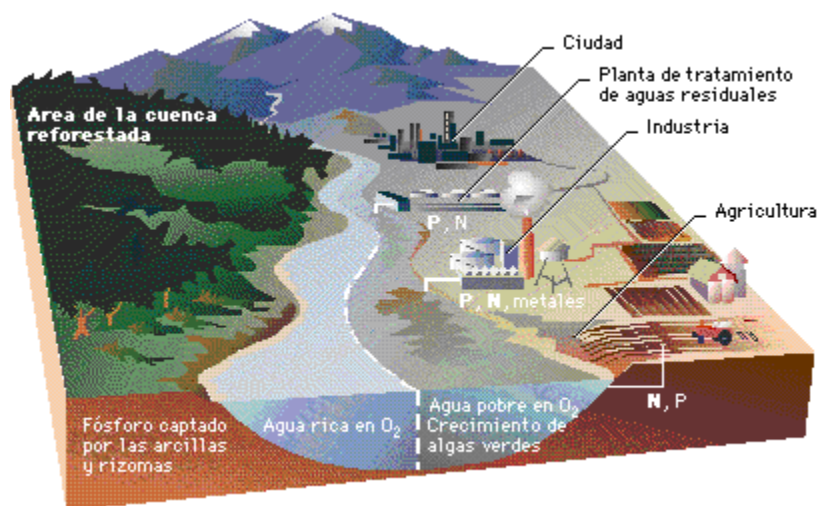
El fósforo se presenta en aguas naturales y residuales casi exclusivamente bajo la forma de fosfatos ( $H_3PO_4$  ortofosfórico,  $HPO_3$  metafosfórico y  $H_4P_2O_7$  pirofosfórico), siendo el más importante el ortofosfato  $PO_4^{3-}$ , debido a que es la forma soluble de del fósforo en el agua; todas las demás formas de fosfato se convierten a ortofosfato por calentamiento. Algunas veces, aunque con menor frecuencia, el fósforo puede estar presente en el agua bajo la forma de estructuras orgánicas tales como fosfolípidos y fragmentos de cadenas peptídicas <sup>(12)</sup>.

El fósforo en el agua proviene de diversas fuentes: De algunos procesos de tratamiento de aguas que utilizan pequeñas cantidades de fosfatos condensados como agentes floculantes, de los procesos de lavado con detergentes tanto a nivel industrial como doméstico y de las aguas residuales de los procesos agrícolas, en donde los ortofosfatos constituyen uno de los principales productos fertilizantes.

A su vez, el fósforo orgánico se deriva fundamentalmente de procesos biológicos y por ende, su presencia en esta forma, está asociada principalmente a las aguas residuales domésticas y de algunas industrias alimenticias <sup>(11)</sup>.

Debido a que en la mayoría de los cuerpos de agua existen cantidades relativamente altas de iones calcio y magnesio y que los fosfatos de dichos elementos son altamente insolubles, la concentración de fósforo bajo la forma de ortofosfato, en las aguas naturales, es relativamente baja y en general, rara vez excede los 10 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P/L}$  <sup>(11)</sup>. Los lodos y sedimentos, en donde se acumulan los fosfatos precipitados, suelen contener cantidades mayores a las existentes en solución.

Muchas actividades humanas causan vertidos que contienen nutrientes, entre los que se encuentran los fosfatos y los nitratos, en ríos y lagos; debido a que el fósforo es uno de los elementos esenciales que limitan la productividad primaria en muchos cuerpos de agua, las descargas de vertimientos fosfatados producen en los cuerpos receptores, un crecimiento abrupto y repentino en la biota fotosintetizadora; éste proceso conocido como eutrofización, provoca el crecimiento de algas y de otros componentes del plancton, de tal forma que reduce el contenido de oxígeno en el agua, como se aprecia en la figura No. 1; por ello, es importante conocer las concentraciones de fósforo en las aguas residuales, antes de verterlas a los cuerpos receptores<sup>(12)</sup>.



**Figura. No. 1.** Cuenca alterada por la actividad humana <sup>(13)</sup>.

### 3.4.2 Procedencia de Fosfatos en los Detergentes

En los años cuarenta, cuando las lavadoras automáticas aparecieron en el mercado, surgió rápidamente un grave problema; cuando se utilizaba el jabón de lavar ordinario en estas máquinas se formaba a menudo un precipitado blanco o gris gelatinoso que era el producto de la reacción entre el jabón y los iones presentes en el agua, sobre todo en aguas duras, con alta concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ . Este precipitado era desagradable porque se depositaba sobre la ropa limpia y además obstruía los pequeños orificios que permitían que el agua de lavado fuese drenada fuera del tambor del electrodoméstico. La solución a este problema fue la formulación de nuevos detergentes sintéticos.

El primer detergente sintético que apareció fue el Tide, fabricado por Procter and Gamble, en 1947 <sup>(14)</sup>.

Los detergentes sintéticos se basan en la actualidad en dos componentes principales: 1) El agente tensoactivo, que es la molécula de jabón que realiza la limpieza, y 2) El soporte, un agente añadido para secuestrar a los iones duros del agua, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , los cuales de otra forma precipitarían, interfiriendo la acción de los agentes tensoactivos.

Los soportes son agentes quelantes y los más comunes son los fosfatos representados por el tripolifosfato ( $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ ); el tripolifosfato es un agente quelante tridentado y su forma más común es la sal sódica, la cual es económica y además es capaz de establecer y mantener el pH apropiado para una acción más eficaz de los tensoactivos y es particularmente efectivo para quelar y por tanto, secuestrar los iones del agua dura <sup>(14)</sup>.

Sin embargo, existe un problema con los fosfatos; cuando la popularidad de los detergentes con fosfatos creció, miles de toneladas de fosfatos no tratados en plantas potabilizadoras, fueron vertidas a nuestros arroyos, ríos, estanques y lagos; allí se observó que estos fosfatos eran los responsables de un enorme desarrollo de algas y de otras plantas acuáticas (junto con otros nutrientes procedentes de fuentes domésticas, industriales, además de la agricultura) <sup>(14)</sup>.

Los detergentes con fosfatos se consideran una de las causas controlables y primarias de la avanzada eutrofización; a causa de esto, el uso de estos detergentes fue limitado en algunas áreas e incluso eliminado en otras. Debido a esto, se realizaron investigaciones hacia la búsqueda de los sustitutos de los fosfatos como soportes en los detergentes. Procter and Gamble desarrollaron con un costo considerable, un nuevo soporte, un excelente quelante tetradentado, el ácido nitrilotriacético ( $\text{H}_3\text{NTA}$ ), el cual puede considerarse un derivado del amoníaco en el que los tres átomos de hidrógeno han sido sustituidos por grupos

acetilo (-CH<sub>2</sub>COOH); es además un buen soporte de detergentes sintéticos. Sin embargo, algunos estudios sugerían que el quelato podía complejar también al mercurio, cadmio y plomo y de esta forma, transportar a estos cationes, permitiéndoles atravesar distintas barreras biológicas, por lo cual podría originar daños en el feto y a nivel cerebral; también se vio implicado en afecciones renales y en cáncer <sup>(14)</sup>.

Estudios posteriores de la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos demostraron que no había ninguna razón para regular el uso del NTA en los detergentes; sin embargo, el uso de este soporte en detergentes sintéticos ya se había limitado <sup>(14)</sup>.

A finales de 1971, el Council on Environmental Quality (CQE) y la EPA, efectuaron una declaración relacionada con el problema que rodeaba a los estructuradores de detergentes. Su conclusión, basada en estudios sobre beneficios y desventajas de los diversos estructuradores, fue que desde el punto de vista sanitario, los fosfatos eran los estructuradores más seguros para los detergentes, debido a sus cualidades:

1. No son tóxicos para la vida acuática ni son nocivos para la salud de las personas.
2. Pueden usarse con seguridad sobre colores, tejidos y fibras de todo tipo.
3. Pueden usarse con seguridad en las lavadoras, pues no son corrosivos ni inflamables.

Esta conclusión se obtuvo a pesar de las pruebas que indican una contribución de los fosfatos en la eutrofización. Como parte de esta declaración, también se anunció un programa de reducción de fosfatos mediante tratamientos apropiados de las aguas residuales municipales <sup>(14)</sup>.

### **3.4.3 Métodos para la Determinación de Fósforo**

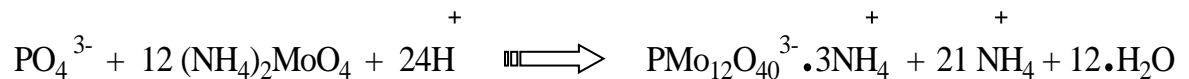
En los análisis de aguas, generalmente se distingue entre “Fósforo Reactivo”, que es el fósforo que se encuentra en la forma de ortofosfato en la muestra de agua y que se mide por el procedimiento de análisis colorimétrico directo (corresponde al fósforo inorgánico [(PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)] en la muestra <sup>(15)</sup>) y “Fósforo Hidrolizable”, que es el que se encuentra en otras formas de fosfato y/o de fosfatos condensados. Éste se mide después de someter la muestra a un proceso de hidrólisis ácida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y sin predeterminación de ortofosfatos (incluye polifosfatos [ (P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>4-</sup>), (P<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>5-</sup>), etc.], algún fósforo orgánico presente en la muestra, más los ortofosfatos inicialmente presentes (solubles) <sup>(15)</sup>). El “Fósforo Total” sólo se convierte a ortofosfato mediante digestión ó destrucción de la materia orgánica presente y corresponde a todo el

fósforo presente en la muestra, el cual es medido por el procedimiento de digestión ácida con persulfato, por lo que además de los ortofosfatos también se cuantifican los polifosfatos [ (P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>4-</sup>), (P<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>5-</sup>), etc.] y todo el fósforo orgánico presente en la muestra <sup>(1)</sup>.

La determinación de las formas específicas de fósforo en aguas superficiales, salinas, domésticas, residuales e industriales se realiza mediante el método del ácido ascórbico <sup>(7)</sup> y se basa en las reacciones que son específicas para los iones ortofosfato; así, dependiendo del pretratamiento prescrito de la muestra, las formas de fósforo pueden ser determinadas como iones ortofosfato <sup>(11)</sup>. Únicamente la forma de ortofosfato da color azul en este test.

Polifosfatos y algunos compuestos orgánicos de fósforo, pueden ser convertidos hasta la forma de ortofosfatos por hidrólisis con ácido sulfúrico y los compuestos de fósforo orgánico pueden ser convertidos a la forma de ortofosfatos por digestión con persulfato.

En el método del ácido ascórbico, las reacciones se dan de la siguiente manera: el ion fosfato reacciona con el molibdato de amonio en un medio ácido para formar un complejo de molibdofosfato.



Este complejo es reducido a un compuesto azul intensamente coloreado por el ácido ascórbico en presencia del antimonio; el color es proporcional a la concentración de fósforo y su cuantificación se lleva a cabo a 660 ó 880 nm <sup>(11)</sup>.

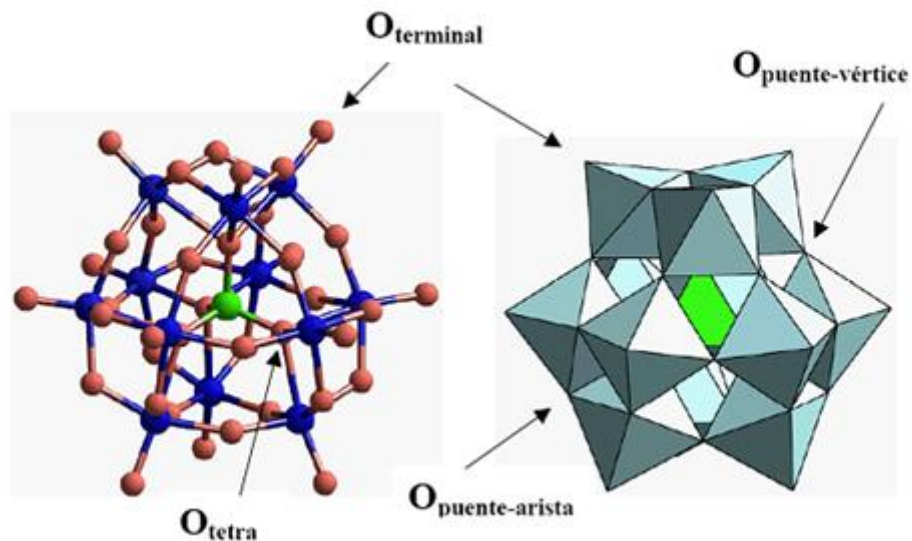
Los análisis de fósforo siguen, por lo general, dos etapas generales: 1. La transformación del fósforo existente en la muestra a la forma de ortofosfato disuelto y soluble, mediante hidrólisis o digestión y 2. La determinación colorimétrica del ortofosfato soluble.

### 3.4.4 Complejo Coloreado Fosfomolibdato

El complejo coloreado formado en la determinación de los iones ortofosfatos se denomina fosfomolibdato y su estructura se conoce como estructura de Keggin <sup>(17)</sup>.

En 1826, J. J. Berzelius <sup>(17)</sup> encontró que acidificando soluciones que contienen molibdato e iones ortofosfatos, se produce un precipitado cristalino amarillo. Este fue el primer ejemplo de un heteropolianión, del cual hoy en día sabemos que contiene el ión fosfomolibdato [PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>]<sup>3-</sup>, que puede ser usado en la determinación cuantitativa del fosfato. Está constituido por cuatro grupos M<sub>3</sub>O<sub>13</sub>

situados alrededor del heteroátomo que se encuentra unido tetraédricamente a cuatro ligandos oxo. Cada grupo  $M_3O_{13}$  es un conjunto de tres octaedros fusionados por las aristas con un vértice en común que es también un vértice del tetraedro central; el tetraedro central puede ser visto como un ligando enlazado a doce unidades.



**Figura No. 2.** Polioxometalato de  $\alpha$ -Keggin en sus modelos atómico y poliédrico <sup>(17)</sup>.

### 3.5 TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL, FÓSFORO HIDROLIZABLE Y ORTOFOSFATOS.

La espectrofotometría se refiere al uso de la luz para medir las concentraciones de una enorme cantidad de sustancias químicas, tanto orgánicas como inorgánicas, en un intervalo de longitud de onda dado. La absorción de la luz se mide en términos de absorbancia (A) o de transmitancia (T), las cuales se definen como  $A = \log (P_0/P)$  y  $T = \log (P/P_0)$  respectivamente, donde  $P_0$  es la potencia radiante de la luz que incide en la muestra y P es la potencia que emerge del otro lado <sup>(18)</sup>.

La principal aplicación analítica de la espectroscopia de absorción, deriva del hecho de que la absorbancia es proporcional a la concentración de la especie absorbente en una solución diluida como lo indica la ley de Beer:  $A = \epsilon bc$ ; en esta ecuación, b es el espesor de la celda expresada en cm, c es la concentración en moles/L, y  $\epsilon$  es la constante de proporcionalidad llamada absorptividad molar, que es característica de cada sustancia y se expresa en L/mol.cm. Cuando una muestra



no obedece la ley de Beer, puede ser debido generalmente a que una reacción química modificó la concentración del cromóforo, cuando la concentración de la muestra cambió <sup>(19)</sup>.

La parte de la molécula que es responsable de la absorción de la luz se denomina cromóforo el cual 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, por lo que recibe el nombre de cromóforo orgánico.

Para la determinación de fosfatos por espectrofotometría ultravioleta visible, se requirió de la formación del ácido fosfomolibdico <sup>(16)</sup>, el cual es reducido mediante ácido ascórbico, lo que genera el complejo fosfoantimonimolibdeno con una coloración azul, debida a las transiciones de transferencia de carga del ligando-metal (Mo), el cual es susceptible para su determinación colorimétrica a una longitud de onda de 660 ó 880nm.

El molibdeno forma uno de los iones de los metales de transición que absorben en la región ultravioleta o visible del espectro, debido a que corresponde a los elementos de la segunda serie de los metales de transición, donde los electrones responsables de dichas transiciones son los 3d y 4d y las características espectrales de estos metales suponen transiciones entre los distintos niveles de energía de los orbitales d <sup>(18)</sup>.

Desde el punto de vista analítico, las especies que presentan absorción por transferencia de carga tienen particular importancia, ya que sus absorptividades molares son muy altas, por lo que estos complejos proporcionan unos medios de muy elevada sensibilidad para la determinación de especies absorbentes. Para que un complejo presente un espectro de transferencia de carga, es necesario que uno de sus componentes tenga características de dador, en este caso, que el ligando (oxígeno) y el otro componente, tenga propiedades de aceptor de electrones como el Molibdeno.

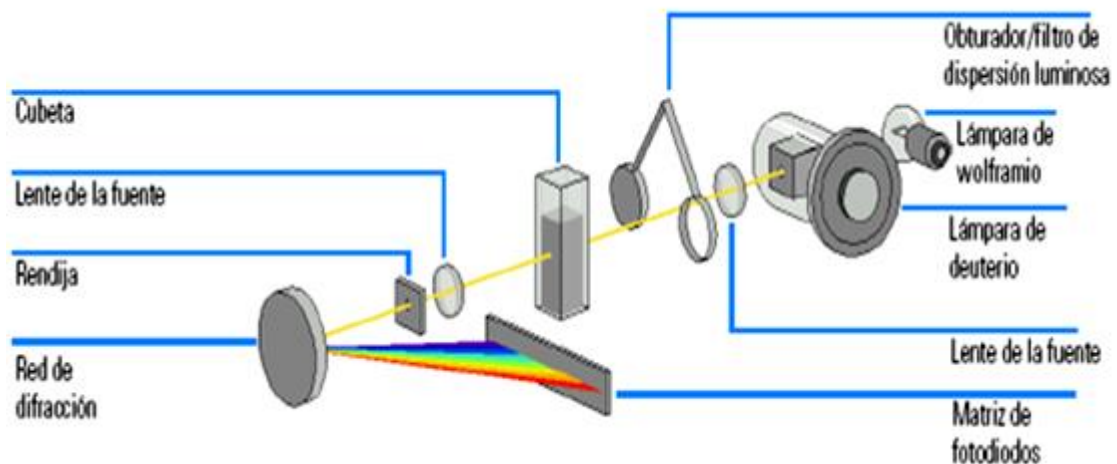
La absorción de la radiación implica entonces, la transferencia de un electrón desde el orbital dador (ligando) hasta un orbital que está en gran parte asociado con el aceptor (molibdeno) ; como consecuencia, el estado excitado es el resultado del tipo oxidación/reducción interno. Este comportamiento difiere de un cromóforo orgánico, donde el electrón en el estado excitado está en un orbital molecular formado por dos o más átomos <sup>(18)</sup>.

El equipo empleado para medir la absorbancia de la luz se denomina espectrofotómetro; los componentes del sistema óptico que se aprecian en la figura No. 3 son: una fuente de radiación, que consiste en una combinación de una lámpara de descarga de deuterio para el rango de longitudes de onda de

ultravioleta (UV) y una lámpara de wolframio para el rango de longitudes de onda visible y de onda corta del infrarrojo cercano (SWNIR). La imagen del filamento de la lámpara de wolframio se enfoca en la abertura de descarga de la lámpara de deuterio mediante un diseño especial de lámpara con acceso posterior (por lo que la lámpara emite luz a través del rango de longitudes de onda comprendido entre 370 y 1.100 nm), que permite combinar ópticamente ambas fuentes luminosas y compartir un eje común con respecto a la lente de la fuente, y que forma un único haz luminoso colimado, el cual pasa a través del obturador/filtro de corrección de dispersión luminosa, y a continuación del compartimiento de la muestra hasta la lente y la rendija del espectrógrafo. En el espectrógrafo, la luz se dispersa sobre una matriz de diodos mediante una red de difracción holográfica. Esto permite un acceso simultáneo a toda la información de longitudes de onda. El resultado es un aumento fundamental de la velocidad a la que se pueden adquirir espectros <sup>(20)</sup>.

La combinación de dispersión y representación de imágenes espectrales, se consigue utilizando una red de difracción holográfica cóncava; Ésta dispersa la radiación sobre la matriz de diodos a un ángulo proporcional a la longitud de onda y a la matriz de fotodiodos; la matriz de fotodiodos es el núcleo del espectrógrafo.

El detector es un arreglo de fotodiodos, el cual consta de series de fotodiodos individuales; estos elementos fotosensibles individuales, son pequeños fotodiodos de silicio, cada uno de los cuales consta de una unión *pn* polarizada. Este detector de estado sólido, en los cuales los fotones liberan electrones y huecos en el material conductor, está acoplado a un policromador, por lo que puede registrar simultáneamente todas las longitudes de onda de un espectro; además, posee buena resolución, porque se trata de una serie de 1.024 fotodiodos y circuitos de control individuales grabados sobre un chip semiconductor <sup>(20)</sup>.



**Figura No. 3.** Sistema óptico del espectrofotómetro Agilent 8453 UV-Visible <sup>(20)</sup>.

### 3.6 MARCO DE REFERENCIA PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En general, los resultados de una investigación se obtienen mediante la aplicación de conceptos, razonamientos y métodos de naturaleza estadística; uno de los procedimientos estadísticos más utilizados son las pruebas de análisis de varianza (ANOVA).

El análisis de varianza (ANOVA), es un método estadístico que sirve para evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas de los valores promedio entre tres ó más poblaciones estadísticas a comparar para cada variable de interés.

Cuando se requiere hacer un contraste de hipótesis para el caso de variables cuantitativas, se cuenta con dos tipos de análisis de varianza: 1. Los paramétricos, que requieren que se cumplan estos dos supuestos: a. La normalidad de las distribuciones o poblaciones y b. La homogeneidad de varianza dentro de cada población a comparar y 2. Los no paramétricos, que no exigen supuestos para poder ser aplicados <sup>(21)</sup>.

