

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN  
DE MATERIA ORGÁNICA EN EL LABORATORIO DE SUELOS DE LA  
SECRETARÍA DE DESARROLLO AGROPECUARIO Y MINERO DEL CAUCA.**

**VIVIANA ANDREA MUÑOZ PORTILLA**

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

**2011**

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN  
DE MATERIA ORGÁNICA EN EL LABORATORIO DE SUELOS DE LA  
SECRETARÍA DE DESARROLLO AGROPECUARIO Y MINERO DEL CAUCA.**

**VIVIANA ANDREA MUÑOZ PORTILLA**

Trabajo de grado presentado bajo la modalidad de pasantía como requisito parcial  
para optar al título de

**QUÍMICA**

**Directora:**

**M. Sc. ISABEL BRAVO**

**Profesora del Departamento de Química**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**POPAYÁN**

**2011**

## DEDICATORIA

*Este trabajo está dedicado en primer lugar a Dios quien me iluminó y me dio fuerzas para culminarlo cuando pensé que todo estaba perdido.*

*A mi madre Aura Beatriz quien me guió siempre, que desde el cielo me bendice a diario y que en vida me brindó todas las herramientas para ser una persona con grandes valores.*

*A mi hija Valentina porque todos los días me enseña a ser valiente, a disfrutar de la vida y perseverar.*

*A mi padre Ángel María quien siempre está con una actitud positiva frente a la vida y con alegría en su corazón.*

*A Nubia mi hermana del alma, mi segunda mamá, quien siempre se preocupa por mi bienestar dándome consejos, por ayudarme y apoyarme en los momentos más adversos de la vida.*

*A mi hermano Diego quien con gran voluntad me apoyó a iniciar y culminar mi carrera, además de ser esa figura a seguir.*

*A mis hermanas y hermanos: Nelsy, Laura, Adolfo y Jesús quienes siempre tienen una palabra o simplemente un gesto de aliento, optimismo, y superación.*

*A Geisson quien me ha enseñado que en la vida lo más importante es alcanzar tus sueños, exigirte al máximo para poder dar lo mejor de ti sin esperar nada a cambio.*

*A mis amigas Mónica, Victoria, Diana, y demás compañeros quienes compartieron conmigo alegrías y penas, travesuras, rumbas y toda clase de situaciones divertidas y no tan divertidas que se presentan en la vida universitaria.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la profesora Isabel Bravo por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su tutoría y por cada uno de sus consejos, por su paciencia y dedicación en esta labor tan extenuante.*

*A la Universidad del Cauca especialmente a los profesores de Química por su conocimiento y enseñanzas.*

*Al ingeniero Vicente Emilio González Guzmán, jefe del laboratorio de suelos, quien me dio la oportunidad inicialmente abriéndome las puertas para realizar mi pasantía y posteriormente depositó su confianza en mí para desempeñarme laboralmente en el laboratorio de la SDAM.*

*A Don Ricardo porque siempre ha demostrado disposición cuando he requerido de su apoyo y sobre todo por su amabilidad y alegría.*

*A Henry, porque ha sido buen compañero y me ha apoyado cuando lo he necesitado, además de hacerme reír con sus ocurrencias.*

*A la familia Muñoz Realpe porque siempre me han brindado su apoyo moral incondicionalmente.*

*A mis demás familiares por su amor, apoyo y porque simplemente me enorgullece hacer parte de ellos.*

*De corazón:*

**GRACIAS**

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ANEXOS</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>XIV</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>2</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>3.1 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>3</b>
<b>3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>3</b>
<b>4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE</b>	<b>4</b>
<b>4.1 LA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO</b>	<b>4</b>
<b>4.1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS HUMICAS</b>	<b>5</b>
<b>4.1.1.1 Ácidos Húmicos</b>	<b>5</b>
<b>4.1.1.2 Ácidos Fúlvicos</b>	<b>6</b>
<b>4.1.1.3 Huminas</b>	<b>6</b>
<b>4.2 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA M.O</b>	<b>7</b>
<b>4.3.1 Propiedades físicas</b>	<b>7</b>
<b>4.3.2 Propiedades químicas</b>	<b>7</b>
<b>4.3 DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA EN SUELOS</b>	<b>8</b>
<b>4.3.1 Técnica volumétrica</b>	<b>8</b>
<b>4.3.2 Procedimiento</b>	<b>8</b>
<b>4.3.3 Principio colorimétrico</b>	<b>8</b>
<b>4.3.4 Técnica colorimétrica</b>	<b>9</b>
<b>4.3.5 Procedimiento</b>	<b>9</b>
<b>4.4 ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS DE ENSAYO</b>	<b>10</b>
<b>4.3.1 Conceptos relacionados</b>	<b>10</b>
<b>b) Sistema de gestión de calidad</b>	<b>10</b>
<b>c) Aseguramiento de la calidad</b>	<b>10</b>
<b>d) Acreditación</b>	<b>10</b>

<b>4.5</b>	<b>NORMA TÉCNICA ISO/IEC 17025</b>	<b>10</b>
<b>5</b>	<b>VALIDACIÓN DE MÉTODOS</b>	<b>11</b>
5.1	Por qué es necesario validar un método	11
<b>5.1.1</b>	<b>PARÁMETROS EN EL PROCESO DE VALIDACIÓN</b>	<b>12</b>
5.1.1.1	Incertidumbre	12
a)	Incertidumbre tipo A	12
b)	Incertidumbre tipo B	13
	Distribución rectangular o uniforme	13
	Distribución triangular o isósceles	13
	Distribución triangular rectángulo	13
c)	Estimación incertidumbre típica combinada	13
d)	Incertidumbre expandida U	14
5.1.1.2	Exactitud	14
5.1.1.3	Sensibilidad	14
5.1.1.4	Precisión	14
5.1.1.5	Repetibilidad	14
5.1.1.6	Reproducibilidad	14
5.1.1.7	Coefficiente de variación	14
5.1.1.8	Linealidad	15
5.1.1.9	Rango de linealidad	15
5.1.1.10	Precisión intermedia	15
5.1.1.11	Límite de detección	15
5.1.1.12	Límite de cuantificación	15
<b>5.2</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>15</b>
5.2.1	Prueba de normalidad de Shapiro Wilk	16
5.2.2	Pruebas paramétricas	16
5.2.3	Prueba T	16
5.2.4	ANOVA	16
5.2.5	Prueba Duncan	16
5.2.6	Homogeneidad de varianzas (Estadístico de Levene)	17
<b>5.3</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA POR PARTE DE CALS</b>	<b>17</b>
	(Control Analítico de laboratorios de Suelos)	
5.3.1	Criterios estadísticos empleados por CALS.	17

<b>6</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>18</b>
<b>6.1</b>	<b>Equipos, Materiales, Reactivos y Soluciones</b>	<b>18</b>
6.1.1	Equipos	18
6.1.2	Materiales	18
6.1.3	Reactivos	19
6.1.4	Soluciones patrón y soluciones de trabajo	19
<b>6.2</b>	<b>Ubicación geográfica de las muestras de suelo analizadas</b>	<b>19</b>
5.2.1	Caracterización fisicoquímica de los suelos analizados	19
<b>5.3</b>	<b>CALIBRACIÓN DEL EQUIPO</b>	<b>20</b>
5.3.2	Linealidad	20
5.3.3	Prueba de Normalidad (Shapiro Wilk)	20
5.3.5	ANOVA	20
5.3.6	Prueba Duncan	20
<b>6.4</b>	<b>VALIDACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL</b>	<b>21</b>
6.4.1	Barrido espectral ( $\lambda$ máx.)	21
6.4.2	Rango de trabajo	21
6.4.3	Linealidad	21
6.4.4	Precisión	21
6.4.5	Repetibilidad	21
6.4.6	Reproducibilidad	21
6.4.7	Límites críticos	21
<b>6.5</b>	<b>VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA</b>	<b>22</b>
6.5.1	Linealidad	22
6.5.2	Precisión	22
6.5.3	Incertidumbre de precisión	22
6.5.4	Exactitud	22
6.5.5	Límite de detección y de cuantificación	22
6.5.6	Sesgo	22
6.5.7	Pruebas intralaboratorio e interlaboratorios	22
<b>6.6</b>	<b>ELABORACIÓN DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO (POE)</b>	<b>23</b>

<b>7</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>23</b>
<b>7.1</b>	<b>CALIBRACIÓN DEL EQUIPO</b>	<b>23</b>
7.1.1	Linealidad	24
7.1.2	ANOVA	26
<b>7.2</b>	<b>VALIDACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL</b>	<b>27</b>
7.2.1	Barrido espectral ( $\lambda$ máx.)	27
7.2.2	Rango de trabajo	28
7.2.3	Preparación de la curva de la calibración	29
7.2.4	Linealidad	30
7.2.5	Precisión: repetibilidad y reproducibilidad	36
7.2.6	Límites críticos	37
<b>7.3</b>	<b>VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA</b>	<b>39</b>
7.3.1	Linealidad	40
7.3.2	Precisión y Exactitud	40
7.3.3	Incertidumbre de precisión	44
7.3.3.1	Incertidumbre asociada al material volumétrico	44
7.3.3.2	Incertidumbre asociada a los reactivos	45
7.3.3.3	Incertidumbre asociada a los equipos	46
7.3.3.4	Incertidumbre asociada a la balanza	46
7.3.3.5	Incertidumbre asociada al espectrofotómetro	47
7.3.3.6	Incertidumbre combinada total	48
7.3.3.7	Incertidumbre expandida	48
7.3.4	Comparación de metodología volumétrica y metodología colorimétrica.	49
7.3.5	Pruebas inter e intralaboratorios	51
7.3.5.1	Intralaboratorio	51
7.3.5.2	Interlaboratorio	53
<b>7.4</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA POR PARTE DE CALS (Control analítico de laboratorios de suelos).</b>	<b>54</b>
7.4.1	Porcentaje de error	56
<b>7.5</b>	<b>ELABORACIÓN DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO (POE)</b>	<b>57</b>