Para evaluar la normalidad, la prueba más utilizada es la de Shapiro-Wilk, debido a que esta prueba calcula un estadístico  $W$  que contrasta si una muestra aleatoria  $x_1, x_2, \dots, x_n$ , procede de una distribución específicamente normal. Pequeños valores de  $W$  son una evidencia de salida de la normalidad; para evaluar la homogeneidad de varianza se utiliza la prueba de Levene, debido a que este test aplica para el contraste de la hipótesis nula ( $H_0$ ) de la homogeneidad de las varianzas, y además permite rechazar la  $H_0$  si la significación de su estadístico es  $<$  que 0,05.

En el caso de que no se cumpla la Normalidad, se suele intentar alguna transformación de los datos que los "normalice"; algunos de los más utilizados son: La raíz cuadrada, el arcoseno y el logaritmo neperiano. Se han encontrado transformaciones que tienden a normalizar, otras tienden a estabilizar la varianza de la población en estudio y otras lograrán mejorar estas propiedades simultáneamente.

Después de verificar el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se pueden aplicar las pruebas paramétricas como: La prueba de Tukey, debido a que es la más utilizada y en la que todas las comparaciones se refieren a una diferencia mínima; la de Duncan, la cual se basa en la distribución del rango studentizado y plantea que cuantos más pasos hay entre dos medias, mayor es la diferencia que existe para considerar que son diferentes; la de Bonferoni, que controla el error, dividiendo la significación entre el número de comparaciones ó la de Dunnett que compara cada grupo con un grupo de control <sup>(21)</sup>.

En el caso de que no se diera la hipótesis de igualdad de varianzas, ni siquiera después de transformar los datos, se utilizan las pruebas paramétricas post-hoc que son válidas para el caso de normalidad y no homogeneidad de varianzas, entre las que se encuentran las de T2 de Tamhane (basado en la distribución del módulo máximo), T3 Dunnett (Modificación de la T2 de Tamhane), Games-Howell (método similar al de tukey) y el C de Dunnett (igual a Games-Howell, pero un poco más conservador) <sup>(21)</sup>.

Al no lograr satisfacer los supuestos de ANOVA paramétricos, en la mayoría de los casos se utilizan métodos estadísticos no paramétricos de pruebas de hipótesis. Estos procedimientos se basan en las magnitudes comparativas de las mediciones y son efectivas y poderosas para detectar diferencias en promedios de las poblaciones a comparar.

De las pruebas no paramétricas, la más empleada es la prueba de Kruskal-Wallis, que es el equivalente de la prueba F de ANOVA paramétrica. Esta prueba se denomina también prueba de ANOVA por rangos, pues considera la magnitud de cada observación con relación a las otras observaciones.

Las correlaciones numéricas son otros procedimientos estadísticos que se aplican considerando la falta de normalidad en la mayoría de los casos; para ello, se utiliza un procedimiento no paramétrico conocido como el coeficiente de correlación por rangos de Spearman (éste coeficiente conduce al mismo resultado que el coeficiente de correlación de Pearson), donde la hipótesis nula a probar en este caso, es la no correlación de las variables.

De igual manera, los métodos multivariados exploratorios constituyen otra herramienta estadística, cuyo objetivo consiste en buscar en los datos cierta estructura de agrupamiento natural de objetos o variables, basándose en ciertas medidas de distancias. Se utiliza la metodología del Cluster Analysis (análisis de conglomerados jerárquicos), cuyo objetivo es clasificar una muestra de objetos, individuos o elementos, en un pequeño número de grupos mutuamente excluyentes, basados en las similitudes entre los elementos.

En la metodología del análisis de conglomerados no se hacen supuestos concernientes al número de grupos o a la estructura grupal, a diferencia de los métodos de clasificación o de análisis discriminante; el Cluster de análisis, generalmente involucra al menos tres pasos: el primero consiste en la medida de alguna forma de similitud o asociación entre los elementos para determinar cuántos grupos o conglomerados existen en la muestra; el segundo paso consiste en el proceso de asignación dentro de los grupos y el paso final, consiste en determinar la composición de ciertos perfiles; los resultados del análisis de conglomerados jerárquicos se pueden representar en la forma de un diagrama bidimensional conocido como Dendograma, el cual muestra las particiones que se van dando a niveles sucesivos; en los métodos aglomerativos, inicialmente hay tantos

conglomerados como objetos o elementos. Primero se agrupan los elementos más similares y estos grupos iniciales se fusionan de acuerdo a sus similitudes; a medida que la similitud decrece, todos los subgrupos o conglomerados se fusionan en un solo cluster o conglomerado <sup>(21)</sup>.

Las correlaciones parciales entre las variables son otros de los razonamientos estadísticos, usando la mediana así como los valores respectivos de cada parámetro, las cuales indican el efecto neto que tiene una variable sobre otra, al eliminar o mantener constante el efecto de las demás.

### **3.7 NORMA TÉCNICA ISO/IEC 17025**

La NTC-ISO/IEC 17025, es una norma que aplica a laboratorios de ensayo y calibración, y propone una serie de requisitos del sistema de gestión que debe cumplir un laboratorio para demostrar que:

- ✓ Posee un sistema de gestión.
- ✓ Es técnicamente competente.
- ✓ Genera resultados técnicamente válidos.

Las ventajas de la implementación de la NTC-ISO/IEC 17025 para el Sistema de Gestión de la Calidad en un laboratorio de control de calidad se exponen a continuación:

- ✓ Contribuye a mejorar la adaptación de los servicios a los propósitos para los cuales fueron diseñados (resultando confiables y comparables).
- ✓ Previene obstáculos técnicos al comercio y facilita la cooperación tecnológica entre laboratorios y otros organismos.
- ✓ Favorece a una mayor competitividad.
- ✓ Facilita el intercambio de información y experiencia, así como la armonización de normas y procedimientos.
- ✓ Permite el reconocimiento nacional e internacional
- ✓ Logra el cumplimiento de la normatividad ambiental vigente.

Con base en lo anterior, el Laboratorio Ambiental de la CRC, está implementando el sistema de calidad para lograr la acreditación y por ende el reconocimiento de su capacidad y competencia para ejecutar los análisis de aguas con confiabilidad y de acuerdo con los estándares, como lo establece la norma NTC-ISO/IEC 17025:2005. Por lo tanto, todas las metodologías que se emplean, deben estar documentadas y estandarizadas para asegurar la calidad de los resultados y la satisfacción de los clientes.

Para cumplir con los requerimientos anteriores es necesario planear las actividades que se requieren para obtener métodos y datos confiables. Entre ellas tenemos:

**3.7.1 Estandarización de métodos analíticos:** La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso, que dependiendo de la técnica analítica a la que pertenezca el método, la matriz del analito y la cantidad de parámetros de estandarización, incluye los parámetros fundamentales para que un método analítico una vez montado, pueda empezar a reportar datos con adecuado y comprobable grado de confianza.

Mediante la estandarización se obtienen en forma experimental y para las condiciones particulares del laboratorio, los valores de los parámetros que servirán como criterios de confianza del método analítico; estos parámetros son: exactitud, precisión, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad y porcentaje de recuperación <sup>(22)</sup>.

A continuación se presentan las definiciones de los parámetros a tener en cuenta en el proceso de estandarización <sup>(22)</sup>.

**3.7.1.1 Intervalo lineal.** El intervalo lineal de un método analítico va desde la concentración más pequeña a la que se puede realizar medidas cuantitativas (límite de detección) hasta la concentración a la que la curva de calibrado se desvía de la linealidad (límite de linealidad) y dentro del cual se puede efectuar la cuantificación por interpolación en una curva de calibración <sup>(18)</sup>.

**3.7.1.2 Sensibilidad analítica.** La sensibilidad de un instrumento o de un método es una medida de su capacidad de diferenciar pequeñas variaciones en la concentración del analito <sup>(18)</sup>; los parámetros empleados para determinar la sensibilidad son los límites de detección y cuantificación.

**3.7.1.2.1 Límite de detección.** Es la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y en un nivel de confianza dado; es aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo. Se expresa en unidades de concentración <sup>(18)</sup>.

**3.7.1.2.2 Límite de cuantificación.** Es la menor concentración de analito que puede cuantificarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas. Se expresa en unidades de concentración <sup>(18)</sup>.

**3.7.1.3 Sensibilidad de Calibración:** La sensibilidad de calibrado se define como la pendiente de la curva de calibración (m) <sup>(18)</sup>.

**3.7.1.4 Precisión.** Indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra ó patrón, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones prefijadas; usualmente se expresa en términos de desviación estándar (s). Se evalúa a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad, los cuales se describen a continuación:

**3.7.1.4.1 Repetibilidad.** Es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en intervalos cortos de tiempo (mismo día), por el mismo analista, sobre la misma muestra homogénea, usando los mismos equipos.

**3.7.1.4.2 Precisión Intermedia.** Es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en intervalos de tiempo diferentes (mínimo cinco días diferentes) por el mismo analista y sobre la misma muestra homogénea, usando los mismos equipos.

**3.7.1.4.3 Reproducibilidad.** Expresa la precisión entre resultados obtenidos mediante la aplicación del mismo método por diferentes operadores y usando diferentes equipos, sobre réplicas de porciones analíticas ó tiempos diferentes (mínimo un mes).

**3.7.1.5 Exactitud.** La exactitud de un método es la aproximación más estrecha a un resultado o el promedio de una serie de resultados que se aproximan al valor verdadero o aceptado como real. Normalmente se expresa en términos de error teniendo como referencia los patrones preparados en el laboratorio y un patrón externo certificado.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

La metodología de este trabajo se desarrolló para llevar a cabo la cuantificación de fósforo total, fósforo hidrolizable e iones ortofosfatos por espectrofotometría UV-Vis en aguas superficiales del río Molino, empleando reactivos y solventes grado analítico. A continuación, se listan los equipos, reactivos, material de vidrio y plástico empleados para las diferentes determinaciones.

#### 4.1.1 Equipos

- Agitador, METROHM 728
- Balanza analítica, PRECISA 92SM- 202A ( $\pm$  0,0001g)
- Conductímetro, METROHM 712
- Cronómetro, Casio
- Desecador, SCHOTT GL 32. T ( $^{\circ}$ C), Max 200 $^{\circ}$ C
- Destilador, SCHOTT
- Desionizador, LABCONCO
- Espectrofotómetro Ultravioleta- Visible, Agilent 8453, HEWLETT PACKARD
- Horno, TERMOLYNE 62700
- Macropipeta, BRAND
- Micropipeta, BRAND 10-100 $\mu$ L
- Micropipeta, EPPENDORF MULTIPETTE PLUS
- Multiparámetros HACH
- Nevera, INDUCOL
- Oxímetro, INOLAB
- pH- metro, METLER TOLEDO MP 225
- Plancha, SCHOTT (temperatura 25- 250 $^{\circ}$ C).

#### 4.1.2 Reactivos

- Ácido ascórbico, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, 99.7%, MERCK
- Ácido clorhídrico, HCl fumante, 37%, densidad 1,19 g/mL, MERCK
- Ácido sulfúrico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 98%, densidad 1,84 g/mL MERCK
- Fosfato diácido de potasio, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 99.5%, MERCK
- Hidróxido de sodio, NaOH, 99%, MERCK
- Jabón libre de fósforo, Extran MA - 03, 99%, MERCK
- Molibdato de amonio, (NH<sub>4</sub>) Mo<sub>7</sub> O<sub>24</sub> \* 4 H<sub>2</sub>O, 99%, MERCK
- Persulfato de amonio, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 98%, MERCK
- Tartrato de antimonio y potasio, K(SbO)C<sub>4</sub>H<sub>4</sub> \* ½ H<sub>2</sub>O, 99%, MERCK



### 4.1.3 Material de vidrio y plástico

- Balones volumétricos clase A, Brand de 50, 100, 500 y 1000 mL
- Erlenmeyers de 125 mL
- Espátula
- Papel absorbente
- Pipetas aforadas clase A, Brand de 1, 5, 10, 25 y 50 mL
- Pipetas graduadas clase A, Brand de 2, 5 y 10 mL
- Recipientes plásticos ámbar de 500mL

## 4.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

A continuación se describe la preparación de las soluciones utilizadas en las determinaciones:

### 4.2.1 Soluciones de fosfato empleadas para la construcción de la curva de calibración:

1. Solución stock de fósforo, 49,75 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}$ /L: Se preparó disolviendo en agua desionizada 0,2186 g de fosfato diácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), el cual fue secado previamente en el horno a 105°C durante dos horas. Esta solución se aforó a 1000mL (1,0 mL= 0,04975 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}$ ).
2. Solución estándar de fósforo, 0,4975 mg de P- $\text{PO}_4^{3-}$ /L: Se preparó diluyendo 10,0mL de la solución stock de fósforo a 1000 mL con agua desionizada (1,0mL= 0, 4975µg de P-  $\text{PO}_4^{3-}$ ).

A partir de la solución estándar de fósforo de 0, 4975 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}$ /L, se prepararon los siguientes estándares de fosfato diácido de potasio en balones volumétricos clase A Brand de 50mL y se aforaron con agua desionizada.

Volumen empleado de la solución Estándar de fósforo de 0,4975 mg de P- $\text{PO}_4^{3-}$ /L (mL)	Concentración final del Estándar de fosfato diácido de potasio en ( mg de P- $\text{PO}_4^{3-}$ /L )
0,0	0,0000
1,0	0,0099
3,0	0,0298
5,0	0,0497
10,0	0,0995
20	0,1990
30	0,2985
40	0,3980
50	0,4975

#### 4.2.2 Soluciones usadas en la elaboración del reactivo mixto:

El reactivo mixto al interaccionar con los iones ortofosfatos forma el complejo coloreado azul, que permite su cuantificación espectrofotométrica.

Las soluciones utilizadas para la preparación de este reactivo se describen a continuación:

1. Solución de ácido sulfúrico, 5N: En un vaso de precipitados, se adicionó 70 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado, se diluyó con agua desionizada aproximadamente a 400 mL y cuando la solución alcanzó la temperatura ambiente, se aforó en un balón a 500 mL.
2. Solución de tartrato de antimonio y potasio, 0,011M: En un vaso de precipitados, se disolvió en agua desionizada 0,2743 g de  $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ , y posteriormente se aforó en un balón a 100 mL.
3. Solución de molibdato de amonio, 0,032M: Se disolvió 4,0 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en 100 mL de agua desionizada. Para su almacenamiento, se utilizó un recipiente de plástico y se refrigeró a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 días.
4. Solución de ácido ascórbico, 0,1M: Se disolvió en un vaso de precipitados 1,76 g de ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) en 100 mL de agua desionizada. La solución se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  en un recipiente ámbar y fue estable durante una semana.

**Preparación del reactivo mixto:** Se mezclaron las siguientes proporciones: 50 mL de solución de ácido sulfúrico 5N, 5 mL de solución de tartrato de antimonio y potasio 0,01M, 15 mL de solución de molibdato de amonio 0,03M y 30 mL de solución de ácido ascórbico, 0,1 M; se obtuvieron 100 mL del reactivo mixto. Estas soluciones se adicionaron con pipetas aforadas grado A en un recipiente de vidrio ámbar de 100mL.

Todos los reactivos se encontraban a temperatura ambiente antes de ser mezclados y se adicionaron en el orden dado, mezclando la solución después de la adición de cada reactivo. Este reactivo fue estable únicamente por 4 horas, por lo que se preparó para cada análisis.

#### 4.2.3 Soluciones y reactivos empleados para la digestión de fósforo total y fósforo hidrolizable:

1. Solución de ácido sulfúrico, 11N: Se adicionó cuidadosamente en un vaso de precipitados, 310 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado a 600 mL de agua desionizada; cuando la solución alcanzó la temperatura ambiente, se diluyó a 1000 mL en un balón aforado.

2. Solución de ácido sulfúrico, 6 N: Se adicionó en un vaso de precipitados 54,54 mL de ácido sulfúrico 11 N, 20 mL de agua desionizada; cuando la solución alcanzó la temperatura ambiente, se diluyó a 100 mL en un balón aforado.
3. Solución de ácido sulfúrico, 1 N: Se adicionó en un balón aforado 16,6 mL de ácido sulfúrico 6 N y se diluyó a 100 mL.
4. Solución de ácido sulfúrico, 0,1 N: Se adicionó en un balón aforado 10 mL de ácido sulfúrico 1 N y se diluyó a 100 mL.
5. Solución de ácido sulfúrico, 0,01 N: Se adicionó en un balón aforado 10 mL de ácido sulfúrico 0,1 N y se diluyó a 100 mL.
6. Solución de hidróxido de sodio, 5,94 N: Se disolvió cuidadosamente en un vaso de precipitados, 24 g hidróxido de sodio (sólido) con agua desionizada; cuando la solución alcanzó la temperatura ambiente, se diluyó a 100 mL en un balón aforado.
7. Solución de hidróxido de sodio, 0,98 N: Se adicionó en un balón aforado 16,6 mL de hidróxido de sodio 5,94 N y se diluyó a 100 mL.
8. Solución de hidróxido de sodio, 0,098 N: Se adicionó en un balón aforado 10,0 mL de hidróxido de sodio 0,98 N y se diluyó a 100 mL.
9. Solución de hidróxido de sodio, 0,0098 N: Se adicionó en un balón aforado 10,0 mL de hidróxido de sodio 0,098 N y se diluyó a 100 mL.
10. Hidróxido de sodio: Se utilizó NaOH (Sólido).
11. Persulfato de amonio: Se utilizó  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (Sólido).

### **4.3 SITIO DE MUESTREO**

#### **4.3.1 Ubicación Geográfica de la zona de muestreo**

- Los sitios de muestreo ó las estaciones de muestreo de las muestras de agua utilizadas en la estandarización del método analítico para la determinación de ortofosfato en aguas superficiales, se describen a continuación:

Ciudad de Popayán (salida a Cali), se obtuvo una muestra puntual en el río Blanco, la cual se analizó y presentó una concentración de ortofosfatos <50% del rango de la curva de calibración; ésta muestra puntual se denominó  $M_1$  y fue adicionada con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a un nivel bajo (30% de la concentración de  $M_1$ ), a un nivel medio (50% de la concentración de  $M_1$ ) y a un nivel alto (70% de la concentración de  $M_1$ ).

Río Cauca, en el tramo de la zona urbana de Popayán (variante, estación de muestreo 12 de la figura No. 4.), se obtuvo una muestra puntual simple; de igual manera se analizó su concentración de ortofosfatos, encontrándose una concentración mayor que la de  $M_1$ ; se denominó  $M_2$ .

Los sitios de muestreo se escogieron teniendo en cuenta el rango de concentración de las muestras  $M_1$  y  $M_2$  dentro de la curva de calibración; la muestra  $M_1$  debía presentar una concentración de ortofosfatos menor del 50% en la curva de calibración, por lo que se escogió el Río Blanco, el cual presenta poca contaminación por fosfatos al no recibir aguas residuales. La concentración de ortofosfatos en la muestra  $M_2$  debía ser más elevada, por lo que, se tomo la muestra en el Río Cauca, el cual si es impactado por descargas de fosfatos provenientes de aguas residuales.

- Una vez estandarizado el método, las muestras puntuales a analizar para determinarles el contenido de ortofosfatos, fósforo hidrolizable y fósforo total, se tomaron en varios puntos en el río Molino. La ubicación de las 12 estaciones de muestreo en el municipio de Popayán, se muestran en la figura No. 4 (Mapa Hidrográfico de la Subcuenca Río Molino) y corresponden a: 1. En la cra 1 con transversal 3A, 2. cra 4A Yambirará (Quebrada Yambirará), 3. En la calle 25N vía al Huila (estadio Ciro López), 4. En el barrio la estancia calle 15, 5. En la carrera 11 del barrio Modelo, 6. En la carrera 17 de barrio Pandiguando, 7. En la pista del aeropuerto en el barrio Camilo Torres, 8. En la calle 4 con carrera 34, barrio Nuevo Hogar, 9. En la carrera 32 de barrio Junín (Río Ejido), 10. En el barrio 5 de Abril, 11. En la avenida Panamericana /Rancho Grande (Río Cauca), 12. En la variante (Río Cauca).

El muestreo para la evaluación del contenido de fósforo total, fósforo hidrolizable y ortofosfatos, se realizó durante 6 meses, tomando una muestra puntual cada semana en dichas estaciones (La estación 2 que es la quebrada Yambitará, la 9 correspondiente al río Ejido, las 11 y 12 pertenecientes al Río Cauca (Rancho Grande y Variante, respectivamente); los cuales se analizaron mensualmente porque las estaciones 2 y 9 son afluentes del río molino (es decir, vierten sus aguas sobre éste) el cual posteriormente fluye hacia al río Cauca (las estaciones 11 y 12); es decir, es un afluente de éste.

Los sitios de muestreo se escogieron teniendo en cuenta la distribución de los asentamientos humanos a las orillas del río, ya que por ejemplo algunos arrojan directamente las aguas servidas al mismo, sin pasar por el sistema colector, haciendo su descarga al río Molino entre la estación de muestreo 6 y 7 ubicada dentro de la ciudad.

A cada muestra de agua recolectada semanal y mensualmente durante los 6 meses en el río Molino, se le determinaron además de los fosfatos parámetros como pH, conductividad y oxígeno disuelto “in situ”.

- Las estaciones de muestreo en el río Molino a las cuales se les realizaron dos muestreos puntuales, correspondientes a la época de invierno (julio) y la época de verano (septiembre), y que se muestran en la figura No. 4, fueron las siguientes: (A) En la vereda pueblillo, donde aún la fuente hídrica no tiene contacto con la ciudad de Popayán, (B) en la ciudad, en el puente del edificio César Negret (entre las estaciones de muestreo 4 y 5 de la figura No. 4), después de la ciudad, (C) en el barrio Junín y finalmente en la desembocadura al río Cauca (D), después de mezclarse con el río Ejido.

A las muestras puntuales tomadas en las estaciones de muestreo A, B, C, y D se les realizaron análisis fisicoquímicos como: Color, Turbidez, Nitratos, Fosfatos,  $\text{DBO}_5$ , DQO, SST, Grasas y aceites y microbiológicos como: Coliformes totales y fecales.

#### **4.3.2 Recolección, Manipulación y Preservación de la Muestra**

Para la adecuada recolección de las muestras de agua se utilizaron botellas de plástico ámbar de 500 mL.