<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES</b>
<b>9</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>
	<b>ANEXOS</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Niveles de precisión adoptados por CALS	18
<b>Tabla 2</b>	Curva de calibración con concentraciones y absorbancias conocidas	23
<b>Tabla 3</b>	Calibración del equipo Pelkin Elmer Lambda1	23
<b>Tabla 4</b>	Resultados % de recuperación para la evaluación de calibración del equipo	25
<b>Tabla 5</b>	Prueba de Shapiro Wilk para la calibración del equipo	26
<b>Tabla 6</b>	ANOVA repetibilidad calibración del equipo	26
<b>Tabla 7</b>	Prueba de Duncan teniendo en cuenta las absorbancias	27
<b>Tabla 8</b>	Soluciones patrón de sacarosa	28
<b>Tabla 9</b>	Preparación de la curva de calibración de sacarosa	29
<b>Tabla 10</b>	Resultados para la evaluación de la linealidad instrumental	30
<b>Tabla 11</b>	Pruebas de normalidad para los resultados de linealidad instrumental de absorbancia en función de mgC	31
<b>Tabla 12</b>	Pruebas de normalidad para los resultados de linealidad instrumental de absorbancia en función del día	31
<b>Tabla 13</b>	ANOVA para linealidad instrumental considerando como factor los mgC	32
<b>Tabla 14</b>	Prueba de Duncan para absorbancia en función de los mgC	32
<b>Tabla 15</b>	ANOVA para los resultados de linealidad instrumental considerando como factor el día de evaluación	33
<b>Tabla 16</b>	Prueba de homogeneidad de varianzas de absorbancia	33

en función de mgC

<b>Tabla 17</b>	Prueba de homogeneidad de varianzas de absorbancia en función del día	33
<b>Tabla 18</b>	Evaluación de la linealidad instrumental	34
<b>Tabla 19</b>	Evaluación linealidad instrumental	35
<b>Tabla 20</b>	Resultados obtenidos en la evaluación estadística del coeficiente de correlación de Pearson	35
<b>Tabla 21</b>	Resultados obtenidos en la evaluación estadística de la pendiente y el intercepto	36
<b>Tabla 22</b>	Datos curvas de calibración bajo condiciones de repetibilidad	36
<b>Tabla 23</b>	Curva de calibración bajo condiciones de reproducibilidad	36
<b>Tabla 24</b>	Precisión instrumental bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad	37
<b>Tabla 25</b>	Cálculo del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ)	38
<b>Tabla 26</b>	Resultados para la determinación experimental de LOD	38
<b>Tabla 27</b>	Resultados para la determinación experimental de LOQ	39
<b>Tabla 28</b>	Especificaciones geográficas de los suelos analizados.	40
<b>Tabla 29</b>	Curvas para determinar precisión y exactitud de la metodología	40
<b>Tabla 30</b>	Prueba T diferentes niveles de concentración	41
<b>Tabla 31</b>	Resultados de precisión de muestras de suelo por triplicado	42
<b>Tabla 32</b>	% de materia orgánica de acuerdo al clima y altura sobre el nivel	43

del mar

<b>Tabla 33</b>	Incertidumbre de precisión bajo condiciones de reproducibilidad	44
<b>Tabla 34</b>	Incertidumbre asociada al material volumétrico	45
<b>Tabla 35</b>	Incertidumbre asociada a los reactivos	46
<b>Tabla 36</b>	Incertidumbre asociada a la balanza	47
<b>Tabla 37</b>	Incertidumbre asociada al espectrofotómetro	47
<b>Tabla 38</b>	Datos obtenidos metodología colorimétrica	49
<b>Tabla 39</b>	Datos obtenidos metodología volumétrica	49
<b>Tabla 40</b>	Comparación de la metodología colorimétrica con la metodología volumétrica	50
<b>Tabla 41</b>	Prueba T colorimetría y volumetría con mg de las réplicas	50
<b>Tabla 42</b>	Datos obtenidos valoración de la metodología (Analista 1)	51
<b>Tabla 43</b>	Datos obtenidos valoración de la metodología (Analista 2)	52
<b>Tabla 44</b>	Prueba T para muestras relacionadas (Analista 1- Analista 2)	53
<b>Tabla 45</b>	%C.V. muestras analizadas en el laboratorio de Agroquímica	53
<b>Tabla 46</b>	Resultados CALS Remesa 1 (muestras problema diferentes)	54
<b>Tabla 47</b>	Resultados CALS Remesa 1 (Una muestra con tres repeticiones A, B y C)	55
<b>Tabla 48</b>	Resultados CALS Remesa 2 (muestras problema diferentes)	55
<b>Tabla 49</b>	Resultados CALS Remesa 2	56

(Una muestra con tres repeticiones A, B y C)

<b>Tabla 50</b>	Prueba T muestras relacionadas CALS	56
<b>Tabla 51</b>	Resultados porcentaje de error remesa 1	57
<b>Tabla 52</b>	Resultados porcentaje de error remesa 2	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA:</b>	Análisis de varianza
<b>Apróx.:</b>	Aproximadamente
<b>MO:</b>	Materia Orgánica
<b>Prom:</b>	Promedio
<b>UV:</b>	Ultravioleta
<b>VIS:</b>	Visible
<b>POE:</b>	Procedimiento operativo estandarizado
<b>CALS:</b>	Control Analítico de laboratorios de suelos
<b>SDAM:</b>	Secretaría de Desarrollo Agropecuario y Minero del Cauca
<b>SCCS:</b>	Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo
<b>LOQ:</b>	Límite de cuantificación
<b>LOD:</b>	Límite de detección
<b><math>\lambda</math> máx.:</b>	Longitud de onda máxima
<b>N:</b>	Normal
<b>SPSS:</b>	Statistical Product and Service Solutions
<b>% CV:</b>	Porcentaje de Coeficiente de Variación
<b>mgC:</b>	Miligramos de carbono
<b>n:</b>	Número de mediciones
<b>s :</b>	Desviación estándar
<b>% R:</b>	Porcentaje de recuperación
<b><math>K_2Cr_2O_7</math>:</b>	Dicromato de Potasio
<b><math>H_2SO_4</math> :</b>	Ácido sulfúrico
<b><math>C_{orgánico}</math>:</b>	Carbono orgánico
<b><math>Cr_2(SO_4)_3</math>:</b>	Sulfato crómico
<b><math>CO_2</math>:</b>	Dióxido de carbono
<b><math>K_2SO_4</math>:</b>	Sulfato de Potasio
<b><math>H_2O</math>:</b>	Agua
<b>r :</b>	Coeficiente de correlación
<b>a:</b>	Intercepto
<b><math>s_b</math> :</b>	Desviación estándar del blanco
<b><math>m_{cal}</math>:</b>	Pendiente de la curva de calibración
<b>M:</b>	Molar
<b>Er:</b>	Error relativo
<b>Log:</b>	Logaritmo
<b>mg/L:</b>	Miligramos por litro
<b>NTC:</b>	Norma técnica colombiana
<b>RSD:</b>	Desviación estándar relativa

<b>sig:</b>	Significancia
$u$ :	Incertidumbre
$u_A$ :	Incertidumbre tipo A
$u_B$ :	Incertidumbre tipo B
$u_f$ :	Incertidumbre en el instrumento fotométrico
$u_i$ :	Incertidumbre instrumental
$u_p$ :	Incertidumbre en la precisión
$u_{vol}$ :	Incertidumbre asociada al material volumétrico
$u_{p2}$ :	Incertidumbre asociada a la pipeta de 2mL
$u_{p5}$ :	Incertidumbre asociada a la pipeta de 5mL
$u_{p10}$ :	Incertidumbre asociada a la pipeta de 10mL
$u_{balón}$ :	Incertidumbre asociada al balón de 100 mL
$u_{bur}$ :	Incertidumbre asociada a la bureta de 25mL
$u_{react}$ :	Incertidumbre asociada a los reactivos
$u_{as}$ :	Incertidumbre asociada al ácido sulfúrico
$u_{dp}$ :	Incertidumbre asociada al dicromato de potasio
$u_{p2}$ :	Incertidumbre asociada a la pipeta de 2mL
$u_{reactT}$ :	Incertidumbre total de los reactivos
$u_e$ :	Incertidumbre asociada a los equipos
$u_b$ :	Incertidumbre asociada a la balanza
$u_e$ :	Incertidumbre asociada al espectrofotómetro
$u_{cT}$ :	Incertidumbre combinada total
$U$ :	Incertidumbre expandida

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estructura del ácido húmico	5
<b>Figura 2</b>	Laboratorio de Suelos de la SDAM	10
<b>Figura 3</b>	Tipos de distribución de probabilidades	13
<b>Figura 4</b>	Equipo Perkin Elmer Lambda 1	19
<b>Figura 5</b>	Linealidad calibración del equipo Pelkin Elmer Lambda 1	23
<b>Figura 6</b>	Espectro de absorción de una solución patrón de sacarosa (10 mg/mL)	28
<b>Figura 7</b>	Curva rango de trabajo	28
<b>Figura 8</b>	Curva de calibración de sacarosa, dicromato de potasio, agua destilada y ácido sulfúrico	29
<b>Figura 9</b>	Curva de calibración diaria con siete niveles de concentración	29
<b>Figura 10</b>	Evaluación de la linealidad instrumental	30
<b>Figura 11</b>	Curva de calibración promedio de sacarosa	32
<b>Figura 12</b>	Curvas de calibración para los límites críticos	36
<b>Figura 13</b>	Curva para la determinación experimental del LOD y LOQ	38
<b>Figura 14</b>	Muestras analizadas para la validación de la metodología	39
<b>Figura 15</b>	Curva de calibración para la precisión de la metodología	40
<b>Figura 16</b>	Curva promedio linealidad con un nivel más bajo de mgC	42
<b>Figura 17</b>	Curva de calibración realizada por el analista 1	50
<b>Figura 18</b>	Curva de calibración realizada por el analista 2	51



<b>Figura 19</b>	Curva de calibración realizada en el laboratorio de Agroquímica	52
<b>Figura 20</b>	Primer envío CALS	53
<b>Figura 21</b>	Segundo envío CALS	54

## 1. RESUMEN

En este trabajo se validó el método colorimétrico de Walkley-Black para la determinación de materia orgánica (MO) en suelos en el laboratorio de la Secretaría de Desarrollo Agropecuario y Minero del Cauca, teniendo en cuenta los factores desviación estándar, coeficiente de variación e incertidumbre que comprueban que la metodología es adecuada y aplicable en dicho laboratorio.

La relación directa que existe entre la MO y la fertilidad de un suelo radica en que esta influye sobre diversas propiedades del suelo; físicamente confiere al suelo un color oscuro, mejora su estructura generando estabilidad, aumenta la capacidad de retención de agua facilitando el asentamiento de vegetación, protege al suelo de la erosión entre otros beneficios. En cuanto a las propiedades químicas la MO mejora la disponibilidad de micronutrientes principalmente hierro, manganeso zinc y cobre, reduce los efectos tóxicos de cationes libres, influye directamente en la disponibilidad de nitrógeno etc. Dentro de las características biológicas se encuentra que la MO sirve de fuente de energía para los microorganismos, proporciona actividad enzimática y tiene un papel importante en la absorción de pesticidas.<sup>[1]</sup>

Dada la importancia de contar con un método para la determinación de MO en muestras de suelo cuantitativo, económico, confiable y seguro además que provea resultados de calidad, reproducibles y adecuados para satisfacer las necesidades y expectativas del sector agropecuario, se validó la metodología colorimétrica de Walkley Black para MO en muestras de suelo, considerando los parámetros estadísticos y sus resultados de linealidad ( $r= 0,9999$ ), rango lineal entre (2,10 mgC y 14,72 mgC), sensibilidad (0,0146), límite de detección (0,210), límite de cuantificación (0,704), exactitud entre (%E: 0,66 y 3,10), precisión entre (%C.V:1,77 y 4,5), repetibilidad entre (%C.V: 0,60 y 3,65), reproducibilidad entre (%C.V:0,09 y 3,44) y una incertidumbre expandida del 0,158.

Igualmente con la metodología adoptada y los resultados obtenidos; se realizó una validación con la institución Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo (SCCS) y su programa Control Analítico de Laboratorios de Suelos (CALS) quien coordina a los laboratorios afiliados para la evaluación y seguimiento de la calidad en las determinaciones analíticas de suelos en busca de generar un resultado estandarizado de alta calidad para beneficio del usuario.

En todo el proceso de análisis de laboratorio se cumplió con las recomendaciones especificadas en la norma NTC ISO/IEC 17025 para acreditación de laboratorios, buscando garantizar la calidad de los resultados.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El laboratorio de suelos adscrito a la Secretaría de Desarrollo Agropecuario y Minero del Cauca, presta el servicio de análisis de suelos, a la comunidad del sector agropecuario de los diferentes municipios del Departamento del Cauca y Departamentos vecinos por lo tanto tiene la responsabilidad de garantizar a los usuarios, generalmente sector agropecuario, resultados que sean confiables para poder ofrecer una recomendación acertada sobre el manejo que se le debe hacer al mismo.

Los laboratorios de suelos en nuestro país pueden regular sus metodologías a través de la afiliación a la SCCS y por ende al CALS para posteriormente iniciar el proceso de acreditación, que en este caso correspondería a la acreditación bajo la norma NTC ISO/IEC 17025.

Uno de los análisis necesario y solicitado por el sector agropecuario es el de MO. Este análisis actualmente se realiza mediante el método de Walkley Black; método volumétrico que implica fuentes de error propias de una titulación como son la subjetividad aportada por el analista y la utilización de apreciables cantidades de reactivos como sulfato ferroso y ácido fosfórico, implicando mayores costos. Lo anterior se puede evitar con la implementación de un método colorimétrico validado por el laboratorio.

Con esta pasantía se pretende validar la metodología para la determinación de materia orgánica por el método colorimétrico, ya que por tratarse de un método espectrofotométrico proporciona precisión, exactitud, comodidad y menor costo; además de que se ha comprobado a través de estudios científicos y por medio de resultados de laboratorios en Colombia que realizan este tipo de determinación en suelos, la reducción en el consumo de reactivos y las fuentes de error lo cual representa mayores beneficios para el laboratorio y sus usuarios<sup>[2]</sup>

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Validar el método de determinación colorimétrica de materia orgánica en muestras de suelos en el Laboratorio de la Secretaría de Desarrollo Agropecuario y Minero del Cauca, con el propósito de contribuir al proceso de acreditación.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Implementar y estandarizar el método colorimétrico para la determinación de materia orgánica en suelos.
- Comparar los errores aleatorios y sistemáticos obtenidos para la metodología propuesta con los reportados por la metodología tradicional.
- Evaluar la metodología por parte de Control Analítico de Laboratorios de Suelos (CALs) mediante el suministro de muestras enviadas por ellos para el análisis colorimétrico.
- Elaborar un documento guía Procedimiento operativo estandarizado (POE) de la metodología validada, reportando los diferentes parámetros de validación y la incertidumbre del método.

## 4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### 4.1. LA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO (MOS)

Se define como “La fracción orgánica del suelo que incluye residuos vegetales y animales en diferentes estados de descomposición, tejidos y células de organismos que viven en el suelo y sustancias producidas por los habitantes del suelo”. En esta definición, el concepto de materia orgánica es una categoría muy amplia que incluye tanto materiales muy poco alterados como aquellos otros que si han experimentado profundos cambios en el suelo. Los residuos orgánicos, de cualquier naturaleza, llegan o están en el suelo y en su superficie o dentro de él e inician un proceso de mineralización, lento o rápido, en función de sus características climáticas y pedológicas. <sup>[3, 4, 5, 6, 7]</sup>

En la mineralización, los residuos sufren un proceso de degradación hasta los componentes elementales de las proteínas, carbohidratos y otros, los productos resultantes pueden ser objeto de nuevos procesos de resíntesis y polimerización, dando lugar a nuevos agregados químicos que reciben el nombre de sustancias húmicas que poseen características específicas; este proceso recibe el nombre de humificación <sup>[8, 9, 10]</sup>

Existe una gran diferencia entre la materia orgánica descomponible y la materia orgánica humificada. El humus es un producto de descomposición parcial de la materia orgánica fresca con posterior síntesis, está compuesto por diferentes sustancias húmicas. El concepto sobre el humus difiere un poco dentro de unos autores: Stevenson et al <sup>[11]</sup> y Kokonova <sup>[12]</sup> lo definen como la totalidad de restos postmortem presentes en el suelo; Piccolo y M Bagwu <sup>[13]</sup> lo describen como el conjunto de aquellos componentes difícilmente mineralizables que se acumulan en el suelo. Zapata, <sup>[14,15]</sup> reporta que el término humus es aplicado a compuestos que se forman en el suelo, por procesos pedogenéticos, estos procesos son colectivamente llamados humificación y producen una mezcla de sustancias que tienen una alta resistencia al posterior ataque microbiano y son completamente diferentes a cualquier sustancia vegetal o animal. Este componente, de color negro oscuro, de la fase coloidal del suelo juega un papel significativo en la formación y estabilización de los agregados, en el control de la acidez, en el reciclaje de elementos nutritivos, en la desintoxicación de compuestos peligrosos que llegan al suelo y en su fertilidad.

La calidad de la MO del suelo depende de su madurez, medida de acuerdo al grado de humificación, evaluado mediante diferentes parámetros, entre los cuales se consideran: Índices de humificación HR1, relación E4/E6, de la MO. El índice de humificación es la relación entre el porcentaje de carbono de los ácidos húmicos sobre el porcentaje de carbono de la fracción fúlvica y la relación E4/E6 es La relación de las densidades ópticas o absorbancias de las soluciones acuosas de ácidos húmicos y fúlvicos a 465 y 665 nm es ampliamente utilizada en la caracterización de esos materiales que permite inferir acerca del grado de

aromaticidad de las moléculas de sustancias húmicas, así valores bajos, implican un alto grado de aromaticidad y valores altos indican un mayor contenido de cadenas alifáticas, Permite diferenciar los ácidos húmicos de los fúlvicos; se considera que valores superiores a 5 son propios de los ácidos fúlvicos<sup>[13, 16, 17]</sup>

Finalmente para la hallar el porcentaje de MO en el suelo se multiplica el contenido de CO por el factor matemático 1,724 y además los resultados se dan en base seca por lo tanto se debe discriminar el porcentaje de humedad correspondiente a cada muestra de suelo (Anexo A).