Todo el material de vidrio utilizado para todas las determinaciones de fósforo, fue acondicionado realizándole lavados ácidos con  $\text{HCl} - \text{H}_2\text{O}$  (1:1) y posteriormente enjuagaron con agua desionizada. El lavado ácido del material de vidrio se realizó para remover las últimas trazas de fósforo que podrían estar absorbidas sobre el material que se usó únicamente para ésta determinación, por lo que los lavados ácidos se realizaron sólo ocasionalmente.

Adicionalmente, todo el material utilizado en el análisis de muestras y estándares se lavó con jabón libre de fosfatos después del lavado ácido.

Cuando el análisis no pudo llevarse a cabo el día de la recolección, las muestras se conservaron con la adición de 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado por litro de solución y se refrigeraron a  $4^\circ\text{C}$ .

#### 4.4 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ORTOFOSFATOS

Con el propósito de implementar éste método espectrofotométrico, fue necesario optimizar las condiciones experimentales, por lo que se verificó que el equipo, (Espectrofotómetro Ultravioleta - Visible, Agilent 8453) con el que cuenta el laboratorio ambiental (que se muestra en la figura No. 5), funcionara en las condiciones adecuadas para obtener la correcta lectura de los estándares y muestras.



**Figura No.5.** Espectrofotómetro Ultravioleta - Visible, Agilent 8453

Las condiciones optimizadas fueron:

**4.4.1 Calibración del espectrofotómetro:** La verificación de la calibración del espectrofotómetro se llevó a cabo semanal y mensualmente como lo recomienda el fabricante, mediante la utilización de su software; semanalmente se realizó la evaluación de diagnóstico de la corriente o ruido de fondo, al igual que la intensidad y la estabilidad del espectrofotómetro. De igual manera se realizó la calibración mensual, la cual consistió en la verificación del diagnóstico de todo el sistema espectrofotométrico.

**4.4.2 Selección de la longitud de onda:** Con el fin de seleccionar la longitud de onda de máxima absorción del complejo coloreado fosfomolibdato, para así poder establecer las condiciones óptimas de trabajo y posteriormente preparar la curva de calibración que relacionara la absorbancia del analito con su concentración, se realizó un barrido en la región visible-infrarrojo cercano, comprendida en el

intervalo de longitudes de onda de 400 a 1100 nm; este barrido se realizó con soluciones estándar de ortofosfatos de concentraciones 0,0099, 0,0298, 0,0497 y 0,0995 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ .

#### **4.5 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN**

El método empleado para el análisis cuantitativo de los iones ortofosfato fue la curva de calibración y para ello se prepararon una serie de soluciones estándar de concentraciones de 0,0099, 0,0298, 0,0497, 0,995, 0,1990, 0,2985, 0,3980 y 0,4975 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$  a las cuales se les ajustó el pH a  $7,0 \pm 0,2$  con soluciones de NaOH de concentración 5,94N, 0,98N, 0,098N ó 0,0098N. Seguidamente con las absorbancias registradas para cada concentración (cada una de ellas se midió 5 veces), se construyó la curva de calibración.

Debido a que el intervalo de tiempo para la lectura espectrofotométrica de los estándares reportado por la literatura es muy amplio (10 – 40 min), adicionalmente se realizaron curvas de calibración a diferentes tiempos de reacción (10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 min.) para el rango de concentraciones comprendido entre 0,0099 y 0,4975 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ .

#### **4.6 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ORTOFOSFATOS**

Una vez realizada la curva de calibración de ortofosfatos, se llevo a cabo ésta etapa con el propósito de obtener en forma experimental y para las condiciones particulares del laboratorio ambiental, los valores de los parámetros estadísticos que se usarán como criterio de confianza del método analítico. A continuación, se describe cada uno de estos parámetros:

**4.6.1 Intervalo lineal:** Para evaluar la linealidad, se preparó una curva de calibración en el intervalo de concentraciones empleadas para el método de cuantificación (4.5). A las soluciones, una vez preparadas, se les ajustó el pH a  $7,0 \pm 0,2$  con soluciones de NaOH de concentración 5,94N, 0,98N, 0,098N ó 0,0098N y de igual manera que en el método de cuantificación se leyeron sus absorbancias en el espectrofotómetro. A cada estándar de ortofosfatos se le realizaron cinco lecturas y a partir de los datos obtenidos de absorbancia y sus respectivas concentraciones, se graficó la curva de calibración para establecer el intervalo lineal de este método.

**4.6.2 Sensibilidad analítica:** Los parámetros empleados para determinar la sensibilidad analítica fueron los límites de detección y cuantificación, que se describen a continuación:

Para calcular el límite de detección y el límite de cuantificación, se preparó el blanco (el cual se leyó 10 veces en diferentes días) y tres soluciones patrón de ortofosfatos de concentración 0,0099, 0,0298 y 0,0497 mg de P- PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L, las cuales corresponden a las concentraciones más bajas de la curva de calibración ya establecida; al blanco y a cada estándar se les leyó su absorbancia (10 y 5 veces respectivamente) y de esta manera se calculó la mínima concentración de ortofosfatos detectable y cuantificable por el método espectrofotométrico.

**4.6.3 Sensibilidad de Calibración:** La sensibilidad de calibrado se define como la pendiente de la curva de calibración <sup>(18)</sup> (m), por lo que se empleó la pendiente obtenida en el método de cuantificación (4,5).

**4.6.4 Precisión:** Con el fin de analizar el grado de concordancia entre los datos individuales obtenidos cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea y la repetibilidad, cada muestra y/o estándar se midió cinco veces, determinándose la desviación estándar (s) y la desviación estándar relativa (RSD).

La precisión se evaluó a tres niveles: Repetibilidad, Precisión intermedia y reproducibilidad.

**4.6.4.1 Repetibilidad:** Se analizó la precisión obtenida con seis lecturas para el estándar de ortofosfatos de concentración 0,3980 mg de P- PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> /L, bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo de tiempo corto (mismo día), por el mismo analista, sobre la misma muestra homogénea y usando los mismos equipos.

**4.6.4.2 Precisión intermedia ó precisión espectrofotométrica:** Se examinó como la precisión obtenida para los estándares 0,0099, 0,0298, 0,0497 mg de P- PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> /L y para una muestra de río Molino (M<sub>6</sub>) tomada en la estación de muestreo 6 (Figura No. 4), bajo las mismas condiciones de operación, en intervalos de tiempo diferentes (durante 10 días diferentes), por el mismo analista, sobre la misma muestra homogénea y usando el mismo equipo.

**4.6.4.3 Reproducibilidad.** Expresó como la precisión entre resultados obtenidos mediante la aplicación del mismo método en tiempos diferentes. Se analizó los estándares de 0,0995 y 0,2985 mg de P- PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L cada semana durante dos meses.

**4.6.5 Precisión del método:** Se examinó como la precisión obtenida para una muestra de río Molino (M<sub>6</sub>) tomada en la estación de muestreo 6 (Figura No. 4), que bajo las mismas condiciones de operación, en intervalos de tiempo diferentes, se preparó diariamente, durante 5 días y se procedió a analizar por el mismo analista, sobre la misma muestra homogénea y usando el mismo equipo.



**4.6.6 Exactitud:** Se expresó como la exactitud entre los resultados obtenidos mediante el análisis del estándar del IDEAM (028-2, lote 011574), utilizado en las pruebas de desempeño del año 2006 en diferentes laboratorios del país aplicando el mismo método, por diferentes operadores y usando diferentes equipos, sobre réplicas de proporciones analíticas.

**4.6.7 Exactitud del método de extracción:** Se evaluó como porcentaje de recuperación; consistió en adicionar cantidades conocidas de un patrón de ortofosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), a una muestra del río Blanco ( $M_1$ ), la cual presentó una concentración de ortofosfatos baja en el rango de trabajo; la muestra del río Blanco ( $M_1$ ) se adicionó en un 30, 50 y 70% de su concentración inicial con el patrón de ortofosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), para evaluar el porcentaje de recuperación. Para ello, se midió espectrofotométricamente la absorbancia de la muestra  $M_1$  sin adición del patrón de ortofosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ),  $M_1$  con la adición del patrón de ortofosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y la alícuota de adición del patrón de ortofosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); este procedimiento se llevó a cabo de la misma manera para las tres adiciones 30, 50 y 70%.

Con las absorbancias obtenidas, se halló cada una de las concentraciones en la curva de calibración y se utilizó la siguiente ecuación para hallar el porcentaje de recuperación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{(M_1 \text{ con adición de patrón de ortofosfatos}) - (M_1 \text{ sin adición de patrón de ortofosfatos})}{\text{concentración de adición del patrón de ortofosfatos}} * 100$$

## 4.7 ESTABILIDAD DE LOS IONES ORTOFOSFATOS

**4.7.1 Estabilidad de los estándares:** Para evaluar la estabilidad de los patrones en el tiempo, se prepararon 3 soluciones estándar de diferente concentración (0,0099, 0,0298 y 0,0497 mg de  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ), y se analizaron mediante dos tratamientos: El tratamiento 1, consistió en preparar y analizar diariamente, durante diez días los patrones de dicha concentración. El tratamiento 2, consistió en preparar y analizar los patrones de dichas concentraciones que se guardaron (refrigeradas a  $4^\circ\text{C}$ ) para leerlos durante 10 días consecutivos.

**4.7.2 Estabilidad de la muestra del río Molino ( $M_6$ ):** Para evaluar la estabilidad de la muestra del río Molino en el tiempo, se analizó una muestra de agua de la estación de muestreo 6 (Figura No. 4), aplicando diferentes formas de preservar (una preservada según el estándar métodos <sup>(15)</sup>, una sin preservar : sin la adición de 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  por litro de muestra y la tercera con adición del reactivo mixto),

las cuales fueron guardadas (refrigeradas a 4°C) y analizadas durante 10 días consecutivos.

A continuación, se describen los tres tratamientos de preservación de la muestra del río Molino:

M<sub>6</sub> preserva: Corresponde a una muestra del río molino (estación de muestreo 6), la cual se preservó como lo indica la literatura<sup>(15)</sup> (con la adición de 2 mL de ácido sulfúrico por litro de muestra), se preparó y analizó diariamente durante 10 días su contenido de ortofosfatos por triplicado según se describirá en el método en la sección 4.9.

M<sub>6</sub> sin preserva: Corresponde a una muestra del río molino (estación de muestreo 6), la cual no se preservó según lo indica la literatura<sup>(15)</sup> y se procedió a analizar el contenido de ortofosfatos por triplicado según el método que se describirá en la sección 4.9, seguidamente se refrigeró para continuar su análisis por nueve días más.

M<sub>6</sub> + mixto: Corresponde a una muestra del río molino (estación de muestreo 6), a la cual se le adicionó el reactivo mixto (quien forma el complejo coloreado con el ión ortofosfato, permitiendo así su cuantificación), y se analizó por triplicado espectrofotométricamente; posteriormente se refrigeró para continuar su análisis por nueve días más.

## **4.8 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE ORTOFOSFATOS EN AGUA SUPERFICIALES**

El método a estandarizar en esta pasantía es el del ácido ascórbico, el cual permitirá la cuantificación de los iones ortofosfatos, posteriormente, mediante digestiones previas, nos permitirá cuantificar el Fósforo total y Fósforo hidrolizable en aguas superficiales. Éste método es aplicable en el intervalo de concentraciones de 0,0099 a 0,4975 mg de P- PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L, valor de ortofosfatos que generalmente es el encontrado en las aguas superficiales <sup>(15, 16)</sup>.

### **4.8.1 Parte experimental de la estandarización**

La parte experimental para la estandarización, consistió en la lectura de los estándares de fosfato diácido de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), las muestras del río blanco y río Cauca, además del estándar certificado del IDEAM; se llevó a cabo el registro diario de resultados de los ensayos para el siguiente grupo de muestras.

En total, se realizaron 7 ensayos continuos en 7 días diferentes, con una diferencia máxima de tres días entre un ensayo y otro (viernes-lunes). El grupo básico de muestras en cada ensayo fue:

1. BK: Blanco de reactivos
2. Eb: Estándar de concentración baja (0,009 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ), que permitió calcular el límite de detección del método.
3. Em: Estándar de concentración media (0,2985 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ), aproximadamente al 60% del rango.
4. Ea: Estándar de concentración alta (0,3980 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ), aproximadamente al 80% del rango.
5. M<sub>1</sub>: Muestra natural para ver efectos de la matriz real (río Blanco), concentración <50% del rango.
6. M<sub>2</sub>: Muestra natural para ver efectos de la matriz real (río Cauca, tramo zona urbana Popayán. Estación de muestreo 11), concentración >>M<sub>1</sub>
7. M<sub>1</sub>Ab: M<sub>1</sub> adicionada con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  un nivel bajo, el 30% del valor de M<sub>1</sub>
8. M<sub>1</sub>Am: M<sub>1</sub> adicionada con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  un nivel medio el 50% del valor de M<sub>1</sub>
9. M<sub>1</sub>Aa: M<sub>1</sub> adicionada con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  un nivel alto, el 70% del valor de M<sub>1</sub>
10. Mc: Muestra estándar certificado IDEAM. Se utilizó en los últimos cuatro días.

Las muestras 2, 3, 4 y 6 se analizaron por duplicado, y las muestras 5, 7, 8 y 9 por triplicado, hasta obtener un total de 20 datos diarios (22 datos en los tres días que se analizó el estándar certificado del IDEAM). En esta etapa de la lectura de las muestras, fue donde se obtuvieron todos los datos primarios y en su ejecución se cumplieron ciertas condiciones mínimas:

- Todo el material de vidrio se lavó previamente de acuerdo con el procedimiento establecido en el Laboratorio para cada uso y se sometió a la revisión o control de calidad correspondiente <sup>(15)</sup>.
- Cada grupo de muestras se analizó, en el mismo día, corriendo todas las muestras en forma paralela.
- El proceso se inició siempre a la misma hora y lo suficientemente temprano para que se pudiera cumplir con el análisis de todas las muestras, teniendo en cuenta que pueden ocurrir imprevistos.
- El formato de captura de datos se diligenció en el mismo momento en que se obtuvieron los datos (no se transcribió, copió, etc.).

#### **4.9 PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL, FÓSFORO HIDROLIZABLE Y ORTOFOSFATOS**

Para la determinación de fósforo total, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- Se adicionó 1 mL de solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  11N a 50 mL de muestra en un erlenmeyer de 125 mL.
- Se agregaron 0,4 g de persulfato de amonio.
- Se ebulló suavemente sobre una plancha hasta un volumen final de aproximadamente 10 mL; no se permitió el secado de la muestra.
- Se dejó enfriar y cuando la solución alcanzó la temperatura ambiente, se diluyó la muestra aproximadamente a 30 mL con agua desionizada. Debido a que después de la digestión la muestra posee un pH muy ácido, se ajustó el pH a  $7,0 \pm 0,2$  con soluciones de NaOH 5,94N, 0,98N, 0,098N ó 0,0098 N, usando micropipeta y pH-metro.
- Se aforó a 50mL
- Se determinó el fósforo total como ortofosfato.

Para la determinación de fósforo hidrolizable, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- Se adicionó 1 mL de la solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  11N a 50 mL de muestra en un erlenmeyer de 125 mL.
- Se ebulló suavemente sobre una plancha hasta un volumen final de aproximadamente 10 mL; no se permitió el secado de la muestra.
- Se dejó enfriar y cuando la solución alcanzó la temperatura ambiente, se diluyó la muestra aproximadamente a 30 mL. Debido a que después de la digestión la muestra posee un pH muy ácido, se ajustó el pH a  $7,0 \pm 0,2$  con soluciones de NaOH 5,94N, 0,98N, 0,098N ó 0,0098 N, usando micropipeta y pH-metro.
- Se aforó a 50mL
- Se determinó el fósforo hidrolizable como ortofosfato.

Para la determinación de ortofosfatos, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- Estándares:

- El pH de cada una de las soluciones estándares de fosfato diácido de potasio de concentraciones 0,0099, 0,0298, 0,0497, 0,0995, 0,1990, 0,2985, 0,3980 y 0,4975 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}$ /L, se ajustó a  $7,0 \pm 0,2$ , con soluciones de NaOH de concentración 5,94N, 0,98N, 0,098N ó 0,0098 N respectivamente, usando un pH-metro.
- De la solución anterior, se colocó una alícuota de 25 mL en un erlenmeyer de 125mL.
- Se adicionaron 4 mL de reactivo mixto (cuya preparación se describió anteriormente en 4.2.2) y la mezcla se agitó durante 10 segundos.
- Pasados 20 minutos, se midió la absorbancia de cada estándar a 880 nm en el espectrofotómetro, usando el blanco de reactivos como solución de referencia <sup>(15)</sup>.

- Muestras:

- Se ajustó el pH de la muestra a  $7,0 \pm 0,2$ , con soluciones de NaOH de concentraciones 5,94N, 0,98N, 0,098N ó 0,0098 N, respectivamente, usando un pH-metro.
- De la solución anterior, se colocó una alícuota de 25 mL en un erlenmeyer de 125mL.
- Se adicionaron 4 mL de reactivo mixto (cuya preparación se describió anteriormente en 4.2.2) y la mezcla se agitó durante 10 segundos.
- Pasados 20 minutos, se midió la absorbancia de cada muestra a 880 nm en el espectrofotómetro, usando el blanco de reactivos como solución de referencia <sup>(15)</sup>.

Antes de llevar a cabo las lecturas de muestras de agua en cada uno de los muestreos, se utilizó como mínimo un blanco y dos estándares para chequear y comprobar las concentraciones graficadas en la curva de calibración; se verificó que la diferencia entre los estándares de la gráfica y los preparados diariamente no fuera superior en aproximadamente un 2%.

Los valores de concentración de ortofosfatos, fósforo hidrolizable y fósforo total de las muestras de agua analizadas, siguiendo el procedimiento que se describió en esta sección, fueron obtenidos directamente de la curva de calibración.

Los resultados obtenidos se reportaron como mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}$ / L.

#### 4.10 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO MOLINO

- A las muestras de agua puntuales del río Molino, de las estaciones de muestreo A, B, C y D, se le realizaron análisis fisicoquímicos de: Color, Turbidez, Nitratos, Fosfatos, DBO<sub>5</sub>, DQO, SST, Grasas y aceites y microbiológicos de: Coliformes totales y fecales

La metodología utilizada para la determinación de cada uno de estos parámetros, pertenece a los protocolos de análisis de aguas empleados en el Laboratorio Ambiental de la Corporación Autónoma Regional del Cauca (C.R.C). En la tabla 2 se listan los métodos de análisis de cada parámetro y sus respectivas unidades.

**Tabla 2.** Parámetros analizados al río Molino <sup>(11)</sup>

Parámetro	Método	Unidad	Valor máximo aceptable (mg/L) para consumo humano <sup>(21)</sup>
Color	Platino-Cobalto	UPC	15
Turbidez	Fotométrico	UNT	2
Nitratos	Ácido clorhídrico	mg/L N	10
Fosfatos	Ácido ascórbico	mg/L P	0,5
DBO <sub>5</sub>	Incubación 5 días- Electrómetro	mg/L	-
DQO	Oxidación con ácido cromosulfúrico	mg/L	-
SST	Gravimétrico	mg/L	-
Grasas y aceites	Soxhlet- Gravimétrico	mg/L	-
Coliformes fecales	Sustrato Definido	NMP Microorganismos/100mL	0 microorganismos
Coliformes totales	Sustrato Definido	NMP Microorganismos/100mL	0 microorganismos

- A las muestras de agua recolectada semanal y mensualmente en el río Molino en las doce estaciones de muestreo y durante los 6 meses de muestreo, se le midieron los parámetros de pH, conductividad y oxígeno disuelto “in situ”, mediante la utilización de las sondas de pH, de conductividad y oxígeno disuelto del multiparámetros portátil HACH.

#### 4.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Con el objeto de analizar los resultados de la estandarización y de los muestreos, fue necesario aplicar un método estadístico para hacer un tratamiento a los datos obtenidos, lo cual permitió rechazar datos considerados dudosos y obtener un promedio adecuado, con una baja desviación estándar; lo anterior nos permitió calcular el t estadístico para los valores extremos de cada grupo máximo y mínimo, de la siguiente manera:

- Se ordenaron los datos concentraciones de menor a mayor : [ X<sub>bajo</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, ...X<sub>alto</sub>]
  - Se calculó la media y la desviación estándar ( $\bar{x}$  y s)
  - Se calculó t como:  $\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$
  - Donde  $\mu$  = media real de la población  
 $\bar{x}$  = media  
t = es un número denominado t de Student  
s = desviación estándar medida
- Si el t calculado fue mayor que el t de tablas (para un nivel de confianza del 95% y sus respectivos grados de libertad), el dato se rechazó <sup>(19)</sup>.
- Se realizó la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA), de acuerdo a si los datos se ajustaban o no a la normalidad y homogeneidad de varianzas mediante la aplicación del paquete estadístico SPSS <sup>(24)</sup>, con el objeto de verificar si hay diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de cada muestra y estándar analizado, para poder establecer la confiabilidad en los datos de los parámetros a estandarizar en el método.
  - Los resultados de los muestreos del río Molino, se analizaron estadísticamente usando el paquete estadístico SPSS <sup>(24)</sup>, mediante pruebas paramétricas y no paramétricas para observar las diferencias significativas entre los valores de ortofosfatos, fósforo hidrolizable y fósforo total en los diferentes muestreos y estaciones de muestreo.

#### 4.12 ELABORACIÓN Y PRESENTACIÓN DE DOCUMENTOS

Como resultado de esta pasantía, se presentan cuatro documentos:

- Protocolo de estandarización: Se tomó como referencia el protocolo de estandarización de los métodos analíticos del IDEAM <sup>(22)</sup>, haciendo los ajustes correspondientes para las características del analito y de la técnica utilizada.
- Carpeta de soporte: Contiene todos los documentos originales producidos durante el proceso de estandarización, las notas y observaciones del analista, hojas de captura de datos, cálculos y demás información que permitió la revisión del proceso y/o su replicación por otro analista o por otro laboratorio.
- Parámetros de estandarización: 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.
- Memoria de la pasantía la cual incluye: El resumen, el planteamiento del problema, los objetivos, el fundamento teórico y estado del arte, la metodología, el análisis de resultados, las conclusiones y la bibliografía.