#### 4.1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS

Las Sustancias húmicas se clasifican tomando como base su solubilidad en diferentes solventes; así aparecen tres grupos: ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y huminas.<sup>[4, 11, 13, 18, 19, 20, 21]</sup>

##### 4.1.1.1. Ácidos húmicos

Los AH son las sustancias solubles en álcali e insolubles en ácido. Es la fracción de la MOS biológicamente más resistente, con una gama amplia de estructuras aromáticas condensadas y envueltas por componentes de cadenas alifáticas. Poseen mayor peso molecular que los AF, son ricos en compuestos aromáticos, estructuras alifáticas y biopolímeros de carbón altamente funcionales, que estabilizan los suelos; presentan una CIC alta. Los geles de AH son grandes retenedores de agua. Los ácidos húmicos se extraen con NaOH, KOH, NH<sub>4</sub>OH, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, NaF, oxalato sódico, urea u otros, solos o en mezcla de ellos. Dicha extracción alcalina es precipitada cuando se acidifica el medio con ácido HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, formando un gel oscuro.<sup>[3, 4, 16, 17, 21]</sup> Generalmente son polímeros de alto grado, conformados por monómeros y estos a su vez formados por unidades estructurales. Estas unidades se componen de: 1) un núcleo, 2) una cadena puente, y 3) grupos orgánicos reactivos, que se presentan entrelazados formando coloides esferoidales; su carácter ácido, o sea su capacidad de intercambio catiónico, se basa principalmente en la presencia de radicales COOH y OH.<sup>[7, 22, 23, 24]</sup>

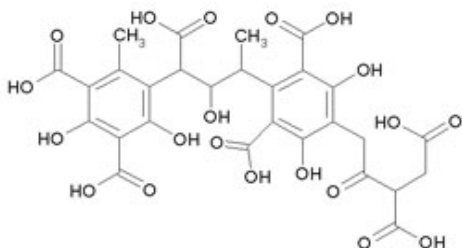


Figura 1. Estructura de ácido húmico

#### 4.1.1.2. Ácidos fúlvicos.

Los AF son sustancias móviles, solubles en ácido y álcali, son aparentemente materiales jóvenes no asociados con la fracción mineral, formados por polisacáridos, aminoácidos y compuestos fenólicos que presentan contenidos altos de grupos carboxílicos.

Presentan pesos moleculares bajos (menores de 5KDa); para algunos investigadores los AF son fragmentos oxidados de los AH, mientras que para otros son los precursores de los AH. Los AF están formados por polisacáridos, aminoácidos, compuestos fenólicos, entre otros, con un contenido alto en grupos carboxílicos. Las huminas son insolubles a cualquier pH, son poco retenedoras de agua y de metales frente a los AH y AF. [3,6, 7,9, 25]

#### 4.1.1.3. Huminas.

El grupo de sustancias húmicas que no se extraen con soluciones alcalinas del suelo se denominan huminas. Se consideran que son ácidos húmicos que han perdido la capacidad de disolverse en álcali. Esto debido a la alteración de las propiedades químico coloidal, provocado por desecación e interacción de los ácidos húmicos con la parte inorgánica del suelo. En el suelo se encuentran en diferentes estadios como “humina microbiana”, formada por metabolitos microbianos y por compuestos alifáticos que derivan de ellos, “humina heredada”, próxima a la materia orgánica fresca, constituyente de las membranas, “humina noformada”, resultado de procesos de inmovilización por los cationes y no es extraíble por reactivos alcalinos, y finalmente la “humina estabilizada”, resultante de la evolución lenta de los ácidos húmicos que provoca la polimerización de los núcleos aromáticos y un descenso de su solubilidad ante los reactivos de extracción. [7,26, 27, 28, 29, 30].

El término materia orgánica es generalmente usado para representar los constituyentes orgánicos del suelo, incluyendo plantas sin degradar y tejidos animales, sus productos de descomposición parcial, y la biomasa del suelo [13]. De allí que este término incluye:

- Moléculas orgánicas identificables de alto peso molecular tales como polisacáridos y proteínas.
- Sustancias más simples tales como azúcares, aminoácidos, y otras moléculas pequeñas.
- Sustancias húmicas.

## **4.2 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA MATERIA ORGÁNICA**

### **4.2.1 Propiedades físicas:**

- Confiere al suelo un determinado color oscuro.
- Da lugar a una buena estructura, estable. Las sustancias húmicas tienen un poder aglomerante, las cuales se unen a la fracción mineral y dan buenos flóculos en el suelo originando una estructura grumosa estable, de elevada porosidad, lo que implica que la permeabilidad del suelo sea mayor.
- Tiene una gran capacidad de retención de agua lo que facilita el asentamiento de la vegetación, dificultando la acción de los agentes erosivos.
- La temperatura del suelo es mayor debido a que los colores oscuros absorben más radiaciones que los claros.
- Protege al suelo de la erosión. Los restos vegetales y animales depositados sobre la superficie del suelo lo protegen de la erosión hídrica y eólica. Por otra parte, como ya hemos mencionado, el humus tiene un poder aglomerante y da agregados que protegen a sus partículas elementales de la erosión.
- Protege al suelo de la contaminación. La materia orgánica adsorbe plaguicidas y otros contaminantes y evita que estos percolen hacia los acuíferos..

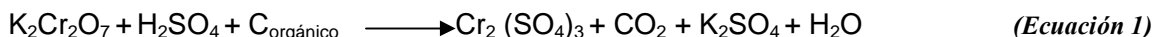
### **4.2.2 Propiedades químicas:**

- Las sustancias húmicas tienen propiedades coloidales, debido a su tamaño y carga (retienen agua, hinchan, contraen, fijan soluciones en superficie, dispersan y flocculan).
- La materia orgánica es por tanto una fase que reacciona con la solución del suelo y con las raíces.
- Tiene capacidad de cambio. La materia orgánica fija iones de la solución del suelo, los cuales quedan débilmente retenidos, están en posición de cambio, evita por tanto que se produzcan pérdidas de nutrientes en el suelo.
- La capacidad de cambio es de 3 a 5 veces superior a la de las arcillas, es por tanto una buena reserva de nutrientes.
- Influye en el pH. Produce compuestos orgánicos que tienden a acidificar el suelo.
- Es un agente de alteración por su carácter ácido. Descompone los minerales.<sup>[31]</sup>



### 4.3 DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA EN SUELOS

Existen dos técnicas que son las más utilizadas para la determinación de materia orgánica, la volumetría y la colorimetría, en las cuales el suelo se oxida con una solución de dicromato de potasio estandarizada, utilizando el calor producido por la dilución de ácido sulfúrico concentrado, en la solución crómica. La reacción que ocurre es la siguiente. <sup>[32]</sup>



**4.3.1 Técnica volumétrica:** En esta técnica la oxidación del carbono orgánico no es total se logra un requerimiento del 77%, como queda MO que no se oxida y dicromato de potasio que sobra después de la reacción entonces, la determinación se realiza valorando por retroceso la cantidad de dicromato de potasio que no ha sido reducido por la materia orgánica, con una solución de sulfato ferroso, utilizando como indicador difenilamina.

#### 4.3.2 Procedimiento:

1. Pesar 0,5 g de suelo amarillo, seco al aire y tamizado con malla No. 60 en erlenmeyer de 500 mL y pesar 0,25 para suelos negros.
2. Añadir 20mL de la solución de dicromato de potasio 1N y mezclar el suelo con la solución.
3. Añadir 20 mL de ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y mezclar suavemente durante 1 minuto. Dejar la mezcla en reposo de 20 a 30 minutos.
4. Simultáneamente realizar un ensayo de valoración en blanco, de la misma manera indicada en los puntos 1, 2,3.
5. Diluir la solución a 150 mL con agua destilada y añadir 3 gotas de ferroína.
6. Titular con la solución de sulfato ferroso 0,5 N hasta que el color de la solución muestra vire de azul a verde brillante. <sup>[33]</sup>

**4.3.3 PRINCIPIO COLORIMÉTRICO:** La colorimetría es una técnica instrumental que tiene por objeto determinar la absorción de luz visible por una muestra, que puede ser una sustancia pura o bien una mezcla o disolución.

La absorción de radiación por una muestra en la región visible, así como en general en cualquier región del espectro, está regida por la ley de Lambert – Beer. Esta ley establece que la fracción de luz absorbida por una muestra es tanto mayor cuanto más grande es el número de moléculas sobre las que incide la radiación.

El colorímetro es un instrumento que permite leer la absorbancia de una solución en una frecuencia de luz específica. Es por eso, que se hace posible descubrir la concentración de un soluto conocido siendo este proporcional a la absorbancia. Diferentes sustancias químicas absorben las diferentes frecuencias de luz. Los colorímetros se basan en el principio de que la absorbancia de una sustancia es proporcional a su concentración, y es por eso que las sustancias más concentradas muestran una lectura más elevada de absorbancia. Se usa un filtro en el colorímetro para elegir el color de luz que más absorberá el soluto, para maximizar la precisión de la lectura. Note que el color de luz absorbida es lo opuesto del color del espécimen, por lo tanto un filtro azul sería apropiado para una sustancia naranja. Los sensores miden la cantidad de luz que atravesó la solución, comparando la cantidad entrante y la lectura de la cantidad absorbida.

**4.3.4 Técnica colorimétrica:** La determinación se hace por colorimetría, cuantificando el color verde del ácido crómico reducido a  $\lambda$  máx.= 585 nm, el cual es proporcional a la materia orgánica que reacciona. Se construye la respectiva curva de calibración a partir de una solución patrón de sacarosa.<sup>[34]</sup>

#### **4.3.5 Procedimiento:**

1. Se pesa en un erlenmeyer de 250 mL, 0,1 g suelo seco tamizado por malla 10.
2. Adicionar 5 mL de dicromato de potasio 1 N.
3. Adicionar 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (95 – 97 % de Pureza).
4. Agitar durante 1 minuto y posteriormente dejar en reposo durante 30 min.
5. Seguidamente adicionar 135 mL de agua destilada medidos en una probeta.
6. Agitar vigorosamente y dejar decantar durante 12 horas.
7. Al día siguiente tome del sobrenadante una alícuota para medir la absorbancia a una longitud de onda de 585 nm. El contenido de carbono orgánico (% Corg) en la muestra se obtiene al interpolar el valor de la absorbancia en la curva de calibración.

Existen otros métodos para la determinación de carbono orgánico, en este trabajo solo citaremos estos dos procedimientos.

## 4.4 ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS DE ENSAYO

### 4.4.1 Conceptos relacionados:

**a) Calidad:** Se define como la totalidad de rasgos y características de un producto o servicio, que conllevan la aptitud de satisfacer necesidades preestablecidas o implícitas.

**b) Sistemas de Gestión de Calidad:** Está definido como el conjunto de la estructura, responsabilidades, actividades, recursos y procedimientos de la organización de una empresa, que ésta establece para llevar a cabo la gestión de su calidad.

**c) Aseguramiento de la Calidad:** Conjunto de acciones planificadas y sistemáticas implementadas en el Sistema de Calidad, que son necesarias para proporcionar la confianza adecuada de que un producto satisfará los requisitos dados sobre la calidad.

**d) Acreditación:** Procedimiento por el cual un organismo con autoridad otorga un reconocimiento formal que un organismo o persona es competente para llevar a cabo tareas específicas. <sup>[35]</sup>

## 4.5 NORMA NTC ISO/IEC 17025:2005



**Figura 2.** Laboratorio de Suelos SDAM.

La norma NTC ISO/IEC 17025:2005 es la norma que contiene los requerimientos que los laboratorios de calibración y ensayo tienen que cumplir si desean demostrar que funcionan con un sistema de calidad, son técnicamente competentes y pueden generar resultados válidos.

Esta Norma se constituye como la guía para la evaluación de la conformidad de los requisitos para calidad y competencia aplicable a todos los laboratorios, independientemente de la naturaleza del ensayo y/o la calibración que se realice.

Proporciona herramientas y la estructura para que el laboratorio pueda generar confianza a sus clientes mejorando su competitividad y productividad.

Está dividida en requisitos de gestión y requisitos técnicos en donde la parte de gestión corresponde a los requisitos para la certificación del sistema de calidad, mientras que la parte técnica describe los requisitos para el personal, instalaciones, equipos, procedimientos, garantía de calidad e informes.

En la norma hay requerimientos de trazabilidad de las medidas y conocimiento de la incertidumbre de dicha medida, para la estructura y organización de actividades de laboratorio para la calificación y competencia del personal e identificación del personal clave, existe además un esquema de aprobación, para la utilización del equipo de medida, prueba y calibración para realizar finalmente un informe de resultados.

Dentro de la norma se estipula también que el laboratorio debe establecer y mantener procedimientos para controlar todos los documentos que forman parte de su sistema de calidad tales como: regulaciones, normas métodos de calibración y ensayo como también especificaciones, instrucciones y manuales. <sup>[36]</sup>

## **5. VALIDACIÓN DE MÉTODOS:**

La versión más reciente de la definición de validación se presenta en la norma ISO 9000:2000 en donde se establece que la validación es la confirmación y provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos para un uso o aplicación prevista.

En ISO IEC 17025 la validación se define como la confirmación por examen y la provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico propuesto.

Puede aceptarse que las diferencias conceptuales no son significativas, y por tanto no se encuentran mayores controversias al respecto.

El objeto de la validación puede ser un método, un proceso, un procedimiento, un diseño, un instrumento, un sistema, un producto, un servicio, un modelo, etc.

Una validación se vuelve necesaria cuando se plantea el problema de asegurar que la herramienta propuesta sirva para satisfacer una función determinada, un uso previsto. Se asume que tal herramienta no ha sido probada previamente para esa función.

Finalmente el resultado de una validación es una declaración sobre el cumplimiento, o incumplimiento, de los requisitos para el uso o aplicación dada, sustentada en evidencias. <sup>[37]</sup>

### **5.1 Por qué es necesario validar un método:**

- Cuando la medición analítica es importante. Cualquier aspecto de la sociedad se respalda de algún modo por una medición analítica.
- Es importante determinar el resultado correcto y ser capaz de demostrar que es correcto.

- Por la obligación profesional del analista. El cliente espera confiar en los resultados informados y generalmente los cuestiona cuando aparece algún conflicto (aquí el analista debe demostrar que ha informado la respuesta correcta para la parte analítica del problema del cliente).
- Se debe validar la aptitud del método y estimar la incertidumbre del resultado de un modo que sea ampliamente reconocido, internamente consistente y fácil de interpretar. <sup>[38]</sup>

### 5.1.1 Parámetros a tener en cuenta en el proceso de validación:

#### 5.1.1.1 Incertidumbre:

Es dentro de la metrología que la noción de incertidumbre, aplicada a los resultados de las medidas, tiene una importancia notoria, ya que es una indicación cuantitativa de la calidad de un resultado de medida y permite evaluar la fiabilidad de este resultado. La incertidumbre considera todas las fuentes posibles de error que interviene en el resultado final por lo que puede definirse como un parámetro asociado al resultado de una medida. La incertidumbre tipo A se determinan en el proceso de validación, obtenida a partir de observaciones repetidas bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad y se estima con base en la dispersión de los resultados individuales expresada por la desviación estándar. La incertidumbre de tipo B son cuantificadas utilizando información externa u obtenida por experiencia como: manuales del instrumento de medición, especificaciones del instrumento, normas o literatura, conocimiento sobre las características o el comportamiento del sistema de medición.

En la Incertidumbre debida a los equipos, reactivos y material volumétrico: se encuentran el espectrofotómetro y balanza. Para asegurar la calidad de los resultados en el laboratorio de suelos trabaja con reactivos Merck material en los que se encuentra su pureza y fecha de vencimiento. En cuanto a material volumétrico se refiere al material de vidrio clase A como balones aforados y pipetas.

**a) Incertidumbre tipo A** Se basa en la estimación de la desviación típica de los resultados obtenidos al medir repetidamente el mesurando. Siempre que sea posible se tiene que aplicar este tipo de estimación. La incertidumbre está determinada por:

$$u = \frac{DER}{\sqrt{n}} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Donde, DER es la desviación estándar relativa y n es el número de mediciones.

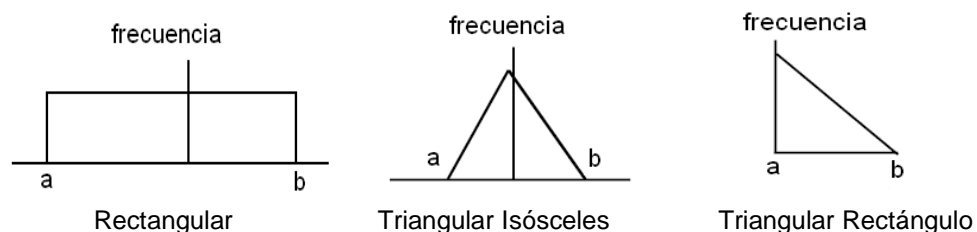
**b) Incertidumbre tipo B** Se obtiene a partir de la información dada por los fabricantes de los instrumentos de medida o en datos bibliográficos y en el tipo de distribución de frecuencias más apropiado en cada caso. Para calcular la desviación típica correspondiente a la estimación de la incertidumbre típica de tipo B se tiene en cuenta la distribución de frecuencias que siguen los resultados si se pudiesen hacer medidas repetidas del mesurando. Las distribuciones de frecuencias más habituales mediante este tipo de estimaciones son la distribución rectangular o uniforme, la triangular isósceles y la triangular rectángulo.