## 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 5.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ORTOFOSFATOS

**5.1.1 Calibración del espectrofotómetro:** se comprobó semanalmente el adecuado funcionamiento del equipo a través de la verificación de los parámetros de la corriente de fondo, la intensidad y la estabilidad de la siguiente manera: En la evaluación de la corriente de fondo, se obtuvo el espectro de ésta corriente vs el número de diodos (correspondientes al detector), dando una señal en un rango esperado de 2000-4000 cts. En cuanto al análisis de la intensidad de las lámparas (tungsteno y deuterio), se realizaron las correcciones de intensidad en el intervalo de 2000 a 10000 cts vs la longitud de onda desde 200 a 900nm. Finalmente se verificó la estabilidad del sistema, realizando un test de estabilidad de la intensidad vs el tiempo (60s) a 340 nm, en el cual la línea base confirmó la ausencia de ruido por causas electrónicas y las fluctuaciones en las intensidades de las lámparas, entre otros.

La calibración mensual consistió en la verificación del diagnóstico de todo el sistema espectrofotométrico, incluyendo los parámetros verificados anteriormente teniendo en cuenta que éste estudio fue un poco más riguroso.

**5.1.2 Selección de la longitud de onda:** Una vez realizado el barrido a las cuatro soluciones patrón de ortofosfatos de concentraciones 0,0099, 0,0298, 0,0497 y 0,0995 mg de P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L, con el espectrofotómetro Ultravioleta-Visible, Agilent 8453, se observaron dos picos de absorción: un pico de intensidad media, alrededor de los 700nm y un pico de intensidad máxima de absorción a una longitud de onda de 880nm, como se observa en la figura No. 6.

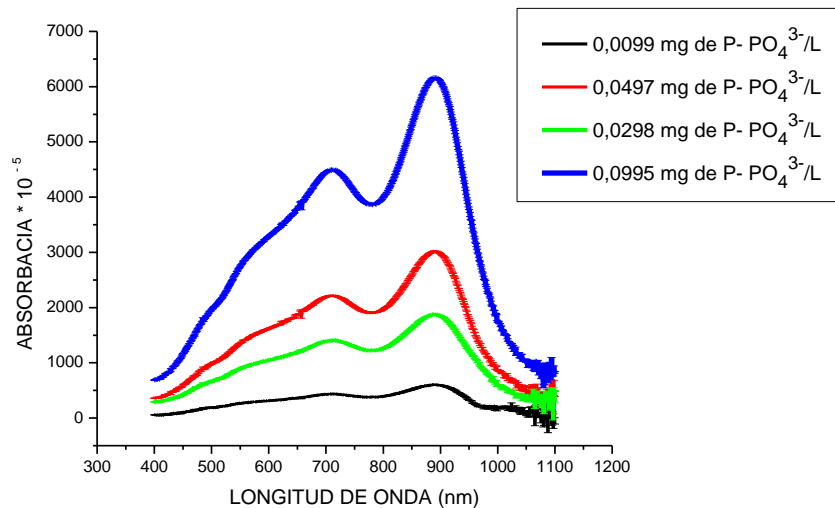
Los dos picos de absorción observados en el espectro, se explican mediante el orbital molecular del ion [MoO<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>, el cual es responsable del color azul característico del heteropolianión de  $\alpha$ - Keggin, que indica que las absorciones presentadas son debidas a la transferencia de carga ligando – metal (O<sub>2</sub> → Mo):

- Transiciones  $\pi \rightarrow eg^*$  de menor energía, por lo tanto, se obtiene mayor longitud de onda, la cual absorbe en el Infrarrojo cercano a 880nm <sup>(25)</sup>.
- Transición  $\pi \rightarrow t_{2g}$  de mayor energía (por ende menor longitud de onda), correspondiente a la absorción en la región visible ( $\approx 700\text{nm}$ ) <sup>(25)</sup>.

La longitud de onda seleccionada para la cuantificación de los iones ortofosfato por espectrofotometría Ultravioleta-Visible fue la de 800nm, por ser la longitud de onda de máxima absorción, como se aprecia en la figura No. 6.



**FIGURA No.6:** Barrido de longitudes de onda (nm) vs absorbancias de soluciones patrón de ortofosfato de concentraciones 0,0099, 0,0298, 0,0497 y 0,0995 mg de  $\text{P-PO}_4^{3-}/\text{L}$ .



## 5.2 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN

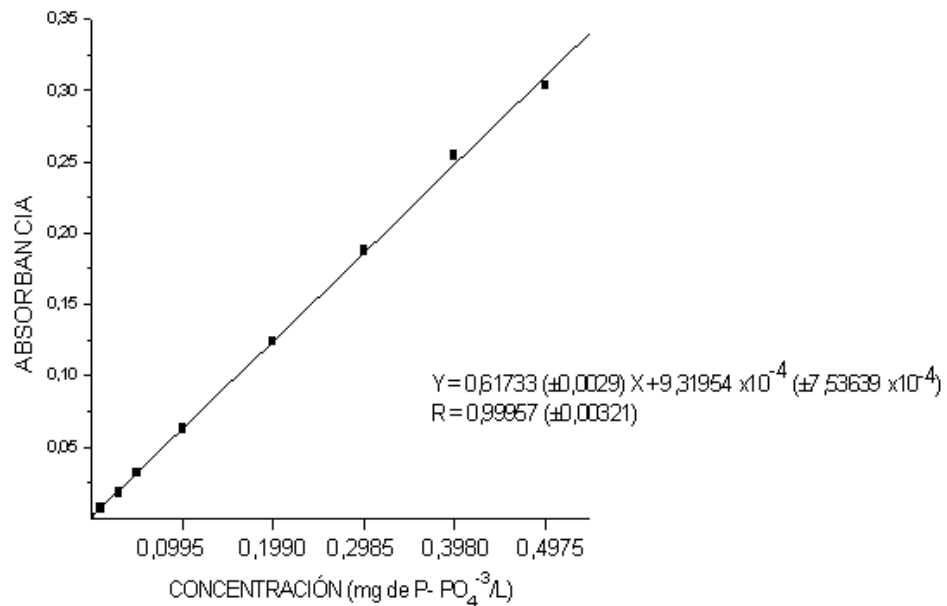
Las absorbancias, desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación obtenidas en las curvas de calibración realizadas para cada una de las soluciones patrón de ortofosfato en el rango de concentración de 0,0099 a 0,4975 mg de  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$  a los diferentes tiempos (10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 min) se detallan en las tablas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y en las figuras No. 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

El criterio del coeficiente de variación con el que se van a analizar los resultados obtenidos en este proyecto es el 5%.

**Tabla 3.** Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de P-  $\text{PO}_4^{3-}$ /L (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de P- $\text{PO}_4^{3-}$ /L),  
Tiempo: 10 min.

ESTÁNDAR (mg de P- $\text{PO}_4^{3-}$ /L)	Absorbancia Promedio ( $\bar{A}$ )	Desviación Estándar (s)	Coficiente de variación (%)
0,0099	0,007	$1,20 \times 10^{-4}$	1,6
0,0298	0,018	$0,30 \times 10^{-4}$	0,17
0,0497	0,032	$1,00 \times 10^{-4}$	0,31
0,0995	0,063	$0,30 \times 10^{-4}$	0,04
0,1990	0,12	$1,90 \times 10^{-4}$	0,15
0,2985	0,19	$2,00 \times 10^{-4}$	0,10
0,3980	0,25	$2,40 \times 10^{-4}$	0,10
0,4975	0,30	$1,90 \times 10^{-4}$	0,06

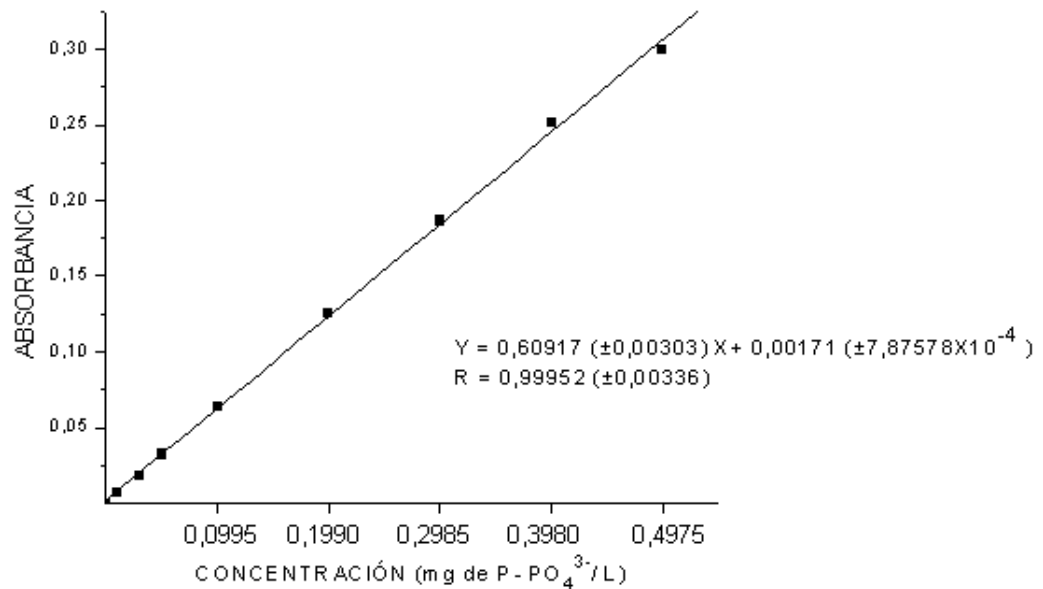
**Figura No.7.** Curva de calibración de Ortofosfatos (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de  $\text{PO}_4^{3-}$ /L),  
Tiempo: 10 min.



**Tabla 4.** Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de P- PO<sup>3-4</sup>/L (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de P-PO<sup>3-4</sup>/L),  
Tiempo: 15 min.

ESTÁNDAR (mg de P- PO <sup>3-4</sup> /L)	Absorbancia Promedio ( $\bar{A}$ )	Desviación Estándar (s)	Coficiente de variación (%)
0,0099	0,007	$2,42 \times 10^{-4}$	3,68
0,0298	0,018	$1,19 \times 10^{-4}$	0,67
0,0497	0,032	$1,49 \times 10^{-4}$	0,47
0,0995	0,064	$1,09 \times 10^{-4}$	0,17
0,1990	0,125	$2,81 \times 10^{-4}$	0,22
0,2985	0,187	$3,14 \times 10^{-4}$	0,17
0,3980	0,251	$5,57 \times 10^{-5}$	0,02
0,4975	0,299	$3,56 \times 10^{-5}$	0,01

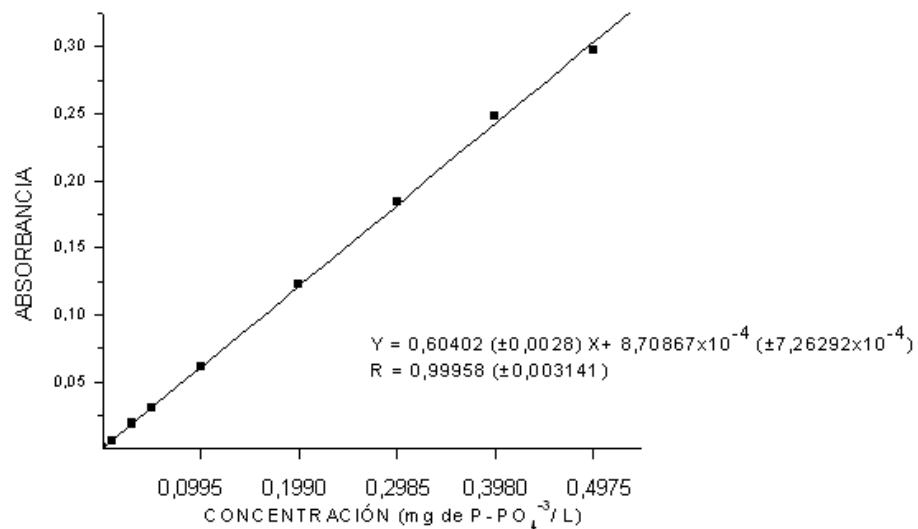
**Figura No. 8.** Curva de calibración de Ortofosfatos (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de PO<sup>3-4</sup>/L),  
Tiempo: 15 min.



**Tabla 5.** Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de P- PO<sup>3-4</sup>/L (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de P-PO<sup>3-4</sup>/L),  
Tiempo: 20 min.

ESTÁNDAR (mg de P- PO <sup>3-4</sup> /L)	Absorbancia Promedio ( $\bar{A}$ )	Desviación Estándar (s)	Coeficiente de variación (%)
0,0099	0,006	$9,91 \times 10^{-5}$	1,68
0,0298	0,018	$4,31 \times 10^{-4}$	2,35
0,0497	0,030	$1,47 \times 10^{-4}$	0,49
0,0995	0,061	$1,99 \times 10^{-4}$	0,33
0,1990	0,123	$2,80 \times 10^{-4}$	0,23
0,2985	0,185	$1,48 \times 10^{-4}$	0,08
0,3980	0,248	$1,55 \times 10^{-4}$	0,06
0,4975	0,296	$1,05 \times 10^{-4}$	0,04

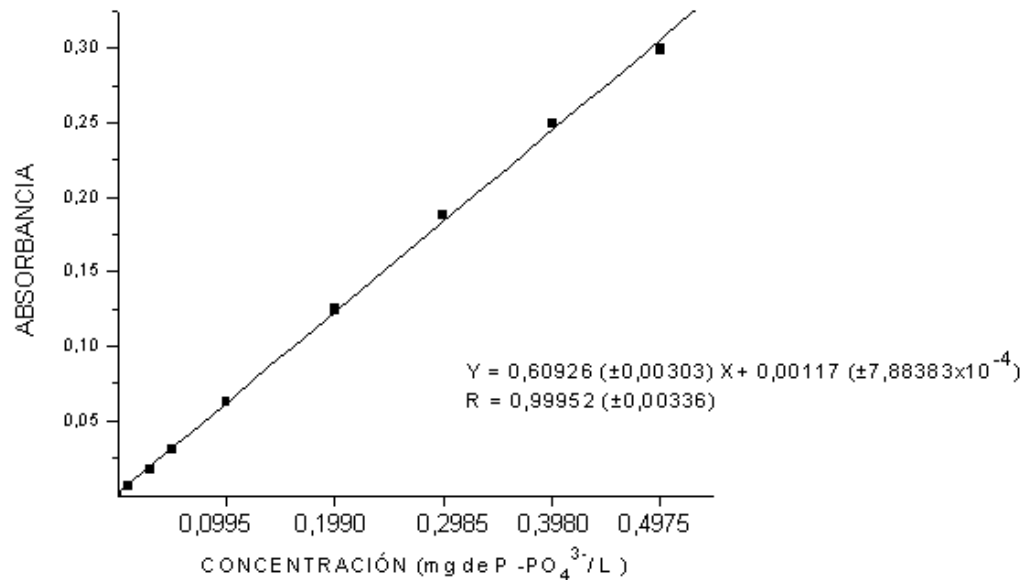
**Figura No. 9.** Curva de calibración de Ortofosfatos (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de PO<sup>3-4</sup>/L),  
Tiempo: 20 min.



**Tabla 6.** Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de P- PO<sup>3-</sup><sub>4</sub>/L (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de P-PO<sup>3-</sup><sub>4</sub>/L),  
Tiempo: 25 min.

ESTÁNDAR (mg de P- PO <sup>3-</sup> <sub>4</sub> /L)	Absorbancia Promedio ( $\bar{A}$ )	Desviación Estándar (s)	Coefficiente de variación (%)
0,0099	0,006	$2,23 \times 10^{-4}$	3,70
0,0298	0,018	$0,89 \times 10^{-4}$	0,50
0,0497	0,031	$1,08 \times 10^{-4}$	0,35
0,0995	0,062	$0,95 \times 10^{-4}$	0,15
0,1990	0,125	$2,11 \times 10^{-4}$	0,17
0,2985	0,188	$0,91 \times 10^{-4}$	0,05
0,3980	0,249	$1,25 \times 10^{-4}$	0,05
0,4975	0,299	$1,90 \times 10^{-4}$	0,06

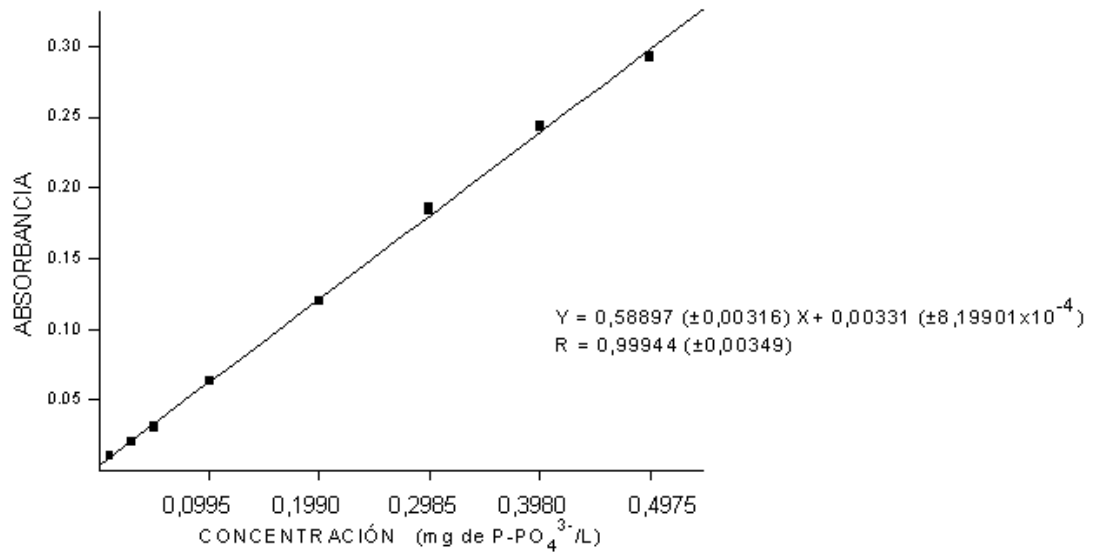
**Figura No. 10.** Curva de calibración de ortofosfatos (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de PO<sup>3-</sup><sub>4</sub>/L),  
Tiempo: 25 min.



**Tabla 7.** Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de P- PO<sup>3-4</sup>/L (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de P-PO<sup>3-4</sup>/L),  
Tiempo: 30 min.

ESTÁNDAR (mg de P- PO <sup>3-4</sup> /L)	Absorbancia Promedio ( $\bar{A}$ )	Desviación Estándar (s)	Coficiente de variación (%)
0,0099	0,010	$7,05 \times 10^{-5}$	0,70
0,0298	0,020	$6,20 \times 10^{-5}$	0,31
0,0497	0,031	$1,13 \times 10^{-4}$	0,37
0,0995	0,064	$2,96 \times 10^{-4}$	0,47
0,1990	0,118	$3,49 \times 10^{-3}$	2,96
0,2985	0,185	$7,23 \times 10^{-4}$	0,39
0,3980	0,243	$4,92 \times 10^{-4}$	0,20
0,4975	0,293	$2,89 \times 10^{-4}$	0,10

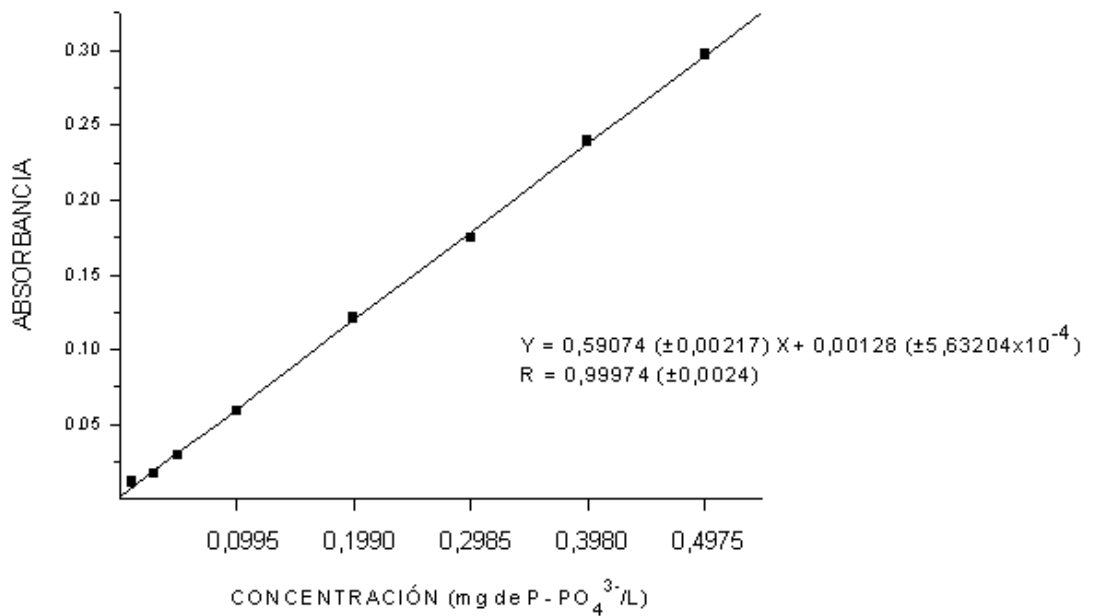
**Figura No.11.** Curva de calibración de Ortofosfatos (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de PO<sup>3-4</sup>/L),  
Tiempo: 30 min.



**Tabla 8.** Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de P- PO<sup>3-4</sup>/L (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de P-PO<sup>3-4</sup>/L),  
Tiempo: 35 min.