Antes de comparar y combinar contribuciones de la incertidumbre que tienen diferentes distribuciones, es necesario representar los valores de las incertidumbres originales como incertidumbres estándar. Para ello se determina la desviación estándar de la distribución asignada a cada fuente:

**Distribución rectangular o uniforme** se caracteriza porque cualquier valor, tiene las mismas probabilidades de darse y la desviación típica es igual a la amplitud de la distribución dividida por  $\sqrt{12}$

➤ **Distribución triangular isósceles** se caracteriza porque los valores centrales de un intervalo se dan con más frecuencia que los extremos y la desviación típica es igual a la amplitud de la distribución dividida por  $\sqrt{24}$

➤ **Distribución triangular rectángulo** se caracteriza porque en un extremo de la distribución se da la frecuencia mínima y en el otro extremo la máxima y la desviación típica es igual a la amplitud de la distribución dividida por  $\sqrt{18}$ .



**Figura 3.** Tipos de distribución de probabilidades

**c) Estimación de la incertidumbre típica combinada** Se obtiene combinando apropiadamente las incertidumbres estándares de los estimados de las fuentes de incertidumbre A y B aplicando la ley de propagación de errores a través de la regla de sumas de incertidumbres parciales

$$u_C = \sqrt{u_A^2 + u_B^2} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

El resultado de la combinación de las contribuciones de todas las fuentes de incertidumbre es la incertidumbre combinada la cual contiene toda la información esencial sobre la incertidumbre del mesurando. La ley de propagación se aplica de forma general, cualquiera que sea la distribución de las variables de entrada, y es el método básico de cálculo de incertidumbre de medida a partir de sus componentes.

**d) Incertidumbre expandida U** Indica un intervalo que representa una fracción  $p$  de los valores que puede probablemente tomar el mesurando. Generalmente se expande el intervalo de incertidumbre multiplicando la incertidumbre combinada por el llamado factor de cobertura  $k$  (para un nivel de confianza del 95,45% considera un valor de  $k$  igual a 2).<sup>[39]</sup>

$$U = u_c \times k$$

(Ecuación 4)

**5.1.1.2 Exactitud:** La exactitud de un método es la aproximación más estrecha entre un resultado o el promedio de una serie de resultados y el verdadero valor o de referencia. Se expresa en términos de error teniendo en cuenta que como referencia se toma patrones preparados en el laboratorio.

**5.1.1.3 Sensibilidad:** Es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración. Normalmente se mide como la pendiente de la curva de calibración. Se puede reportar el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.

**5.1.1.4 Precisión:** Indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones fijadas. Se expresa en términos de desviación estándar, entre otra (repetibilidad y reproducibilidad).

**5.1.1.5 Repetibilidad:** Precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en intervalos cortos de tiempo diferentes (cinco días diferentes) por el mismo analista, sobre la misma muestra homogénea, usando los mismos equipos.

**5.1.1.6 Reproducibilidad:** Expresa la precisión entre resultados obtenidos mediante la aplicación del mismo método por diferentes operadores en días diferentes y usando diferentes equipos, sobre réplicas de porciones analíticas.

**5.1.1.7 Coeficiente de variación (C.V):** Es una medida de dispersión relativa y se calcula dividiendo la desviación típica entre la media aritmética. Se interpreta como porcentaje, por lo que nos permitirá decidir entre dos muestras, cuál es la que presenta mayor dispersión.

**5.1.1.8 Linealidad:** Se refiere a la proporción entre la concentración y la señal producida por el instrumento.

**5.1.1.9 Rango de linealidad:** Intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar la cuantificación por interpolación en una curva estándar.

**5.1.1.10 Precisión intermedia:** Medida de la precisión de los resultados de un método de ensayo en condiciones diferentes de analista/observador, día, equipo y lote de reactivos, dentro del mismo laboratorio.

**5.1.1.11 Límite de detección mínimo (LD) o la concentración mínima detectable:** Se define como la cantidad o concentración más pequeña del analito que produce una señal  $X_L$  significativamente diferente de la señal del ruido de fondo  $X_b$ .

El criterio utilizado para que la concentración mínima detectable sea distinguible con certeza (significativamente diferente o estadísticamente diferente) del ruido de fondo es que la diferencia entre la señal del analito, de concentración muy baja, y la señal de los blancos sea igual a tres veces la desviación estándar de la señal de los blancos, utilizados para medir el ruido de fondo.

Experimentalmente, el límite de detección se determina involucrando todos los factores que afectan la medida y se define, en general, para obtenerlo en unidades de concentración como:

$$LD = 3s_b / m_{cal} \text{ bajas concentraciones} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde,  $s_b$  = desviación estándar de los blancos,  $m_{cal}$  es la pendiente de una curva de calibración del sistema, preparada a muy bajas concentraciones.

**5.1.1.12 Límite de cuantificación:** Corresponde a la cantidad o concentración del analito a partir de la cual es confiable realizar determinaciones cuantitativas y se define como:

$$LOQ = 10s_b / m_{cal} \text{ bajas concentraciones} \quad (\text{Ecuación 6})$$

## 5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El programa SPSS (Statistical Product and Service Solutions) es un conjunto de herramientas estadísticas que permite realizar :análisis descriptivos, análisis exploratorios, análisis de variables categóricas(tablas de contingencia), contrastar medias a través de la prueba T y análisis de varianzas de un factor y de varios factores, análisis de correlación lineal, análisis de regresión lineal, pruebas no



paramétricas para: una muestra, dos muestras independientes, varias muestras independientes, dos muestras relacionadas y varias muestras relacionadas.

El SPSS, responde al funcionamiento de todo programa que lleva a cabo análisis estadístico: los datos son analizados con una serie de órdenes, dando lugar a unos resultados de tipo estadístico que el investigador debe interpretar.

**5.2.1 Prueba de normalidad de Shapiro Wilk:** Utilizada en casos en el que el tamaño muestral sea igual o menor que 50 datos se utiliza Shapiro Wilk, permite contrastar la hipótesis nula de que los datos muestrales proceden de poblaciones normales. Cuando el resultado de la prueba no indica significancia ( $>0,05$ ) se acepta la hipótesis nula y se aplican pruebas paramétricas, de lo contrario (sig.  $<0,05$ ) se debe aplicar pruebas no paramétricas.

**5.2.2 Pruebas Paramétricas:** Son aquellas pruebas estadísticas que exigen que los datos a los que se aplican pertenezcan a una muestra aleatoria de una distribución de probabilidad de tipo normal o de Gauss, simétrica alrededor de la media. Viene determinada por dos parámetros, la media y la desviación típica.

**5.2.3 Prueba T:** La prueba T para una muestra permite contrastar hipótesis referidas a una media poblacional bajo la suposición que el verdadero valor de la media poblacional es  $\mu$  y la desviación típica poblacional  $\sigma$  es estimada mediante la desviación típica muestral  $S_{n-1}$ . El T estadístico se ajusta apropiadamente al modelo de distribución de probabilidad t de student cuando la población muestreada es normal. Con el programa SPSS se puede realizar la prueba T para dos muestras donde se contrastan hipótesis referidas a la diferencia entre dos medias independientes o relacionadas según el caso.

**5.2.4 ANOVA:** El análisis de varianza ANOVA de un factor sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. A la variable categórica que define los grupos que se desean compararse se le llama variable independiente o factor y a la variable cuantitativa en la que desea comparar los grupos se le llama variable dependiente.

La hipótesis que se pone a prueba en el ANOVA de un factor es que las medias poblacionales de la variable dependiente en cada nivel de la variable independiente son iguales. Si las medias poblacionales son iguales significa que los grupos no difieren en la variable dependiente y que, en consecuencia el factor es independiente de la variable dependiente.

**5.2.5 Prueba de Duncan:** Al rechazar la hipótesis del ANOVA, se sabe que las medias poblacionales comparadas no son iguales, pero no donde se encuentran las diferencias únicamente permite comparar. Para saber qué media difiere de qué otra se utiliza la prueba del rango múltiple de Duncan, método de

comparación por pasos basado en la distribución del rango estudentizado. Controla la tasa de error al efectuar varios contrastes utilizando las mismas medias.

**5.2.6 Estadístico de Levene:** Uno de los pasos previos a la comprobación de si existen diferencias entre las medias de varias muestras es determinar si las varianzas en tales muestras son iguales (es decir, si se cumple la condición de homogeneidad de varianzas o homoscedasticidad)<sup>[40]</sup>

### **5.3 EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA POR PARTE DE CALS (Control Analítico de Laboratorios de Suelos):**

El programa CALS de la SCCS opera un sistema de gestión de la calidad en las determinaciones analíticas de suelos y tejidos vegetales. Mediante la comparación metodológica, sistemática y estadística de resultados de los análisis obtenidos bajo los parámetros estándar. Generando la confianza en la calidad de análisis por parte del usuario.

Esta entidad proporciona a los laboratorios de suelos afiliados al programa CALS dos remesas por año consistentes en muestras de suelo previamente analizadas en el laboratorio del Instituto geográfico Agustín Codazzi (IGAC) en Bogotá, normalmente cada envío consta de siete muestras las cuales llegan al laboratorio de la SDAM selladas y cada muestra está rotulada con un número o letra para cuestiones de registro.

Los laboratorios afiliados a esta entidad deben realizar a cada muestra patrón cada uno de los análisis de rutina que se realiza a una muestra de suelo incluyendo la determinación de materia orgánica.

Una vez realizado el análisis, debe esperarse los resultados donde se evidencia el desempeño del laboratorio en cada una de las determinaciones y de esta forma hacer una evaluación.

#### **5.3.1 Criterios estadísticos utilizados por CALS:**

Se fundamentan en el programa utilizado en el Instituto Agronómico de Campinas Brasil, el cual se utiliza para evaluar la exactitud y la precisión de los resultados.

La exactitud: se define como la proximidad al valor “verdadero”, considerado como el valor promedio de los resultados de todos los laboratorios participantes, que aquí denominaremos valor de consenso, el cual permanece dentro de un intervalo de confianza calculado mediante la eliminación de valores discrepantes. A medida que aumenta la diferencia entre el valor encontrado por el laboratorio y el valor de consenso, para un determinado parámetro, los resultados del análisis estadístico

se reportarán con un número creciente de asteriscos (\*, \*\*, \*\*\*) es decir, a medida que aumenta el número de asteriscos aumenta el grado de inexactitud de los resultados.

La precisión: se refiere a la reproducibilidad de los resultados de cada laboratorio. Se obtiene mediante el valor del coeficiente de variación (C.V) correspondiente a los resultados de la muestra que se envía junto con tres repeticiones adicionales (A, B, C). Para la interpretación de los resultados de precisión se han establecido cuatro niveles, los cuales se utilizan en el reporte de resultados de acuerdo a la Tabla 1. <sup>[41]</sup>

**Tabla 1. Niveles de precisión adoptados por CALS**

<b>NIVEL DE PRECISIÓN</b>	<b>%C.V.</b>
ALTA	Menor o igual a 5
MEDIA	Mayor a 5 y menor a 15
BAJA	Mayor o igual a 15 y menor de 25
MUY BAJA	Mayor o igual a 25

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Equipos, Materiales, Reactivos y Soluciones:**

#### **6.1.1 EQUIPOS**

- Espectrofotómetro uv/vis Lambda 1 (PERKIN ELMER)
- Agitador mecánico (YANKEE ROTATOR)
- Horno de secado (BINDER)
- Balanza (METTLER P1210)

#### **6.1.2 MATERIALES**

- Tamiz malla 2mm
- Tamiz malla No.30
- Pipetas aforadas de 5 ,10 y 20 mL (Brand)
- Balones aforados de 100 mL (Brand)
- Erlenmeyers de 250 y 500 mL (Pyrex)
- Balón de 100 mL(SCHOOTT)

- Desecador (Pyrex)
- Buretas de 10 y 25 mL con reservorio (Brand)
- Beakers de 250 y 150 mL (SCHOTT)
- Probetas de 20 y 100 mL (NALGENE)
- Láminas de asbesto
- Gotero
- Varilla de vidrio
- Vidrio reloj

### **6.1.3 REACTIVOS**

- Dicromato de potasio R.A (99.9% de pureza) (Merck)
- Sacarosa R.A (Merck)
- Agua destilada
- Ácido sulfúrico (95-97% de pureza) (Merck)
- Ácido fosfórico (85% de pureza) (Merck)
- Ferroína (Merck)

### **6.1.4 Soluciones patrón y soluciones de trabajo:**

Se utilizó una solución patrón al 5% de Sacarosa R.A. y soluciones de trabajo de 2,10 mgC, 4,21mgC, 6,31mgC, 8,41mgC, 10,51mgC, 12,62 mgC, 14,72 mgC.

Se preparó soluciones de Dicromato de Potasio 1N, Sulfato ferroso 0.1 N, ferroína 0,025 M. Todas estas soluciones se prepararon el mismo día que se realizó los análisis.

### **6.2 Ubicación geográfica de las muestras de suelo analizadas:**

Se analizaron muestras recepcionadas en el laboratorio de suelos de la Secretaría de Desarrollo Agropecuario y Minero procedentes de dos diferentes Departamentos Cauca y Huila.

#### **6.2.1 Caracterización fisicoquímica de los suelos analizados:**

A estas muestras se les realizó además de la determinación de materia orgánica por titulación y colorimetría el análisis fisicoquímico de rutina que se realiza a cada muestra en dicho laboratorio (pH, aluminio intercambiable, cenizas volcánicas, textura, elementos mayores, elementos menores y fósforo).

### 6.3 CALIBRACIÓN DEL EQUIPO:



**Figura 4.** Equipo Perkin Elmer Lambda 1, ubicado en el laboratorio de Suelos del SDAM.

El sistema instrumental empleado consistió en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 1 Figura 4, ubicado en el laboratorio de Suelos de la Secretaría de Desarrollo Agropecuario y Minero del Cauca.

Para generar un diagnóstico bajo qué condiciones se encontraba el equipo antes de empezar la validación del método colorimétrico, se decidió preparar una curva con una solución de Dicromato de Potasio en KOH 0.06M en concentraciones de 4 hasta 32 ppm con valores de absorbancia conocidos, este procedimiento fue validado e implementado en el laboratorio de la Universidad del Cauca.

**6.3.1 Linealidad del equipo:** Se prepararon cinco curvas de calibración con siete niveles de concentración. La evaluación de la linealidad se hizo tomando las cinco curvas de calibración preparadas y se midió la absorbancia, se sacó un promedio, desviación y % C.V. de los datos obtenidos.

Es de esperarse que se presente linealidad, dónde la pendiente es significativamente diferente de cero, el intercepto sea significativamente igual a cero y que los porcentajes de recuperación presenten uniformidad para poder sacar un promedio.

**6.3.2 Prueba de normalidad de Shapiro Wilk:** Se tiene en cuenta los porcentajes de recuperación por cada nivel de concentración, donde se analiza la significancia.

**6.3.3 ANOVA:** Se realiza para observar la significancia y aceptar la hipótesis nula o la alternativa. Hay o no diferencia significativa entre las concentraciones de los niveles de la curva.

**6.3.4 Prueba de Duncan:** En este caso se analiza los porcentajes de recuperación; si hay uniformidad entre los porcentajes de recuperación y si es así sacar un promedio.

## 6.4 VALIDACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL

**6.4.1 Barrido espectral ( $\lambda$  máx.):** La longitud de onda empleada fue de 585 nm, obtenida como máxima absorbancia de un barrido previo entre 450 y 900 nm a una solución patrón de sacarosa de 10 mg/mL.

**6.4.2 Rango de trabajo:** Para obtener el intervalo óptimo de concentraciones primero se construyó la curva de Ringbom. Los datos se obtuvieron preparando una serie de soluciones patrón del analito, se midieron los valores de absorbancia correspondientes a la longitud de onda analítica escogida. La parte lineal de esta gráfica permitió obtener el intervalo de concentraciones óptimo o el intervalo que presentó relación lineal entre absorbancia y concentración.

**6.4.3 Linealidad:** Se prepararon cinco curvas de calibración con siete niveles de concentración de sacarosa, se midió una curva por día.

La evaluación estadística se inicia con prueba de normalidad de Shapiro Wilk, seguido de análisis de varianza ANOVA y prueba de Duncan para mirar entre que niveles existen diferencias. También se realiza coeficiente de correlación de Pearson.

Se calcularon los valores para la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación y sus correspondientes desviaciones estándar.

**6.4.4 Precisión:** Se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia.

**6.4.5 Repetibilidad:** Se prepararon tres curvas de calibración con siete niveles de concentración y se realizó la lectura el mismo día, bajo las mismas condiciones. Los resultados se interpolan en las respectivas curvas. Se evaluó por medio del %C.V por nivel de concentración.

**6.4.6 Reproducibilidad:** Para el ensayo de precisión intermedia se prepararon 5 curvas de calibración durante 5 días diferentes, se leyó una curva de calibración por día y los resultados se interpolan. Se determinaron los valores de concentración. El tratamiento estadístico realizado es el mismo de repetibilidad. [42]

**6.4.7 Límites críticos:** El LOD Y LOQ se determinaron teóricamente aplicando el método sugerido por la IUPAC. Se prepararon 3 curvas de calibración las cuales se analizaron el mismo día, bajo las mismas condiciones en el espectrofotómetro. [43]

Seguidamente, se calculó mediante el método de mínimos cuadrados las ecuación de las líneas de tendencia en cada curva, obteniendo de esta forma los interceptos y las pendientes para cada una de las tres curvas de calibración, con estos datos se determinó la desviación estándar de los interceptos ( $S_{\text{interceptos}}$ ) y el promedio de las pendientes ( $m_{\text{prom}}$ ). Finalmente se aplicaron las ecuaciones 5 y 6 para

establecer teóricamente los valores para el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ).<sup>[44]</sup>

## **6.5 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA**

Se utilizaron tres muestras de suelos provenientes del Departamento del Cauca y una del Departamento del Huila, las cuales se sometieron a la metodología descrita anteriormente. Cada una de las muestras se trabaja por triplicado. Las especificaciones geográficas de cada muestra se presentan más adelante. Se evaluaron parámetros como linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, incertidumbre de precisión, incertidumbre combinada y expandida (Equipos, reactivos y materiales). Para la evaluación estadística de estos parámetros se empleó el software estadístico SPSS (Versión 11.5).

**6.5.1 Linealidad:** Se prepararon 5 curvas de calibración con los siete niveles de concentración obtenidos en la validación instrumental, durante 5 días diferentes, una curva de calibración por día.

**6.5.2 Precisión:** La precisión de la metodología se evaluó en términos de reproducibilidad, se prepararon tres curvas de calibración, una por día en donde se interpolaron los valores de las absorbancias obtenidas de cada una de las muestras. De cada muestra se hizo tres repeticiones.

**6.5.3 Incertidumbre de precisión:** Se evalúa en términos de reproducibilidad para abarcar el mayor número de variaciones, se realiza el cálculo con los %C.V. y el número de mediciones totales.