ESTÁNDAR (mg de P- PO <sup>3-4</sup> /L)	Absorbancia Promedio ( $\bar{A}$ )	Desviación Estándar (s)	Coefficiente de variación (%)
0,0099	0,012	$1,46 \times 10^{-4}$	1,27
0,0298	0,017	$2,72 \times 10^{-4}$	1,62
0,0497	0,030	$0,62 \times 10^{-4}$	0,21
0,0995	0,059	$0,75 \times 10^{-4}$	0,13
0,1990	0,121	$1,22 \times 10^{-4}$	0,10
0,2985	0,175	$0,78 \times 10^{-4}$	0,05
0,3980	0,239	$3,28 \times 10^{-4}$	0,14
0,4975	0,297	$3,29 \times 10^{-4}$	0,11

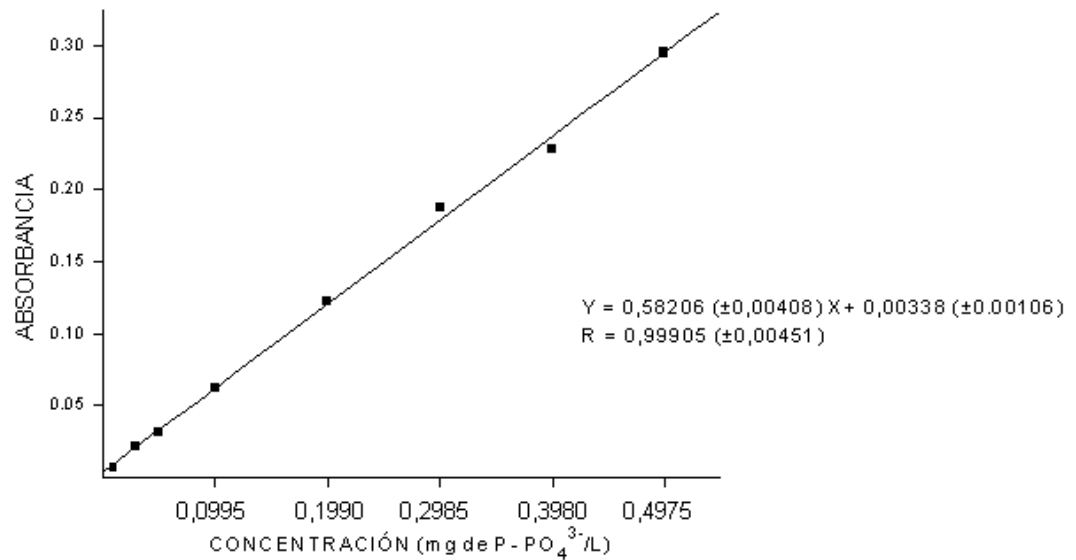
**Figura No. 12.** Curva de calibración de ortofosfatos (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de PO<sup>3-4</sup>/L),  
Tiempo: 35 min.



**Tabla 9.** Absorbancia promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los estándares de P-  $\text{PO}_4^{3-}$ /L (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de P- $\text{PO}_4^{3-}$ /L),  
Tiempo: 40 min.

ESTÁNDAR (mg de P- $\text{PO}_4^{3-}$ /L)	Absorbancia Promedio ( $\bar{A}$ )	Desviación Estándar (s)	Coficiente de variación (%)
0,0099	0,007	$1,43 \times 10^{-4}$	1,98
0,0298	0,021	$1,46 \times 10^{-4}$	0,68
0,0497	0,031	$2,66 \times 10^{-4}$	0,84
0,0995	0,062	$2,76 \times 10^{-4}$	0,44
0,1990	0,122	$1,03 \times 10^{-4}$	0,08
0,2985	0,185	$5,75 \times 10^{-3}$	3,10
0,3980	0,228	$2,46 \times 10^{-4}$	0,11
0,4975	0,295	$4,26 \times 10^{-4}$	0,14

**Figura No.13.** Curva de calibración de Ortofosfatos (rango de 0,0099 a 0,4975 mg de  $\text{PO}_4^{3-}$ /L),  
Tiempo: 40 min





Según los resultados mostrados anteriormente, se seleccionó el tiempo de reacción de 20 minutos, debido a que es un tiempo intermedio en el intervalo analizado, presenta una desviación estándar menor que  $5,00 \times 10^{-4}$  para cada uno de los estándares de la curva de calibración al igual que un coeficiente de variación, por debajo del 2,5 %. La linealidad de igual manera es muy buena y corresponde a 0,99958 con un valor cercano a 1.

Los resultados obtenidos a 10, 15 y 25 minutos, presentaron pocas fluctuaciones en las absorbancias del rango de concentraciones comprendido entre 0,0099 y 0,0497 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ; además de mayores valores de pendientes de calibrado, indicando de esta manera que pueden ser también rangos útiles para la cuantificación de iones ortofosfatos.

Los tiempos de reacción a 30, 35 y 40 minutos mostraron las fluctuaciones más notorias en los estándares de más baja concentración como son 0,0099 y 0,0298 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$  y disminución en la pendientes de calibrado; disminuyendo de ésta manera la sensibilidad, lo que permite concluir que definitivamente estos tiempos no podrían ser seleccionados como tiempos adecuados

Sin embargo todos los tiempos de reacción presentaron buena linealidad entre 0,99905 - 0,99974, poca desviación estándar con valores de  $3,56 \times 10^{-5}$  a  $5,73 \times 10^{-3}$  y bajos coeficiente de variación que oscilan entre 0,012 % - 3,7%.

### **5.3 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ORTOFOSFATOS**

**5.3.1 Intervalo lineal:** De acuerdo a las curvas graficadas de las concentraciones y sus respectivas absorbancias en el intervalo de concentraciones 0,0099, 0,0298, 0,0497, 0,0995, 0,1990, 0,2985, 0,3980 y 0,4975 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ , con un tiempo de reacción de 20 minutos; se escogió éste intervalo, como se observa en la tabla 5 y la figura No. 9, y en este rango de concentración, su coeficiente de correlación fue 0,99878 (valor próximo a 1), comprobando la respuesta lineal del equipo en el rango de concentraciones de ortofosfatos trabajados.

**5.3.2 Sensibilidad analítica:** Para obtener la sensibilidad del método analítico utilizado en la determinación de los iones ortofosfatos, se calcularon los límites de detección y de cuantificación. En la tabla 10 se muestran los datos de absorbancia registrados para el blanco (el cual se leyó 10 veces en diferentes días) y los patrones de ortofosfatos (P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ) con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación.

**Tabla 10.** Absorbancias del blanco y las soluciones patrón de ortofosfatos y sus desviaciones estándar y coeficientes de variación respectivos

	Absorbancia Promedio (Å)	Desviación Estándar (s)	Coefficiente de Variación (%)
Blanco	$5,789 \times 10^{-4}$	$9,215 \times 10^{-5}$	15,92%
0,0099 mg de $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$	$5,894 \times 10^{-3}$	$9,915 \times 10^{-5}$	1,68%
0,0298 mg de $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$	$1,837 \times 10^{-2}$	$4,315 \times 10^{-4}$	2,34%
0,0497 mg de $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$	$3,009 \times 10^{-2}$	$1,472 \times 10^{-4}$	0,49%

Como se observa, las desviaciones estándar encontradas para el blanco y los patrones fueron bajas, con unos porcentajes de coeficiente de variación de 15,92% para el blanco, teniendo en cuenta que se leyó 10 veces en diferentes días y menores a 2.34% para los patrones de ortofosfatos.

Se calculó el cociente de la absorbancia promedio de cada patrón entre la absorbancia promedio del blanco, obteniendo de esta manera la relación señal/ruido para cada patrón y se hizo corresponder a tres veces para el límite de detección y a 10 veces para el límite de cuantificación.

En la tabla 11 se muestran los límites de detección y de cuantificación del método obtenidos, con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación.

**Tabla 11.** Límites de detección y cuantificación

Límite de detección	Desviación estándar (s)	CV (%)	Límite de cuantificación	Desviación estándar (s)	CV (%)
$2,890 \times 10^{-3}$	$5,481 \times 10^{-5}$	1,90%	$9,508 \times 10^{-3}$	$1,615 \times 10^{-4}$	1,89%

El límite de de detección obtenido fue de  $2,890 \times 10^{-3}$  mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ , calculado como la relación señal/ruido en un factor de 3. Ésta es la menor concentración de iones ortofosfatos que se puede detectar, mas no cuantificar en una muestra de agua superficial en las condiciones estipuladas.

El límite de cuantificación obtenido fue  $9,508 \times 10^{-3}$  mg de P- $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ , el cual se calculó teniendo en cuenta la relación señal/ruido en un factor de 10. Esta concentración es la menor concentración de iones ortofosfatos que se puede cuantificar y que se encuentra como límite inferior del intervalo lineal de trabajo.

Analizando los resultados obtenidos para el límite de detección y cuantificación, se observó que la mínima concentración detectable fue baja, indicando así una buena sensibilidad al detectar y cuantificar iones ortofosfatos en el rango establecido para aguas superficiales.

**5.3.2.1 Sensibilidad de calibrado:** Corresponde a la pendiente de la curva de calibración.

$$m = 0,60402 (\pm 0,00284)$$

Observando que la desviación estándar asociada a la pendiente es muy pequeña. La pendiente obtenida para un tiempo de reacción de 20 minutos fue una de las mayores pendientes en el intervalo de tiempo analizado concluyendo que a este tiempo de reacción el método presentó mayor sensibilidad.

**5.3.4 Precisión:** En la evaluación a tres niveles, se obtuvieron los siguientes resultados:

**5.3.4.1 Repetibilidad:** La repetibilidad, se examinó mediante las lecturas repetidas de la absorbancia de un patrón de concentración 0,3980 mg de P- PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L, el cual se analizó el mismo día; con los valores de absorbancias encontrados se halló su respectiva concentración y se analizó su normalidad usando el método de Shapiro Wilk (anexo 1,1)

Los valores obtenidos para la significancia en la prueba de Shapiro – Wilk son superiores a 0,05, por lo que H<sub>0</sub> se acepta y se concluye que los datos provienen de una población con distribución normal; además como se observa en la tabla 12, la desviación estándar y el coeficiente de variación son muy bajos, lo que indica que el método presenta repetibilidad.

**Tabla 12.** Repetibilidad del método

ESTANDAR	CONCENTRACIÓN						[] promedio	[] promedio	%CV	Desviación estándar
	[] <sub>1</sub>	[] <sub>2</sub>	[] <sub>3</sub>	[] <sub>4</sub>	[] <sub>5</sub>	[] <sub>6</sub>				
0,3980 (mg de P- PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> / L)	0,421	0,422	0,421	0,421	0,421	0,420	0,421	0,421	0,158	6,69E-1

**5.3.4.2 Precisión intermedia:** Se examinó la normalidad de los datos obtenidos para los estándares 0,0099, 0,0298, 0,0497 mg de P -PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/ L y para una muestra de río Molino (M<sub>6</sub>) a través de la prueba de normalidad de Shapiro Wilk (anexo 1,2), encontrando que dichos valores provienen de una población con distribución normal.

Los datos para calcular la precisión intermedia se describen en la tabla 13, donde se observa que los coeficientes de variación son menores al 6% para los tres estándares y 0,68% para la muestra de río M<sub>6</sub> analizada durante los diez días, concluyendo así que el método posee una buena precisión espectrofotométrica ó intermedia.

**Tabla 13.** Valores de concentraciones de los tres patrones de ortofosfatos y la muestra M<sub>6</sub> obtenidos durante los diez días, con sus respectivos coeficientes de variación para calcular la precisión intermedia

Día	0,0099 (mg de P- PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)	CV (%)	0,0298 (mg de P- PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)	CV (%)	0,0497 (mg de P- PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)	CV (%)	M <sub>6</sub> (mg de P- PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)	CV (%)
1	0,0111	1,513	0,0305	3,53E-1	0,0494	4,96E- 01	0,185	1,83E-01
2	0,0130	1,908	0,0309	4,22E-01	0,0529	9,00E-01	0,182	1,82E-01
3	0,0132	1,665	0,0313	1,29+00	0,0498	1,54E+00	0,191	1,82E-01
4	0,0123	1,097	0,0328	1,88E+00	0,0504	6,75E-01	0,191	2,01E-01
5	0,0131	3,431	0,0304	2,23E+01	0,0528	8,39E-01	0,187	4,18E-01
6	0,0124	2,267	0,0319	6,63E+00	0,0537	6,66E-01	0,182	6,87E-01
7	0,0112	5,042	0,0320	2,18E+00	0,0512	1,08E+00	0,193	4,86E-01
8	0,0132	1,953	0,0321	2,23E+01	0,0547	1,21E+00	0,181	4,90E-01
9	0,0121	2,695	0,0304	9,07E-01	0,0540	2,41E-01	0,191	4,05E-01
10	0,0116	2,764	0,0329	5,87E-01	0,0563	4,11E-01	0,192	4,56E-01
Todos los días		2,433		6,93E+00		0,840E+00		3,69E-01

**5.3.4.3 Reproducibilidad:** Se examinó la reproducibilidad de los datos obtenidos para los estándares 0,0995 y 0,2985 mg de P -PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L a través de la prueba de normalidad de Shapiro Wilk (anexo 1,3), encontrando que dichos valores provienen de una población con distribución normal.

Los datos para calcular la reproducibilidad se describen en la tabla 14, donde se observa que los coeficientes de variación son menores al 4% para los dos estándares analizada durante las ocho semanas, concluyendo así que el método posee una buena reproducibilidad.

**Tabla 14.** Valores de concentraciones de los dos patrones de ortofosfatos obtenidos durante las ocho semanas, con sus respectivos coeficientes de variación

	Concentración (mg de P- PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)							
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8
0,0995 mg de P- PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	0,1036	0,0996	0,1139	0,1062	0,1051	0,1128	0,1180	0,0995
CV (%)	0,587	0,374	1,198	3,056	0,305	0,358	1,313	0,216
0,2985 mg de P- PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	0,3117	0,3131	0,2972	0,3076	0,3191	0,2985	0,3046	0,3106
CV (%)	2,0971	1,7095	0,4926	0,3941	0,2565	0,4215	1,1007	0,5113

**5.3.5 Precisión del método:** Se examinó la normalidad de los datos obtenidos para la muestra de río Molino (M<sub>6</sub>) a través de la prueba de normalidad de Shapiro Wilk (anexo 1,2), encontrando que dichos valores provienen de una población con distribución normal.

Los datos para calcular la precisión del método se describe en la tabla 15, donde se observa que los coeficientes de variación son menores al 0,68% para la muestra de río M<sub>6</sub> analizada durante los cinco días y por duplicado, concluyendo así que el método posee una buena precisión.

**Tabla 15.** Precisión del método

M <sub>6</sub>	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
<b>CONCENTRACIÓN</b> (mg de PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> / L)	0,1910	0,1906	0,1929	0,1905	0,1916
<b>CV</b> <b>(%)</b>	1,820E-01	2,012E-01	4,864E-01	4,050E-01	4,558E-01

**5.3.6 Exactitud:** La tabla 16 da a conocer el grado de concordancia entre el valor reportado por el IDEAM y el valor arrojado en el laboratorio ambiental de la CRC, para el estándar de concentración alta 028-2 (lote 011847).

**Tabla 16.** Exactitud del método.

LABORATORIO	Concentración (mg de PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)	CV (%)
IDEAM	0,82	
AMBIENTAL CRC	0,84	2,48%

El coeficiente de variación menor del 2,50% da a conocer que la exactitud del método es buena.

**5.3.7 Exactitud del método de extracción:** Se analizó la exactitud de este método de extracción, adicionando un 30%, 50% y 70% de concentración de iones ortofosfatos (a través de una solución estándar de fosfato diácido de potasio, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L) a una muestra del río Blanco (M<sub>1</sub>), la cual contenía una cantidad de iones ortofosfatos, correspondiente a una baja concentración del rango lineal de la curva de calibración. Se analizó espectrofotométricamente la muestra sin adición, las alícuotas de adición y la muestra con adición. Los resultados se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17.** Porcentajes de recuperación de la muestra del río Blanco

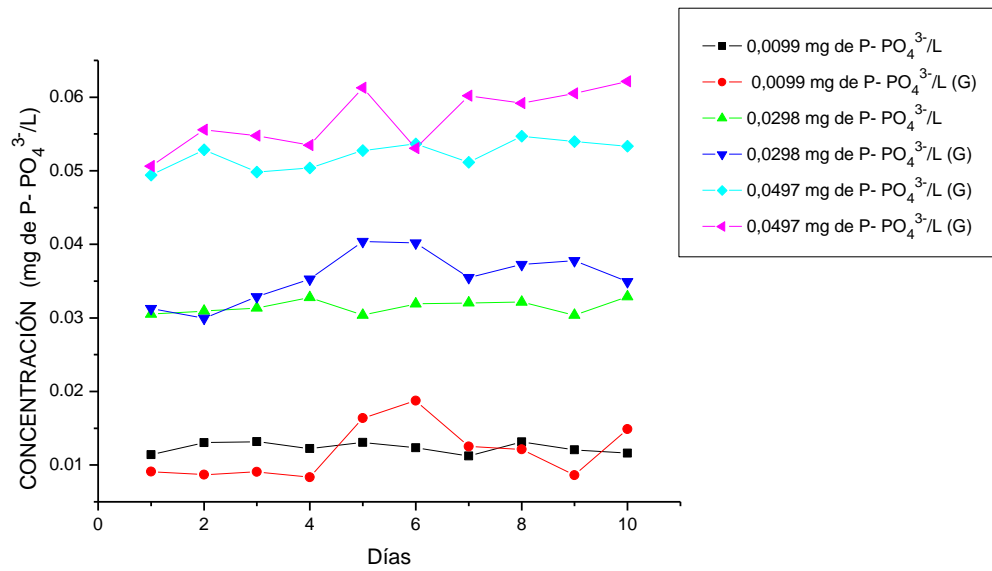
Muestra	Promedio [mg de P- PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> / L]	% Recuperación
M <sub>1</sub>	6,9267X10 <sup>-2</sup>	
M <sub>1</sub> +30%	9,2179x10 <sup>-2</sup>	95,67%
Adición 30%	2,3949x10 <sup>-2</sup>	
M <sub>1</sub> +50%	1,0000x10 <sup>-1</sup>	97,79%
Adición 50%	3,1428x10 <sup>-2</sup>	
M <sub>1</sub> +70%	1,1824x10 <sup>-1</sup>	100,07%
Adición 70%	4,8939x10 <sup>-2</sup>	
%Recuperación promedio		97,83%

La exactitud del método de extracción se midió como la concordancia entre el valor medido y el valor aceptado como referencia (curva de calibración); para una exactitud adecuada, el porcentaje de recuperación se debe aproximar al 100%; según la tabla 17, los porcentajes de recuperación del método en sus tres adiciones, fueron altos, mayores al 95%, lo que permite concluir que el método de extracción empleado presenta una buena exactitud.

## 5.4 ESTABILIDAD DE LOS IONES ORTOFOSFATOS

**5.4.1 Estabilidad de los estándares:** En la figura No.14, se dan a conocer las diferencias de los dos tratamientos como se indicó anteriormente en 4.7.1, donde

se aprecian las diferencias marcadas en los resultados obtenidos de los dos tratamientos correspondientes a las soluciones preparadas y las guardadas diariamente de los estándares 0,0099, 0,0298 y 0,0497 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ .



**Figura No.14.** Estabilidad de los estándares 0,0099, 0,0298 y 0,0497 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$  preparados diariamente correspondientes al tratamiento 1 y guardados (G), correspondientes al tratamiento 2, durante diez días.

Los resultados estadísticos para las pruebas de ANOVA (las cuales fueron realizadas después de confirmar la normalidad y homogeneidad de varianza de los datos, para los dos tratamientos, como se muestra en los anexos 1.4, 1.5, 1.6 y 1.7), dan a conocer que para cada uno de los tres estándares analizados por el tratamiento 1, no existen diferencias significativas entre los diez días analizados, exhibiendo valores de  $p > 0,05$  ( $p = 0,940, 0,982$  y  $0,079$ , respectivamente), mientras que los resultados estadísticos para la prueba de ANOVA, arrojaron como resultado que para cada uno de los tres estándares analizados por el tratamiento 2, si existen diferencias significativas los diez días analizados con valores de  $p < 0,05$  ( $P = 0,016, 0,00$  y  $0,015$ , respectivamente) como se observa en los anexos 1.8, 1.9 y 1.10, respectivamente.

Las diferencias significativas que se existen para el tratamiento 2 pueden ser debidas a que: 1. Al no preservar los estándares hubo descomposición de los nutrientes por los microorganismos presentes en las soluciones estándar (se desarrolló el proceso microbiológico), además los estándares se refrigeraron a  $4^{\circ}\text{C}$  para frenar este mismo proceso, pero la cadena de frío se rompió cada día, al llevarlos a temperatura ambiente para su posterior análisis.

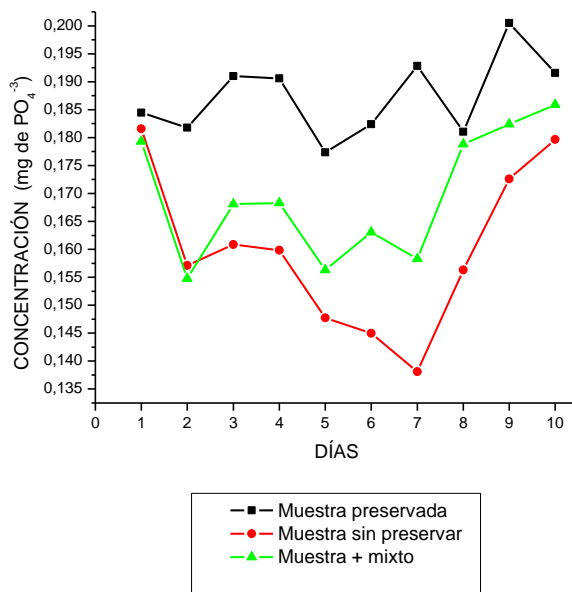
2. El fósforo inorgánico soluble en la forma de  $P-PO_4^{3-}$  pudo reaccionar en sí, para formar polifosfatos ( $P_2O_7^{4-}$ ) ó ( $P_3O_{10}^{5-}$ ) los cuales no reaccionan con el reactivo mixto para formar el complejo coloreado fosfomoliddato y de esta manera no permiten su cuantificación.

Con este ensayo se determinó el tiempo y las condiciones bajo las cuales un estándar de ortofosfatos, puede ser analizado con confiabilidad, encontrándose que es mejor prepararlo diariamente. Las fluctuaciones que tienen los estándares no guardados y que fueron analizados y los que se guardaron durante los diez días; esto se debe a que los estándares analizados se degradan influyendo de ésta manera en las determinaciones.

**5.4.2 Estabilidad de la muestra del río Molino ( $M_6$ ):** Se estudió la estabilidad de la muestra del río Molino ( $M_6$ ), durante diez días, en sus diferentes formas de preservación.

En la figura No.15, se muestran las diferencias marcadas en las tres muestras de río Molino, las cuales fueron analizadas durante los diez días.

**Figura No. 15.** Gráfica de superposición de las muestras del río molino, en sus diferentes formas de preservación.



Según los resultados arrojados por el análisis estadístico ANOVA (los cuales fueron realizados después de confirmar la normalidad y homogeneidad de varianza de los datos, para las formas de preservar, como se muestra en el anexo 1,11 y 1.12) como se muestra en los anexos 1,13, 1,14 y 1,15 se da a conocer que la preservación es un parámetro importante para la determinación de ortofosfatos, ya



que no hay evidencia de diferencias significativas entre los diez días analizados en la muestras de río preservada  $p > 0,05$  ( $p = 0,246$ ), a diferencia de la muestra que no se preservaron y a la que se le adicionó el reactivo mixto, presentando valores de  $p < 0,05$  ( $p = 0,00$ ) para ambos casos.

## 5.5 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE ORTOFOSFATOS EN AGUAS SUPERFICIALES

La estandarización del método del ácido ascórbico para la determinación de ortofosfatos, se llevó a cabo siguiendo el protocolo de estandarización de métodos analíticos del IDEAM, el cual consistió en la lectura de los diferentes estándares de fosfato diácido de potasio, las muestras del río Blanco, el río Cauca y el estándar certificado del IDEAM

Los resultados de los 7 días de estandarización, se muestran en la tabla 18.

**Tabla 18.** Resultados de la estandarización

Tratamiento	Día						
	1	2	3	4	5	6	7
	mg de P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	mg de P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	mg de P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	mg de P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	mg de P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	mg de P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	mg de P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L
0,0099 mg de P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	1,16E-02	1,47E-02	1,23E-02	1,18E-02	1,14E-02	1,32E-02	1,16E-02
0,0099 mg de P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	1,29E-02	1,14E-02	1,25E-02	1,07E-02	1,49E-02	1,10E-02	1,16E-02
0,2985 mg de P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	3,14E-01	3,33E-01	3,21E-01	3,16E-01	3,07E-01	3,14E-01	2,97E-01
0,2985 mg de P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	3,20E-01	3,38E-01	3,25E-01	3,16E-01	3,11E-01	3,20E-01	3,09E-01
0,3980 mg de P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	4,20E-01	4,09E-01	3,90E-01	4,16E-01	4,09E-01	4,31E-01	3,87E-01
0,3980 mg de P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	4,23E-01	4,12E-01	4,18E-01	4,20E-01	4,19E-01	4,45E-01	4,03E-01
M1 río Blanco	6,99E-02	6,53E-02	6,97E-02	6,55E-02	6,35E-02	6,49E-02	6,7E-02
M1 río Blanco	6,93E-02	7,01E-02	6,27E-02	6,33E-02	6,35E-02	6,45E-02	6,91E-02
M1 río Blanco	6,86E-02	6,70E-02	6,67E-02	6,69E-02	6,69E-02	6,49E-02	6,08E-02
M1+ 30%	9,26E-02	8,65E-02	9,52E-02	8,82E-02	8,59E-02	8,80E-02	8,80E-02
M1+ 30%	9,20E-02	8,99E-02	8,29E-02	8,60E-02	8,77E-02	8,91E-02	9,38E-02
M1+ 30%	9,20E-02	8,79E-02	8,74E-02	9,35E-02	8,79E-02	8,84E-02	8,53E-02
M1+ 50%	9,98E-02	9,62E-02	1,01E-01	9,67E-02	9,66E-02	9,94E-02	1,00E-01
M1+ 50%	1,00E-01	1,00E-01	9,32E-02	9,46E-02	9,69E-02	9,70E-02	1,01E-02
M1+ 50%	1,00E-01	9,83E-02	9,99E-02	9,81E-02	9,86E-02	9,97E-02	9,44E-02
M1+ 70%	1,18E-01	1,09E-01	1,13E-01	1,08E-01	1,07E-01	1,12E-01	1,15E-01
M1+ 70%	1,18E-01	1,13E-01	1,07E-01	1,11E-01	1,12E-01	1,10E-01	1,17E-01
M1+ 70%	1,18E-01	1,10E-01	1,11E-01	1,13E-01	1,10E-01	1,15E-01	1,09E-01
M <sub>2</sub> río Cauca	0,171	0,146	0,163	0,163	0,163	0,165	0,151
M <sub>2</sub> río Cauca	0,171	0,150	0,179	0,173	0,166	0,166	0,164

IDEAM		0,824		0,830	0,821		0,814
IDEAM		0,825		0,828	0,822		0,815

A los datos de la tabla 18, se le realizaron las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, observando que no hay diferencias significativas entre días para la concentración de los diferentes estándares o muestras analizadas durante el proceso de estandarización, como se observa en el anexo 1,16. De igual manera, se realizó la prueba de homogeneidad de varianza como se muestra en el anexo 1,17, dando como resultado que las muestras no poseen homogeneidad de varianza.

Con los resultados obtenidos de las pruebas de normalidad y de homogeneidad de varianza, se analizaron los resultados mediante la aplicación de la prueba paramétrica, post-hoc de Games- Howell, la cual es un método similar al de Tukey y que se aplica asumiendo o no varianzas iguales.

Como se aprecia en el anexo 1,18, el análisis de varianza entre días para las concentraciones de los diferentes estándares y muestras analizados, no presentó evidencia de diferencias significativas con un valor de  $p > 0,05$  ( $p = 0,785$ ), dando a conocer que este método estandarizado en el laboratorio ambiental de la CRC se podrá seguir utilizando para comenzar a reportar datos con un adecuado y comprobable grado de confianza.

De igual manera se analizó, si había ó no diferencias significativas entre las concentraciones de cada uno de los estándares y muestras analizados, obteniendo como resultado un valor de  $p > 0,05$  ( $p = 0,00$ ), lo que nos indica la diferencias de concentración para cada uno de estándares estudiados como se observa en el anexo 1.19.

## 5.6 MUESTREO EN AGUAS SUPERFICIALES DEL RÍO MOLINO

Los resultados de ortofosfatos, fósforo hidrolizable y fósforo total obtenidos de las muestras de agua del río Molino, durante los seis meses de muestreo, se analizaron teniendo en cuenta: 1. Las variaciones de las diferentes estaciones de muestreo frente a los muestreos y 2. Las fluctuaciones de una misma estación de muestreo frente a los diferentes muestreos, las cuales se describen a continuación.

### 5.6.1 ORTOFOSFATOS

Las concentraciones de los iones ortofosfatos obtenidas para cada una de las doce estaciones de muestreo corresponden al fósforo inorgánico soluble (P-  $\text{PO}_4^{3-}$ ) en la muestra, el cual fue medido por el procedimiento de análisis colorimétrico directo.

La figura No. 16a muestra la marcada diferencia respecto al intervalo de concentraciones obtenidas para todos los 24 muestreos frente a las estaciones de muestreo, mostrando las estaciones 1, 3, 4, 5 y 6 un rango de concentración muy bajo, a diferencia de las estaciones 7, 8 y 10 las cuales se encuentran en un rango de concentración mucho más elevado.

Como se aprecia en las figuras 16b y 16c, la concentración de los iones ortofosfatos para las estaciones de muestreo 1- 6 presentó un comportamiento similar que no excede a los 0,32 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}$  /L; esta concentración sufre un cambio abrupto desde la estación 7 hasta la estación 10, alcanzando valores superiores a 2,0 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}$  /L.

La figura No.17 muestra los valores de ortofosfatos durante los 6 muestreos (1, 5, 9, 13, 18 y 22) para las cuatro estaciones, donde la estación de muestreo 2, correspondiente a la Quebrada Yambitará, muestra una concentración de iones ortofosfatos que varía desde 0,01 a 0,18 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}$ /L y la estación de muestreo 9 correspondiente al río Ejido, presenta una alta concentración de ortofosfatos desde 0,20 a 2,60 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}$ /L. En las estaciones 11 y 12, correspondientes al río Cauca, la concentración decae rápidamente, debido a que esta fuente hídrica en la estación 11 (antes de la incorporación de los afluentes: ríos Molino y Ejido), posee poca cantidad de fosfatos y a que en la estación 12 se presenta una buena tasa de dilución, teniendo en cuenta que el caudal del cuerpo receptor es mayor que el caudal del afluente, presentando concentraciones menores a 0,2 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}$  /L de iones ortofosfatos.

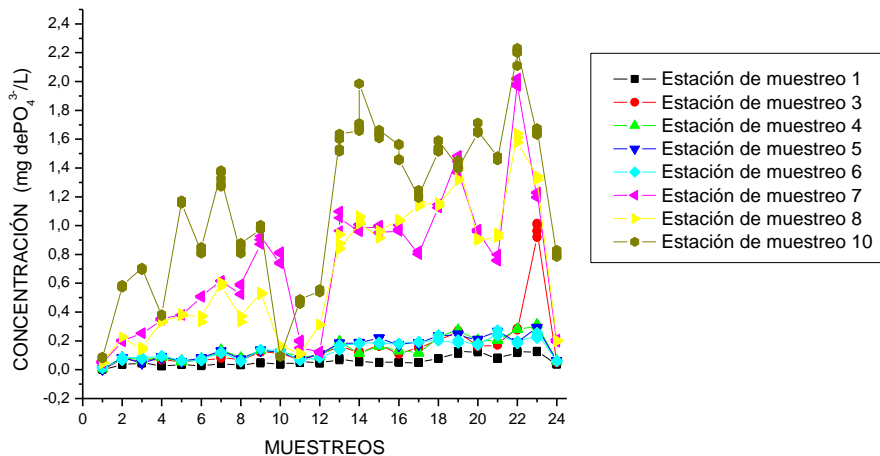
Los resultados obtenidos en las figuras No. 16a, 16b, 16c y 17 se corroboran con el conglomerado jerárquico que se presenta en el anexo 2,4, ya que en el Dendograma de las 12 estaciones vs la concentraciones de ortofosfatos, se observan dos grupos de estaciones: (a una distancia de 20 / distancia euclídea (Anexo 3)), el primero en las estaciones 1 a 6 del río Molino y en las estaciones 11 a 12 del río Cauca, con un bajo rango de concentración de ortofosfatos como se mencionó anteriormente y el segundo grupo correspondiente a las estaciones más contaminadas como son 7 a 10 en el río Molino y Ejido.

Las figuras 16a, 16b, 16c y 17 también muestran las variaciones de la concentración de los iones ortofosfatos para cada estación durante los 24 muestreos. Las fluctuaciones de la concentración en los diferentes muestreos son afectadas de manera directa por el caudal (debidas a las épocas de invierno ó verano) y por ende, debido a la concentración de fosfatos en las aguas del río Molino.

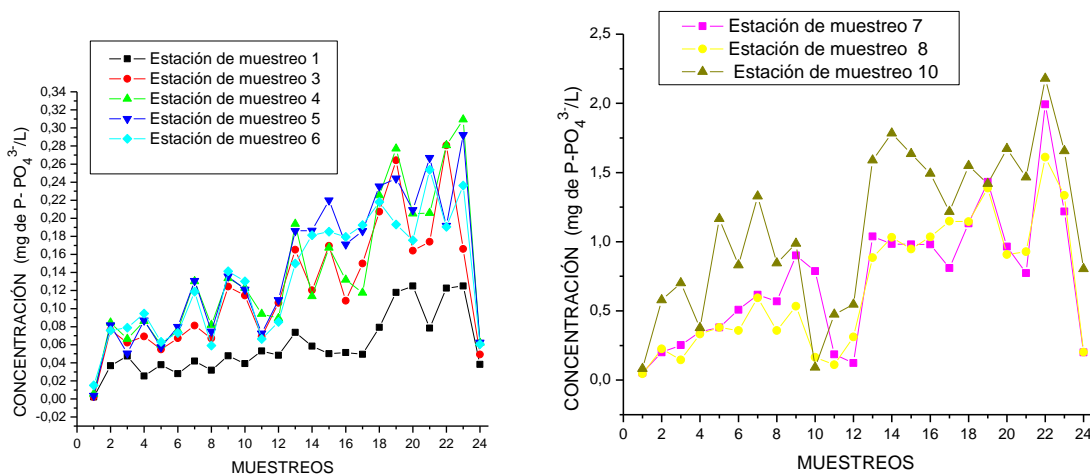
Al interpretar el Dendograma de los iones ortofosfatos (anexo 2,7) a una distancia de 20 (distancia euclídea), se observan dos grandes grupos en los 24 muestreos realizados a dicha fuente hídrica.

En el primer grupo están los muestreos en donde la concentración de los iones ortofosfato fue baja; pertenecen a los meses de invierno (mayo – julio) y corresponden a los muestreos 1, 2, 3 y 4 de mayo, los 5, 6 y 8 de junio y los 10, 11 y 12 de julio. En la época de invierno la precipitación pluvial fue elevada, con excepción de los muestreos 7 y 9 donde aumentó la concentración. El segundo grupo de concentración y la más elevada correspondió a los meses de verano (agosto – octubre) con los muestreos 13, 14, 15 y 16 de agosto, los muestreos 17, 18, 19 y 20 de septiembre y finalmente, los 21, 22 y 23 de octubre en los cuales la precipitación pluvial bajó notoriamente, con la excepción del muestreo 24 en el que la concentración disminuyó notablemente.

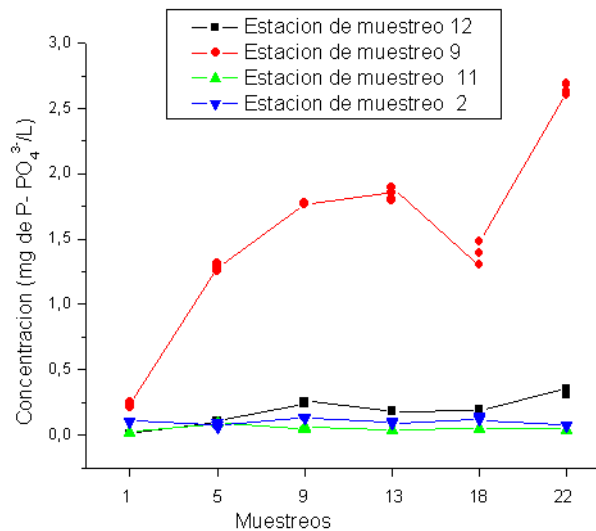
**Figura No. 16a.** Muestréos (1 - 24) vs la concentración de ortofosfatos (mg de  $P-PO_4^{3-}/L$ ) para las diferentes estaciones de muestreo (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10).



**Figura No. 16b y 16c.** Muestréos (1- 24) vs la concentración de ortofosfatos (mg de  $P- PO_4^{3-}/L$ ) para las diferentes estaciones de muestreo (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10).



**Figura No. 17.** Muestreros (1, 5, 9, 13, 18 y 22) vs la concentración de ortofosfatos mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}$ /L para los diferentes estaciones de muestreo (2, 9, 11 y 12).



### 5.6.2 FÓSFORO HIDROLIZABLE

La concentración de fósforo hidrolizable, presenta el mismo comportamiento que los iones ortofosfatos como se aprecia en las figuras 18a, 18b y 18c, con la diferencia de que las concentraciones son un poco más elevadas para este parámetro, debido a que por la digestión (hidrólisis) con ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) realizada previamente a la muestra, para su cuantificación colorimétrica, además del fósforo inorgánico P-  $\text{PO}_4^{3-}$  (ortofosfatos) presentes en la muestra también se hidrolizan los polifosfatos ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ), ( $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ ) y parte de fósforo orgánico presente.

De igual manera que en los ortofosfatos, las estaciones de muestreo 1 a 6 presentan poca variación en las concentraciones con valores menores de 0,40 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}$  /L aproximadamente, mientras que en las estaciones 7 a 10 se incrementa bruscamente la concentración, alcanzando valores de hasta 3,7 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}$  /L.

La figura No. 19 muestra los valores de concentración de fósforo hidrolizable durante los 6 muestreos (1, 5, 9, 13, 18, 22) para las 4 estaciones, donde la estación de muestreo 2 (Quebrada Yambitará), varió entre 0,01 a 0,06 mg de  $P-PO_4^{3-}$  /L, la estación de muestreo 9 (río Ejido) en el rango de concentración más alto, varió desde 1,00 a 4,50 mg de  $P-PO_4^{3-}$ /L y finalmente las estaciones de muestreo 11 y 12 correspondientes al río Cauca, que presentaron concentraciones de 0,01 a 0,02 mg de  $P-PO_4^{3-}$  /L respectivamente, y que como se mencionó anteriormente, por su tasa de dilución en la estación 12 presentó una concentración de fósforo hidrolizable de 0,01 a 0,04 mg de  $P-PO_4^{3-}$  /L.

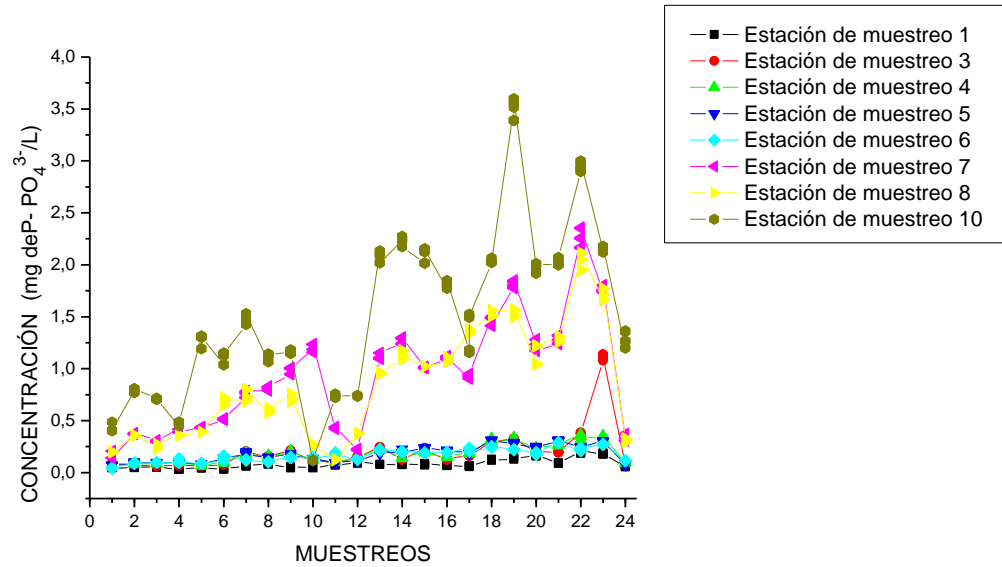
El Dendograma de las 12 estaciones de muestreo vs la concentración de fósforo hidrolizable, se presenta en el anexo 2,5 (a una distancia de 20 / distancia euclídea) y confirma el comportamiento descrito anteriormente y reporta tres grupos correspondientes a: Las estaciones de muestreo menos contaminadas como son 1 y 11, las de contaminación intermedia 2, 3, 4, 5, 6 y 12 y por último el grupo de estaciones de muestreo que contienen más contaminación por fosfatos en esta fuente, las estaciones 7, 8, 9 y 10.

Estas fluctuaciones en las concentraciones de fósforo hidrolizable durante los diferentes muestreos, son afectadas de manera directa por la precipitación pluvial.

El Dendograma (anexo 2,8), de igual forma reporta dos grupos de muestreos a una distancia de 20 (distancia euclídea). El primer grupo de muestreos de baja concentración en cuanto a fósforo hidrolizable, debido a la elevada precipitación pluvial, fueron los muestreos 1, 2, 3 y 4 de mayo, los 5, 6, 7 y 8 de junio, los 9, 10, 11, y 12 de julio, los 14, 16 y 17 de agosto y el muestreo 24 de octubre; el fósforo hidrolizable aumentó el número de muestreos en la época de invierno respecto al comportamiento de los iones ortofosfatos, debido a que como se mencionó anteriormente, el fósforo hidrolizable está constituido de ortofosfatos (inorgánico)  $PO_4^{3-}$ , los polifosfatos ( $P_2O_7^{4-}$ ), ( $P_3O_{10}^{5-}$ ) y parte de fósforo orgánico intuyendo que en estos muestreos (7, 9, 14, 16 y 17) la concentración de los polifosfatos fue menor por cambios atmosféricos o geodinámicos del río.

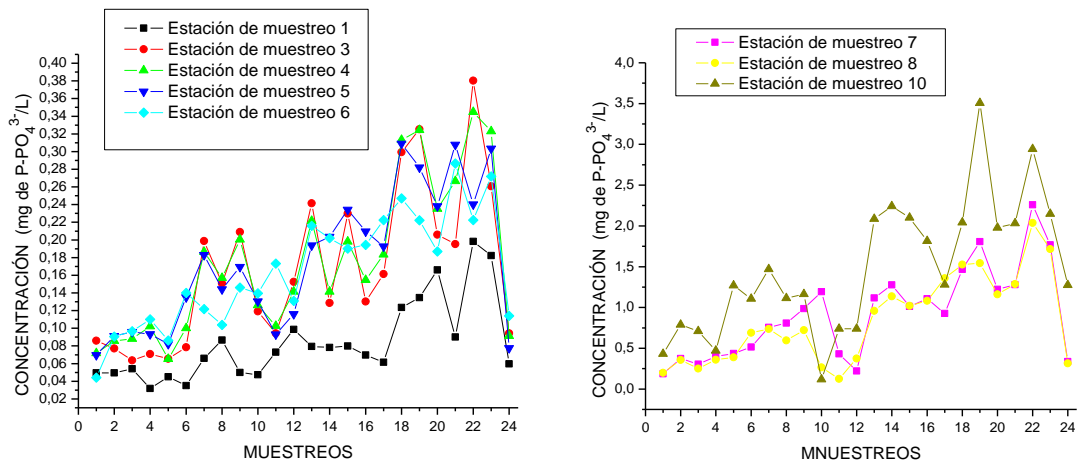
El segundo grupo de muestreos donde la concentración fue elevada y por lo tanto la precipitación pluvial baja, correspondió a los muestreos 13 y 15 de agosto, 18, 19 y 20 de septiembre y los muestreos 21, 22 y 23 de octubre.

**Figura No. 18a.** Muestreros (1 - 24) vs la concentración de fósforo Hidrolizable (mg de  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ) para las diferentes estaciones de muestreo (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10).

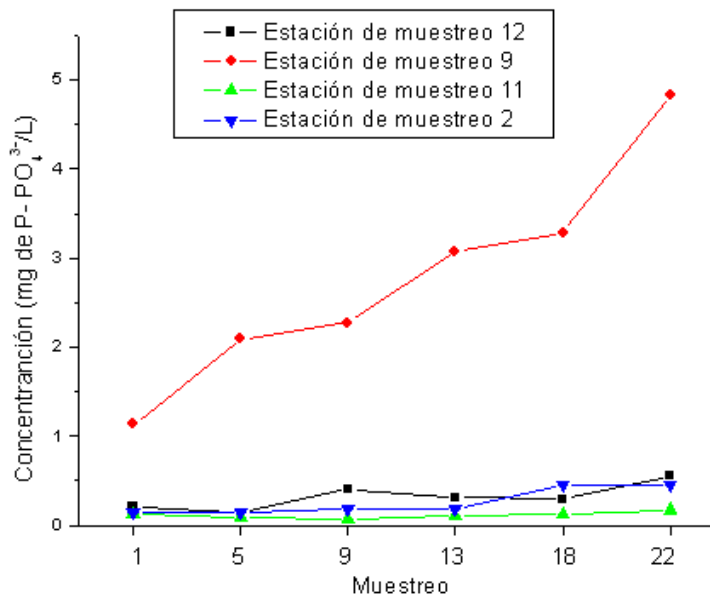


**Figura No. 18b y 18c.** Muestreros (1- 24) vs la concentración de fósforo Hidrolizable (mg de  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ ) para las diferentes estaciones de muestreo (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10).





**Figura No. 19.** Muestrros (1, 5, 9, 13,18 y 22) vs la concentración de fósforo Hidrolizable mg de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L para los diferentes estaciones de muestreo (2, 9, 11 y 12).



### 5.6.3 FÓSFORO TOTAL

El contenido de fósforo total presente en las diferentes estaciones analizadas, sigue la misma tendencia que los iones ortofosfatos y el fósforo hidrolizable, como

se muestra en las figuras No. 20a, 20b y 20c, con la diferencia de que las concentraciones de fósforo total son mayores que para los otros dos parámetros analizados, debido a que corresponden a todo el fósforo presente en las muestras:

- Los polifosfatos ( $P_2O_7^{4-}$ ), ( $P_3O_{10}^{5-}$ ) y parte del fósforo orgánico presentes en las muestras, fueron convertidos hasta la forma de ortofosfatos por la hidrólisis con ácido sulfúrico
- El fósforo orgánico fue convertido hasta ortofosfatos con hidrólisis ácida en presencia de persulfato
- Los ortofosfatos solubles en las muestras

El fósforo total, de igual manera que el fósforo hidrolizable y los ortofosfatos en las estaciones de muestreo 1 a 6 presentan pocas fluctuaciones, mientras que de la estación 7 a 10 la concentración de fósforo total se incrementa notablemente alcanzando concentraciones de hasta 3,8 mg de  $P-PO_4^{3-}/L$ .

La figura No. 21 reporta los valores de fósforo total durante los 6 muestreos (1, 5, 9, 13, 18 y 22) para las estaciones 2, 9, 11 y 12 que al igual que las otras analizadas se comportan de la misma manera. La concentración en la estación de muestreo 2 osciló entre 0,02 y 0,07 mg de  $P-PO_4^{3-}/L$ , la estación de muestreo 9 (la más contaminada – río Ejido) entre 1,00 a 5,02 mg de  $P-PO_4^{3-}/L$  y las estaciones 11 y 12 (río Cauca) presentaron nuevamente concentraciones bajas entre 0,01 - 0,02 mg de  $P-PO_4^{3-}/L$  y 0,02 – 0,05 mg de  $P-PO_4^{3-}/L$ .

Análogamente, el Dendograma de las 12 estaciones de muestreo vs la concentración de fósforo total se presenta en el anexo 2,6, y confirma la existencia nuevamente de tres grupos de estaciones a una distancia de 20 (distancia euclídea), por el grado de contaminación que ellas presentan; entre ellos: las estaciones de muestreo menos contaminadas como son 1 y 11, las de contaminación intermedia 2, 3, 4, 5, 6 y 12 y por último el grupo de estaciones de muestreo que contienen más contaminación por fosfatos en esta fuente, las estaciones 7, 8, 9 y 10.

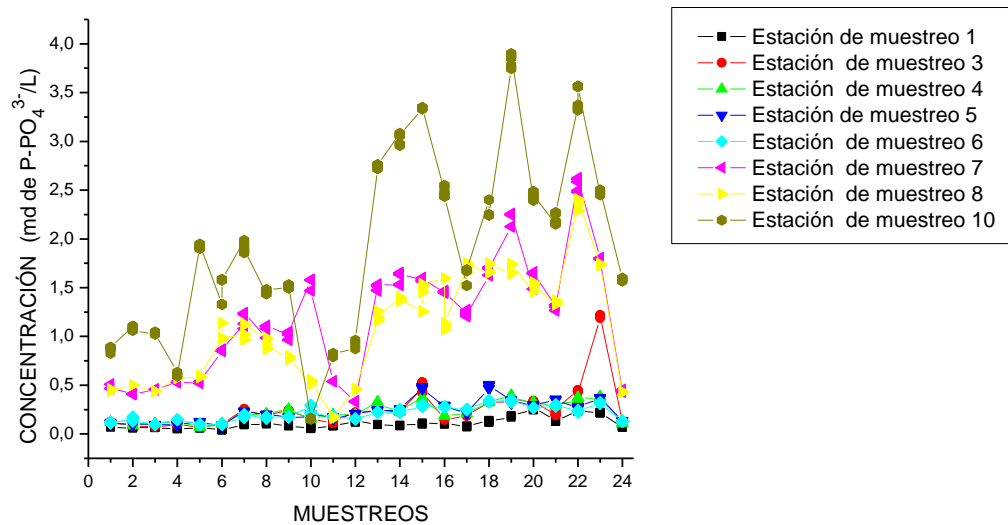
Las fluctuaciones de la concentración en los diferentes muestreos son afectadas de manera directa por las épocas de invierno y verano, por ende se observó la variación de la concentración de fosfatos en las aguas del río Molino; por lo que el Dendograma en el anexo 2,9 nuevamente reporta a una distancia de 20 (distancia euclídea), dos grupos de muestreo, como son los muestreos de alta y baja concentración de fósforo total.

Los muestreos correspondientes a la época de invierno (con elevada precipitación pluvial) para este parámetro, son los 1, 2, 3 y 4 de mayo, los 5, 6, 7 y 8 de junio, los 9, 10, 11, y 12 de julio, los muestreos 13, 14, 16 y 17 de agosto y finalmente el muestreo 24 de octubre; en este parámetro aumentó el número de muestreos en la

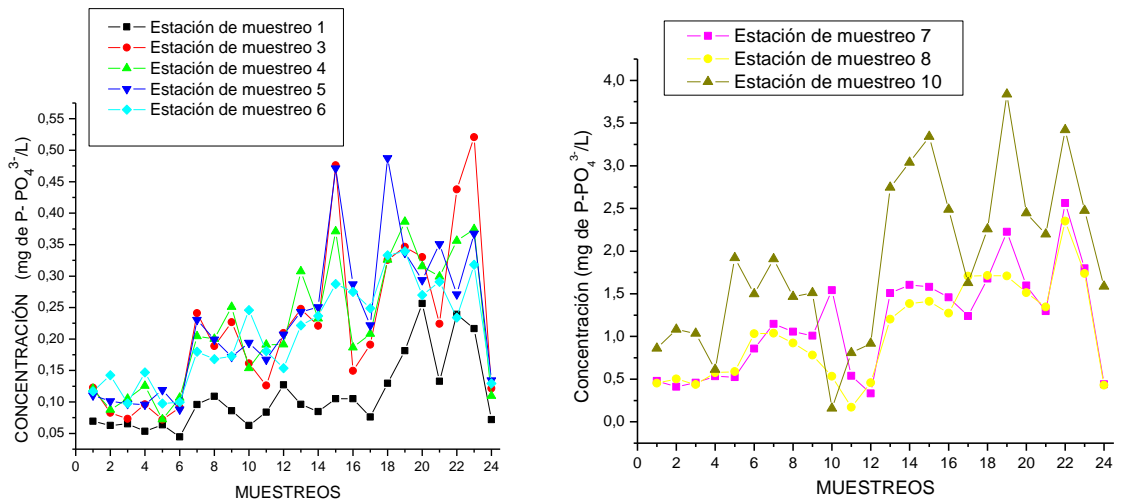
época de invierno, al igual que para el fósforo hidrolizable, debido a que como se mencionó anteriormente, el fósforo total está constituido de ortofosfatos inorgánicos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), polifosfatos ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  y  $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ ) y de fósforo orgánico, concluyendo que en estos muestreos (7, 9, 13, 14, 16 y 17) la concentración de los polifosfatos y fósforo orgánico fue menor por cambios atmosféricos ó geodinámicos en la fuente analizada.

En el segundo grupo de muestreos donde la concentración fue más elevada debido a la poca precipitación pluvial correspondieron los muestreos 15 de agosto, 18, 19 y 20 de septiembre y 21, 22 y 23 de octubre.

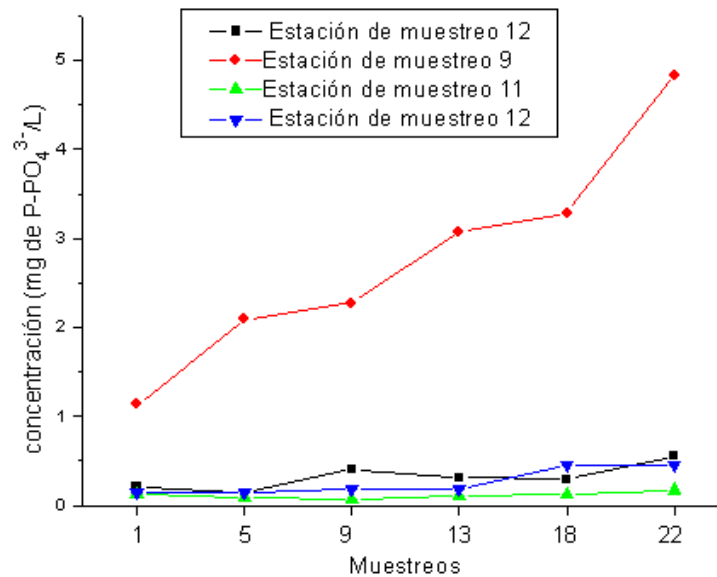
**Figura No. 20a.** Muestreos (1 - 24) vs la concentración de fósforo total (mg de  $\text{PO}_4^{3-}$  /L) para las diferentes estaciones de muestreo (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10).



**Figura No. 20b y 20c.** Muestreos (1- 24) vs la concentración de fósforo total (mg de  $\text{PO}_4^{3-}$ /L) para las diferentes estaciones de muestreo (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10).



**Figura No. 21.** Muestrros (1, 5, 9, 13,18 y 22) vs la concentración de fósforo total mg de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L para los diferentes estaciones de muestreo (2, 9, 11 y 12).



Como se mencionó anteriormente en la sección 5.6 los resultados obtenidos de fósforo total, fósforo hidrolizable y ortofosfatos en las aguas del río molino, se

examinaron teniendo en cuenta dos factores; a continuación se analizará estadísticamente cada uno de ellos:

#### 1. Las variaciones de las diferentes estaciones de muestreo frente a los muestreos

A los datos reportados anteriormente, se le realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para las 12 estaciones de muestreo (figura No. 4); como se aprecia (anexos 1,20 y 1,21, correspondientes) no se cumplen estos supuestos para la mayoría de las estaciones; como no se cumplían los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se procedió a analizar las diferentes estaciones de muestreo mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual arrojó como resultado, que hay diferencias significativas entre las estaciones de muestreo analizadas en todos los muestreos, para los tres parámetros analizados: fósforo total, fósforo hidrolizable y ortofosfatos, como lo indica el anexo 1,22

La prueba no paramétrica mostró diferencias significativas, debido a que se presentaron fluctuaciones en la concentración de los fosfatos (ortofosfatos, fósforo hidrolizable y fósforo total) en esta fuente hídrica, en el transcurso de los seis meses de monitoreo.

A continuación, se procedió a analizar estadísticamente cada una de las estaciones de muestreo frente a cada uno de los muestreos analizados. En el anexo 1,23 y 1,24, se reportan que en las pruebas de normalidad y homogeneidad de la varianza de la comparación de todas las doce estaciones de muestreo para el muestreo 22, indicando que hay diferencias significativas; por lo que se realizó la prueba no paramétrica de Games Howell (anexo 1.25), encontrando que para la mayoría de estación de muestreo hay diferencias significativas para el muestreo 22.

Con base en lo anterior, la concentración de las diferentes formas de fósforo (fósforo total, fósforo hidrolizable y ortofosfatos), presentan una baja concentración desde la estación de muestreo 1 hasta la estación de muestreo 6, las cuales presentan variaciones pequeñas (encontrando que hay diferencias significativas entre las estaciones 2, 3, 4, 5, y 6); esto se debe a que el río solamente recibe pocas descargas de aguas residuales de algunas viviendas, las cuales no cuentan con el sistema de alcantarillado público y por tanto, vierten sus desechos directamente.

Las concentraciones de las estaciones 7 a 10, se ven directamente afectadas porque el sistema colector de aguas residuales de la ciudad de Popayán, que hace sus descargas al río molino en un punto intermedio (entre las estaciones de muestreo 6 y 7), originan un incremento sustancial en la concentración de fosfatos

(ya que la principal fuente de fosfatos son los detergentes contenidos en este tipo de aguas residuales domésticas).

La estación de muestreo 9 (correspondiente al río Ejido), es otra estación muy impactada porque de igual manera el sistema colector la ciudad vierte gran parte de sus aguas residuales al río Molino

El río Cauca es un gran cuerpo de agua capaz de soportar la llegada de las aguas contaminadas del río Molino; en la estación 11 no se presentó mayor variación de la concentración en fosfatos (aguas arriba del vertimiento); en la estación 12 la concentración (aguas abajo) muestra que la tasa de dilución del río Cauca es muy buena, y por tanto las aguas contaminadas del río Molino no alteran drásticamente su calidad inicial, pero sí presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ,  $p = 0,0045$ ).

2. Las fluctuaciones de una misma estación de muestreo frente a los diferentes muestreos, las cuales se describen a continuación

A los resultados de muestreos vs estaciones de muestreos, se les realizó los supuestos de ANOVA, que se exponen en los anexos 1,26 y 1,27, dando a conocer que no se cumple la normalidad y hay heterogeneidad de varianzas para los tres parámetros analizados.

Como no se cumplían los supuestos de ANOVA, se procedió a analizar los resultados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual arrojó diferencias significativas entre los muestreos para cada estación, como lo indica el anexo 1,28.

Posteriormente, se analizó estadísticamente cada una de las estaciones de muestreo durante los 24 muestreos, confirmando que hay diferencias significativas entre un muestreo y otro para cada estación de muestreo, como se aprecia en el anexo 1,31, para la estación de muestreo 3. (Los anexos 1,29 y 1,30 confirman la no normalidad de los datos y la heterogeneidad de varianzas de todos los muestreos para la estación de muestreo 3).

## **5.7 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL AGUA DEL RÍO MOLINO**

### **5.7.1 Análisis físicoquímico y microbiológico del agua de las estaciones de muestreo A, B, C y D del río Molino:**

Se realizó el análisis fisicoquímico para evaluar la calidad del agua del río Molino en las estaciones de muestreo A, B, C y D en las épocas de invierno y verano correspondiente a los meses comprendidos entre julio y septiembre de 2007. Esta evaluación se encuentra dentro de los seis meses de muestreo realizado para el análisis de los fosfatos respectivo a los meses de mayo-octubre.

A continuación en las tablas 19 y 20, se muestran los resultados de los parámetros de calidad del agua del río Molino en las épocas de verano e invierno:

**Tabla 19.** Parámetros de calidad del agua del río Molino en la época de invierno  
Fecha de muestreo: 18 de julio de 2007

Parámetro	Estación de muestreo A	Estación de muestreo B	Estación de muestreo C	Estación de muestreo D
	Puebillo	Puente Cesar Negret	Barrio Junín	Barrio 5 de Abril
Color (UPC)	11	25	46	72
Turbidez (UNF)	3,99	6,05	13,25	21,83
Nitratos (mg/L N)	0,36	1,19	2,40	4,0
<b>Fosfatos</b> (mg/L P- PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> / ortofosfatos)	< 0,01	0,13	0,61	1,14
DBO <sub>5</sub> (mg/L)	0,9	1,9	7,3	10,8
DQO (mg/L)	< 4	9,3	34,6	64
SST (mg/L)	11,3	17,3	33,3	48,0
Grasas y aceites (mg/L)	<10	<10	<10	<10
Coliformes totales (NMP/100mL)	> 2419,6	> 2419,6	> 2419,6	> 2419,6
Coliformes fecales (NMP/100mL)	313,1	> 2419,6	> 2419,6	> 2419,6

**Tabla 20.** Parámetros de calidad del agua del río Molino en la época de verano,  
Fecha de muestreo:

Parámetro	Estación de muestreo A	Estación de muestreo B	Estación de muestreo C	Estación de muestreo D
	Puebillo	Puente Cesar Negret	Barrio Junín	Barrio 5 de Abril
Color (UPC)	13	27	36	83

Turbidez (UNF)	13,75	14,04	22,17	51,50
Nitratos (mg/L N)	0,18	0,57	2,6	3,0
<b>Fosfatos</b> (mg/L P- PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> / ortofosfatos)	0,012	0,23	1,13	1,63
DBO <sub>5</sub> (mg/L)	< 0,7	5,57	21,93	51,9
DQO (mg/L)	< 4	22	37	94
SST (mg/L)	1,47	7,33	21,7	56,7
Grasas y aceites (mg/L)	<10	<10	<10	<10
Coliformes totales (NMP/100mL)	> 2419,6	> 2419,6	> 2419,6	> 2419,6
Coliformes fecales (NMP/100mL)	290,5	> 2419,6	> 2419,6	> 2419,6

Los parámetros monitoreados reflejan una buena calidad de la fuente hídrica para las dos épocas de muestreo en la estación de muestreo A (Pueblillo), donde la DBO<sub>5</sub> fue < 1 mg/L y la DQO < 4 mg/L lo que indica que es un agua poco contaminada según la UNESCO (1996). Los valores para fosfatos cumplen con la resolución 2115 de 2007 para agua potable <sup>(9)</sup>, ya que presenta un valor < de 0,5 mg/L (ortofosfatos).

Los resultados de los demás parámetros monitoreados en esta estación, se encuentran dentro de los criterios de calidad establecidos en el decreto 1594/1984 en cuanto a usos del agua y residuos líquidos <sup>(26)</sup>, previo al tratamiento convencional. Actualmente, en dicho tramo, se encuentra la zona de captación para el acueducto de Tulcán de la ciudad de Popayán, donde se le realiza el tratamiento convencional de floculación, coagulación, decantación, filtración y desinfección (para eliminar la gran cantidad de coliformes totales > 2419,6 NMP Microorganismos/100mL y de coliformes fecales en las dos épocas de muestreo), con el objeto de lograr la potabilización del agua y así dar cumplimiento a la resolución 2115 de 2007 <sup>(9)</sup>, por medio de la cual se señalan las características del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano.

En el sitio de muestreo B (Puente del edificio César Negret), dentro de la ciudad de Popayán, las características de la calidad del agua varían. En la época de invierno la DBO<sub>5</sub> aun presenta un valor < 2 mg/L (1,9 mg/L) al igual que la DQO, la cual aún está por debajo de 20mg/L, presentando un valor de 9,3 mg /L, indicando que hasta este punto, el agua del río Molino no está impactada por vertimientos provenientes de la ciudad. En la época de verano, la DBO<sub>5</sub> y la DQO están más elevados que los valores para un agua no contaminada, con valores de 5,57 mg/L y 22 mg/L respectivamente, indicando de esta manera que la disminución del caudal debido a la época de verano <sup>(11)</sup>, afecta la calidad del agua en esta estación de muestreo. También presenta gran cantidad de coliformes (> 2419,6 NMP Microorganismos/100mL) totales y fecales en las dos épocas de muestreo.

En este punto no hay descargas de aguas servidas domiciliarias y la concentración de los fosfatos no sobrepasa lo permitido por la norma, presentando valores de ortofosfatos de 0,13 y 0,23 mg/L respectivamente, para las dos épocas.



En la estación de muestreo C, después que la ciudad ha descargado parte de sus aguas residuales en el río Molino <sup>(27)</sup>, la DBO<sub>5</sub> y la DQO sobrepasan los valores establecidos por la UNESCO (1996) <sup>(10)</sup>, indicando que la calidad del agua se ha deteriorado considerablemente, con valores de 7,3 mg/L y 34,6 mg/L, respectivamente en la época de invierno. En la época de verano, estos valores se elevan más generando un agua muy contaminada, impactada por las descargas de aguas residuales con valores de 21,93 mg/L y 37 mg/L, respectivamente. También presentan gran cantidad de coliformes > 2419,6 NMP Microorganismos/100mL, tanto totales como fecales en las dos épocas de muestreo. En esta estación, la concentración de fosfatos sobrepasa el valor permitido por la norma para diferentes usos, con valores de 0,61 mg/L y 1,13 mg/L, notándose la diferencia marcada en la concentración para la época de verano.

En la estación de muestreo D, después que el río Molino se ha mezclado con el río Ejido (el cual recibe otra parte de las aguas residuales de la ciudad de Popayán), la calidad del agua en este punto está totalmente deteriorada, ya que en la época de invierno, la DBO<sub>5</sub> es de 10,8 mg/L y según la UNESCO (1996) las aguas con DBO<sub>5</sub> mayores de 10 mg/L son aguas impactadas por aguas residuales, particularmente cerca del punto de vertimiento; la DQO presenta de igual manera un valor indicativo de gran descarga de contaminación 64 mg/L. El cambio abrupto se ve en la época de verano, donde el río Molino, mezclado con el río Ejido presenta una DBO<sub>5</sub> de 51,9mg/L, valor que se sale de cualquier normatividad, al igual que la DQO con un valor de 94 mg/L. Presenta además, gran cantidad de coliformes > a 2419,6 NMP Microorganismos/100mL totales y fecales, en las dos épocas de muestreo. En esta estación de muestreo también hay un exceso de fosfatos procedentes de las descargas de aguas servidas de los dos ríos.

### **5.7.2 Análisis fisicoquímico de pH, conductividad, oxígeno disuelto de las estaciones de muestreo 1 - 12 del río Molino**

En la tabla 21 se reportan los valores de pH, conductividad y oxígeno disuelto para las muestras de agua tomadas semanal y mensualmente en las doce estaciones de muestreo del río Molino, durante los seis meses de muestreo (mayo – octubre de 2007).





Los valores de la tabla 21 se analizaron mediante los supuestos del análisis de varianza (pruebas normalidad y homogeneidad) que se reportan en los anexos 1.32 y 1.33, los cuales arrojaron como resultado que: no se observa normalidad en la mayoría de las estaciones; además, poseen heterogeneidad de varianzas, por lo que se realizaron correlaciones no – paramétricas, las cuales se describen a continuación.

Debido a que se apreciaron diferencias significativas para las doce estaciones de muestreo durante los seis meses en cuanto a los parámetros de pH, conductividad y oxígeno disuelto, se realizaron las correlaciones no paramétricas de Spearman (tabla 22) para probar la existencia de una relación recíproca de rangos entre dos variables. Los resultados arrojaron cuatro correlaciones lineales significativas: negativas entre pH y conductividad (- 0,377), entre conductividad y oxígeno disuelto (- 0,508), y entre oxígeno disuelto y la concentración de los iones ortofosfatos (- 0,885); es positiva entre conductividad y ortofosfatos (0,627).

La correlación lineal grande (negativa) entre oxígeno disuelto y la concentración de los iones ortofosfato, indica que al aumentar la concentración de ortofosfatos en las aguas superficiales del río Molino, disminuye notablemente la concentración del oxígeno disuelto, confirmando que el exceso de fósforo en el agua es una de las principales causas de la eutrofización, según los datos obtenidos en las estaciones de muestreo 7, 8, 9 y 10, donde el río es impactado por descargas de aguas residuales (el oxígeno disuelto es < 2 mg/ L); según la UNESCO (1996) <sup>(10)</sup>, estos valores causan la muerte a la mayoría de los peces, lo que indica que esta fuente en estas estaciones está contaminada con materia orgánica, por lo que posee mala

calidad del agua e incapacidad para mantener determinadas formas de vida, debido a que una fuente hídrica debe poseer entre 6 y 8 mg/L de oxígeno disuelto (11).

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis descriptivo multivariado de conglomerados jerárquicos, con el fin de explorar la posible existencia de grupos de estaciones semejantes para cada una de las diferentes variables en estudio (pH, conductividad y oxígeno disuelto) el cual se muestra en el anexo 2,7, 2,8 y 2,9 respectivamente.

**Tabla 22.** Correlaciones no paramétricas entre el pH, conductividad, oxígeno disuelto y ortofosfatos. Método de Spearman

	Parámetro		pH	CONDUCTIVIDAD	OXÍGENO DISUELTO	ORTOFOS-FATOS
Rho de Spearman	pH	Coefficiente de correlación	1,000	-0,377(**)	-0,082	-0,016
		Sig. (bilateral)	.	0,000	0,232	0,817
		N	216	216	216	216
	CONDUCTIVIDAD	Coefficiente de correlación	-0,377(**)	1,000	-0,508(**)	0,627(**)
		Sig. (bilateral)	0,000	.	0,000	0,000
		N	216	216	216	216
	OXIGENO DISUELTO	Coefficiente de correlación	-0,082	-0,508(**)	1,000	-0,885(**)
		Sig. (bilateral)	0,232	0,000	.	0,000
		N	216	216	216	216
	ORTOFOSFATOS	Coefficiente de correlación	-0,016	0,627(**)	-0,885(**)	1,000
		Sig. (bilateral)	0,817	0,000	0,000	.
		N	216	216	216	216

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

A continuación, se describe cada una de las variables analizadas y su incidencia en la calidad del agua.

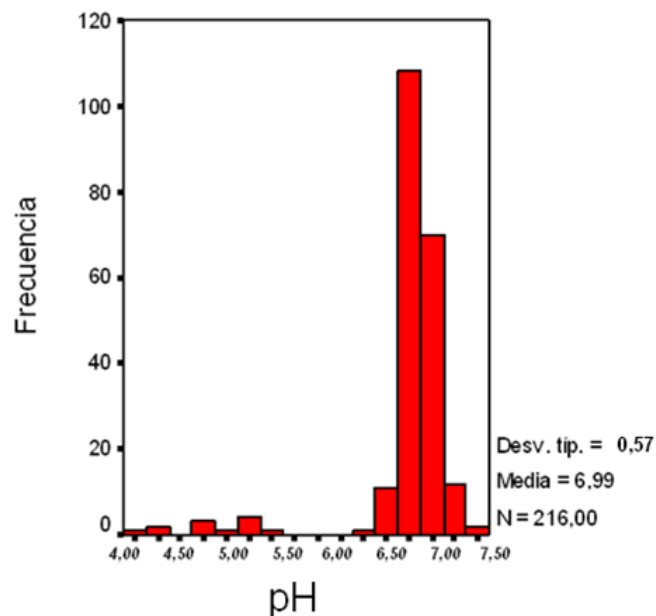
### 5.7.2.1 pH:

Al comparar el Dendograma (anexo 2,7) con los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, se detectan dos grupos a una distancia de 20 (distancia euclídea). Las estaciones 1 a 10 forman un grupo de características similares en cuanto a valores mayores de pH, y las estaciones 11 y 12 forman otro grupo diferente en cuanto a valores menores de pH. Estos dos rangos de pH se observan en la figura No. 22 que se muestra a continuación.

Estos dos grupos se forman debido a que las estaciones 1 a 10 corresponden a los ríos Molino y Ejido, donde las descargas de aguas residuales que estas estaciones reciben no tienen mucha influencia de acidez o basicidad, por lo que no hay grandes variaciones en ellas y se encuentran dentro de los rangos típicos de pH para aguas superficiales con valores entre 6,00 - 8,50 en el tramo analizado.

Las estaciones 11 y 12 correspondientes al río Cauca (antes y después de recibir el afluente de los ríos Molino y Ejido), presenta un valor de pH alrededor de 5,00, debido a que antes reciben el afluente (río vinagre), el cual tiene un pH muy ácido (3,11), ya que nace cerca de las canteras de azufre en el oriente del departamento; este pH está por debajo del rango típico para aguas superficiales, por lo que la bioquímica de este cuerpo de agua se ve afectada.

**Figura No. 22.** Histograma No. 1 de pH vs frecuencia de las muestras de agua del río Molino.

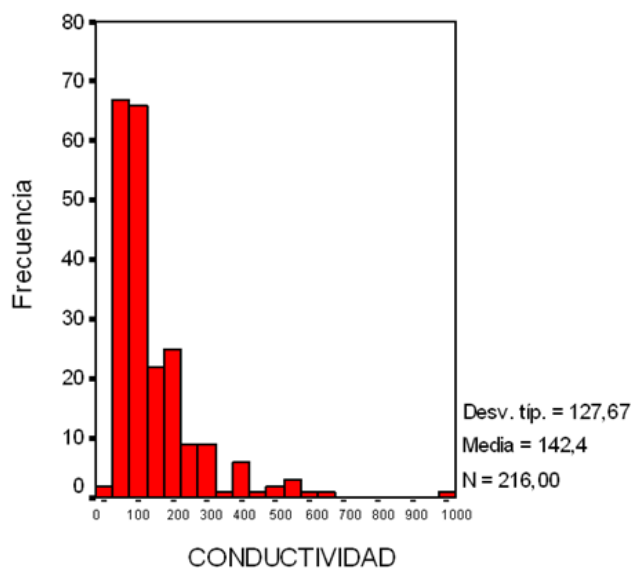


### 5.7.2.2 Conductividad:

Al comparar el Dendograma (anexo 2,8) con los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, se detectan 2 grupos a una distancia de 20 (distancia euclídea): Las estaciones 1 a 6 forman un grupo de características similares en cuanto a valores menores de conductividad y las estaciones 7 a 12 conforman otro grupo diferente en cuanto a valores mayores de la misma variable.

Estos resultados se deben a que la fuente hídrica hasta la estación 6, no recibe descargas de aguas residuales, por lo que la conductividad es baja, mientras que después de la estación 6, se vierten aguas residuales domésticas, incrementando notablemente la conductividad en la fuente hídrica. A pesar del incremento en conductividad, ésta se encuentra dentro del rango típico para aguas superficiales según la UNESCO (1996), que es de 10-1000 $\mu$ S/cm; según la figura No. 23, se puede apreciar que no sobrepasa de 600  $\mu$ S/cm.

**Figura No. 23.** Histograma No. 2 de conductividad vs frecuencia de las muestras de agua del río Molino.



### 5.7.2.3 Oxígeno Disuelto

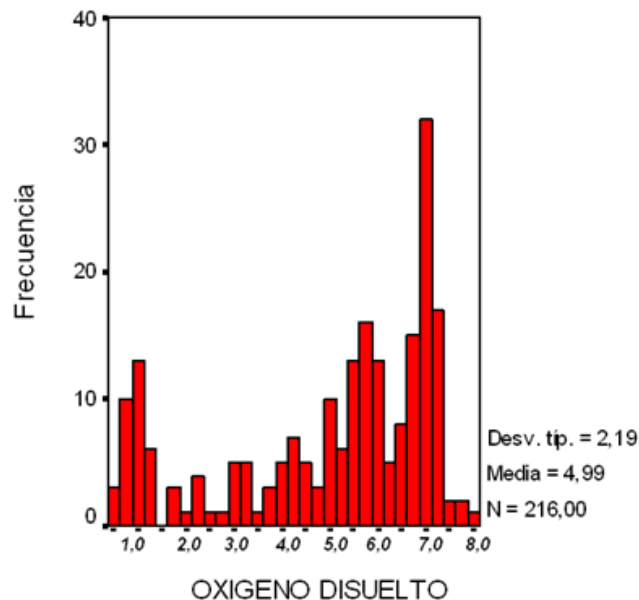
Al comparar el Dendograma (anexo 2,9) con los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, se detectan 2 grandes grupos a una distancia de 20 (distancia

euclídea).: Las estaciones 1 a 6 y 11 y 12 forman un grupo de características similares en cuanto a valores mayores de Oxígeno Disuelto y las estaciones 7 a 10 conforman otro grupo diferente en cuanto a valores menores de Oxígeno.

Los dos grupos encontrados muestran que el río Molino hasta la estación 6, posee el oxígeno disuelto adecuado para las diferentes formas de vida acuática (6-8mg/L), mientras que en las estaciones 7 a 10 por las grandes descargas de materia orgánica, disminuye notablemente este parámetro con valores desde 8,0 hasta 0,5 mg/L como se muestra en la figura No. 24.

A pesar de que los afluentes del río Cauca (ríos Molino y Ejido) poseen bajo oxígeno disuelto, éste río en la estación 12 (después de la incorporación de éstos), presenta buena concentración de oxígeno disuelto al igual que en la estación 11 (donde no ha recibido estos afluentes); este comportamiento se debe a la tasa de dilución.

**Figura No. 24.** Histograma No. 3 de oxígeno disuelto vs frecuencia de las muestras de agua del río Molino.





## CONCLUSIONES

- ✓ Los parámetros fisicoquímicos analizados en las estaciones de muestreo A, B, C y D del río Molino en el municipio de Popayán, reflejan que la calidad de este recurso, el cual inicialmente es apto para su potabilización, se deteriora notablemente después de que el sistema colector de aguas residuales de la ciudad vierte parte de sus aguas al río.
- ✓ Las estaciones de muestreo C y D presentan concentraciones ortofosfatos de 0,61 y 1,13 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$  y de 1,14 y 1,63 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$  para las épocas de invierno y verano respectivamente, que salen de la normatividad y por tanto, no son aptas para el consumo humano en cuanto a este parámetro.
- ✓ Se encontró que el tiempo de reacción adecuado para la formación del complejo coloreado fosfomolibdico es de 20 minutos, para el cual, las absorbancias registradas presentan baja desviación estándar para cada uno de los estándares de la curva de calibración entre  $9,91 \times 10^{-5}$  y  $4,31 \times 10^{-4}$  al igual que bajo coeficiente de variación, con valores de 0,03527 % a 1,68218 %. La linealidad de igual manera es muy buena y corresponde a 0,99958 cercano a 1.
- ✓ La técnica de cuantificación resultó ser lineal en un rango de 0,0099 - 0,475 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ , precisa teniendo en cuenta que los %CV se encuentran entre 0,032 y 2,48 %; exacta con un porcentaje de recuperación de 95,67 – 100,07 % y con alta sensibilidad debida a sus límites de detección y cuantificación de  $2,8896 \times 10^{-3}$  mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$   $9,5084 \times 10^{-3}$  mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$  respectivamente.
- ✓ Se observó que la preservación de la muestra es un parámetro muy importante, ya que las variaciones de las concentraciones son significativas en una muestra sin preservar, al igual que a la que se le adicionó el reactivo mixto.
- ✓ La estandarización del método analítico demostró ser una alternativa viable para la determinación de ortofosfatos a partir de 0,0099 mg de  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ , ya que optimizadas las condiciones experimentales y la técnica espectrofotométrica, fue posible obtener parámetros analíticos que confirmaran la confiabilidad de los resultados obtenidos.
- ✓ El análisis estadístico dió a conocer que no hay diferencias significativas entre días para la concentración de los diferentes estándares o muestras analizadas durante la estandarización, concluyendo así que los datos

arrojados con la utilización de este método son confiables, por lo que el laboratorio ambiental podrá seguir utilizando este método para empezar a reportar datos con adecuado y comprobable grado de confianza.

- ✓ La concentración de los iones ortofosfatos, fósforo hidrolizable y fósforo total oscilaron entre 0,01-1,8 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ , 0,01-3,6 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$  y 0,01-4,0 mg de P-  $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$  en general para todos los muestreos y estaciones de muestreo, respectivamente. Las concentraciones de los iones ortofosfatos son las más bajas debido a que solo mide el fósforo inorgánico soluble en la muestra; la concentración intermedia correspondió al fósforo hidrolizable que además del fósforo soluble, mide polifosfatos y algo de fósforo orgánico y el fósforo total como su nombre lo indica, cuantifica las formas anteriores más todo el fósforo presente en la muestra.
- ✓ El agua del río molino hasta la estación de muestreo 6 presentó buenas características fisicoquímicas y baja concentración de fosfatos, además, cumple la normatividad para agua potable, pero desde la estación de muestreo 7 (después del colector de aguas residuales) la contaminación en cuanto a este parámetro es altísima hasta su desembocadura en el río Cauca.
- ✓ Se aprecia que la alta carga de contaminantes de fosfatos que desembocan en el río Cauca provenientes del río Molino y Ejido, no afectan la calidad de este río debido a la gran tasa de dilución que este presenta y teniendo en cuenta que el caudal del cuerpo receptor es mayor que el caudal del afluente.
- ✓ Para los 24 muestreos realizados al río Molino, se observan dos grandes grupos en cuanto a su concentración. En el primer grupo, los muestreos en donde la concentración de los fosfatos fue baja, pertenece a los meses de invierno (mayo – julio) donde la precipitación pluvial fue elevada, con excepción de algunos muestreos; y el segundo grupo de concentración, la más elevada correspondiente a los meses de verano agosto – octubre donde la precipitación pluvial bajó notoriamente, con la excepción de algunos muestreos donde la concentración disminuyó notablemente.
- ✓ Se comprobó que al aumentar la concentración de fosfatos en el agua, disminuye notablemente el oxígeno disuelto, por lo que, las estaciones de muestreo 7, 8, 9 y 10 presentan niveles muy bajos de oxígeno disuelto, menores a los rangos de concentración permitidos por la UNESCO (1998) para aguas superficiales.

- ✓ A diferencia del oxígeno disuelto, el pH y la conductividad para las estaciones de muestreo del río Molino, se encuentran dentro del rango a los valores permitidos por la UNESCO (1996) para aguas superficiales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. IDEAM. Programa de Fisicoquímica Ambiental. Protocolo para Análisis de Aguas. Fósforo. 1999.
2. GOODMAN & GILMAN, Las Bases Farmacológicas de la Terapéutico. Novena Edición, Volumen II, MC Graw- Hill- Interamericana. Pág.1621-1622.
3. STOKER, H. SEAGER, S. Química Ambiental Contaminación del Aire y del Agua. 1ed. Barcelona. Editorial Blume. 1981. 159-312.
4. DOMÉNECH Xavier. Química Ambiental, El impacto ambiental de los residuos. Departamento de química, Universidad Autónoma de Barcelona. Miraguano Ediciones. 1998.
5. TIPOS DE AGUAS. Disponible en internet: <[http://centros6.pntic.mec.es/cea.pablo.guzman7cc\\_naturales/agua.htm](http://centros6.pntic.mec.es/cea.pablo.guzman7cc_naturales/agua.htm)>.
6. SNOEYINK, V. JENKINS, D. Química del Agua. 1ed. México. Limusa. 1987. p. 13-36.
7. STOKER, H. SEAGER, S. Química Ambiental Contaminación del Aire y del Agua. 1ed. Barcelona. Editorial Blume. 1981. 159-312.
8. LANGE, E. Manual para el Análisis Simple de la Calidad del Agua. Ámsterdam Los Países Bajos. Fundación IWT. 1994. p. 6.1-6.13.
9. MINISTERIO DE SALUD. Normas Técnicas de Calidad del Agua Potable. Decreto 1575 del 9 de mayo de 2007.
10. UNESCO 1996. Water Quality Assesments. London. Reino Unido.
11. SAWYER, C. McCARTY, P. QUIMICA PARA INGENIERIA AMBIENTAL. 4ed. New York. McGraw Hill. 2001. p. 645-651,636-643, 596-611, 569-586.
12. IDEAM. Programa de Fisicoquímica Ambiental. Protocolo para Análisis de Aguas. Fòsforo. 1999
13. Disponiobel en internet: < [http://www.ucm.es/info/diciex/proyectos/agua/imagenes/imagenes\\_web/eutrofizacion\\_cambiado.jpg](http://www.ucm.es/info/diciex/proyectos/agua/imagenes/imagenes_web/eutrofizacion_cambiado.jpg)

14. Glen E. Rodgers, Química Inorgánica. Introducción a la Química de coordinación del estado sólido y descriptiva. Madrid. McGraw-Hill.1995. 162-164p
15. 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.
16. EPA, Method # 365.2 Phosphorus, All Forms (Colorimetric, Ascorbic Acid, Single Reagent) CAS # P Phosphorus 7723-14-0,2000.
17. Disponible en internet: <[http://www.tdx.cesca.es/URV/AVAILABLE/TDX-0330101-084912//pag 73-98 \(cap 4\).pdf](http://www.tdx.cesca.es/URV/AVAILABLE/TDX-0330101-084912//pag%2073-98%20(cap%204).pdf)>.
18. SKOOG, D.A. Principios de Análisis Instrumental. Quinta Edición. Madrid España. Mc Graw-Hill. 2001.
19. HARRIS, D. Análisis Químico Cuantitativo. 3ed. México. Grupo Editorial Iberoamerica. 1992. p. 35-62, 495-566.
20. AGILENT TECHNOLOGIES. Oerator´s Manual. Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System. Germany. 99 p. 2000.
21. González Guisande Cástor, Tratamiento de Datos, Ediciones Díaz de Santos, 2006.
22. IDEAM. Programa de Fisicoquímica Ambiental. Protocolo estandarización de métodos analíticos. Bogotá, 1999. 10 pág.
23. CRC, Protocolos de análisis de aguas en el Laboratorio Ambiental de la Corporación Autónoma Regional del Cauca.
24. SPSS, Statistical Package for the Social Sciences, Version 12.
25. Huheey James E., Keiter Ellen A., Keiter Richard L. Química Inorgánica. Principios de estructura y reactividad, Cuarta edición. Oxford University Press Harla México. 1993.
26. Decreto 1594 del 26 de junio de 1984, por el cual se reglamenta parcialmente el título I de la Ley 9 de 1979 así como el capítulo II del título VI- parte VI – parte III – libro II y el título III de la parte III- libro del Decreto 2811 de 1974 en cuanto al uso del agua y residuos líquidos.

27. PLAN DE SANEAMIENTO Y MANEJO DE VERTIMIENTOS\_ PSMV. Área urbana de la ciudad de Popayán 2007- 2017. Acueducto y Alcantarillado de Popayán S.A. E.S.P. Diciembre de 2007.