**6.5.4 Exactitud:** Se evaluó como Porcentaje de Recuperación (%R); con los resultados obtenidos de repetibilidad y reproducibilidad se calcularon los %R por nivel de concentración.

Con los resultados de reproducibilidad se determinó la prueba T, lo cual permite calcular el %R para metodología.

**6.5.5 Límite de detección y de cuantificación:** La evaluación se realizó mediante el método sugerido por la IUPAC. Se prepararon 3 curvas de calibración las cuales se analizaron el mismo día, bajo las mismas condiciones.

La concentración obtenida en mgC se multiplicó por tres y por diez veces para el cálculo del límite de LOD y LOQ instrumentales.

**6.5.6. Sesgo:** En este caso se realiza el cálculo del porcentaje de error sistemático tomando como referencia los resultados de las pruebas realizadas interlaboratorios con CALS.

**6.5.7 Pruebas Interlaboratorios e intralaboratorios:** En el caso de la prueba interlaboratorio se realizó la determinación de MO a las tres muestras provenientes de los Departamentos del Cauca y Huila, en las instalaciones de los laboratorios de la SDAM y de Agroquímica de la Universidad del Cauca. Además se realizó la evaluación por parte del programa CALS, en dónde los resultados son analizados.

Esta herramienta es de alta relevancia para el mantenimiento y aseguramiento de la calidad de los resultados de la metodología. En el caso de la prueba Intralaboratorios se determinó la MO de las tres muestras provenientes de los Departamentos de Cauca y Huila, utilizando la metodología colorimétrica que se desea implementar. Esta prueba la realizó un analista1 y un analista 2 para realizar las comparaciones pertinentes, en el laboratorio de la SDAM siguiendo el mismo procedimiento.

## **6.6 ELABORACIÓN DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO (POE)**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el proceso de validación de la metodología se realiza un POE que describe en forma detallada todas las actividades llevadas a cabo en el laboratorio de suelos de la SDAM para la determinación de materia orgánica. Además se incluye el procedimiento correspondiente al manejo de los resultados.

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.1 CALIBRACIÓN DEL EQUIPO:**

Para verificar el estado del Perkin Elmer lambda 1, se utilizó una solución de Dicromato de Potasio en KOH 0,06 M, la lectura se hizo a 373nm, preparando una curva de calibración donde los valores de absorbancia teóricos son conocidos y se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Curva de calibración con concentraciones y valores de absorbancia conocidos.**

<b>Concentración Dicromato de Potasio (ppm)</b>	<b>Absorbancia teórica</b>
<b>4</b>	0,12-0,13
<b>8</b>	0,25-0,26
<b>16</b>	0,50-0,51
<b>24</b>	0,74-0,75
<b>32</b>	0,99-0,999

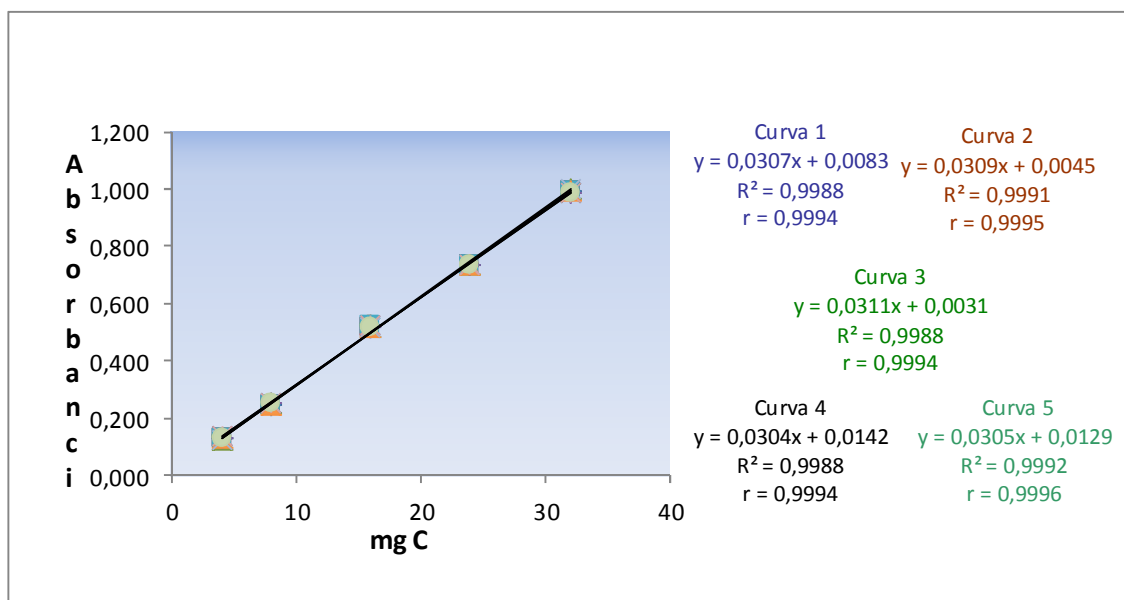
Se preparó cinco curvas de calibración con cinco niveles de concentración diferentes (las lecturas de las cinco curvas se realizaron el mismo día), sus resultados se presentan en la Tabla 3 (Anexo B).



**Tabla 3. Calibración del equipo Perkin Elmer Lambda 1.**

Concentración (ppm)	Absorbancia Curva 1	Absorbancia Curva 2	Absorbancia Curva 3	Absorbancia Curva 4	Absorbancia Curva 5
4	0.116	0,117	0,114	0,118	0,120
8	0,246	0,244	0.250	0,249	0,251
16	0,521	0,515	0,52	0,521	0,518
24	0,736	0,735	0,735	0,735	0,738
32	0.991	0,994	0,998	0,986	0,989

**7.1.1 Linealidad:** La tendencia de los datos se evaluó a través de un gráfico relacionando la absorbancia respecto a la concentración en ppm de dicromato de potasio, la gráfica obtenida se muestra en la Figura 5, donde se observa la tendencia lineal de los resultados, por lo que se aplicó el método de mínimos cuadrados para hallar una ecuación lineal.



**Figura 5.** Linealidad calibración del equipo Perkin Elmer Lambda 1

Se observa que los coeficientes de correlación  $r$  para cada una de las cinco curvas analizadas son altos; cercanos a 1, están comprendidos entre 0,9994 y 0,9996 indicando una correlación lineal entre la absorbancia y la concentración del dicromato.

Comparando los datos obtenidos para los valores de absorbancia correspondientes a los 5 niveles de concentración reportados en la Tabla 3 con los valores teóricos reportados en la Tabla 2, se encuentran los porcentajes de recuperación en los valores de absorbancia para cada nivel, los cuales se describen en la Tabla 4

**Tabla 4. Resultados % R para la evaluación de calibración del equipo.**

<b>Nivel</b>	<b>%R</b>	<b>Promedio</b>	<b>S</b>	<b>% C.V</b>
1	98,25 100,00 101,00 97,25 97,25	98,75	1,69	1,71
2	98,75 99,00 100,63 99,25 99,88	99,5	0,76	0,76
3	99,94 99,88 99,94 99,88 99,99	99,93	0,05	0,05
4	99,79 99,71 99,75 99,92 99,17	99,67	0,29	0,29
5	99,53 100,09 100,06 99,59 99,84	99,82	0,26	0,26
<b>Promedio total</b>		<b>99,53</b>	<b>0,47</b>	<b>0,47</b>

Se realiza la prueba de Shapiro Wilk teniendo en cuenta la absorbancia y los porcentajes de recuperación en función del nivel de concentración para determinar si los datos presentan una distribución normal, adoptando como hipótesis nula la normalidad de los datos. (Tabla 5).

**Tabla 5. Prueba de Shapiro Wilk para la calibración del equipo**

	Nivel de Concentración	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Significancia
<b>Absorbancia</b>	1	0,999	5	1,000
	2	0,885	5	0,332
	3	0,854	5	0,207
	4	0,735	5	0,021
	5	0,990	5	0,978
<b>Porcentaje de recuperación</b>	1	0,876	5	0,290
	2	0,931	5	0,601
	3	0,880	5	0,309
	4	0,801	5	0,082
	5	0,880	5	0,311

De la Tabla 5 se deduce que los datos se ajustan a la normalidad, por lo tanto se puede aplicar pruebas paramétricas para el respectivo análisis estadístico.

Se realiza análisis de varianza ANOVA, para saber si existe diferencia significativa entre los valores de absorbancia y porcentajes de recuperación de los diferentes niveles de concentración (Tabla 6).

### 7.1.2 ANOVA:

**Tabla 6. ANOVA repetibilidad calibración del equipo**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Absorbancia</b>	Inter-grupos	2,530	4	0,633	71550,287	0,000
	Intra-grupos	0,000	20	0,000		
	Total	2,530	24			
<b>Porcentaje de recuperación</b>	Inter-grupos	4,351	4	1,088	1,523	0,233
	Intra-grupos	14,283	20	0,714		
	Total	18,634	24			

Debido a que en la Tabla 6 se observa que la significancia es menor a 0,05 para la absorbancia se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa que para este caso es: “Existen diferencias significativas entre los valores de absorbancia correspondientes a los cinco niveles de concentración” lo que era de esperarse ya que dichos niveles son distintos.

Para el caso de los porcentajes de recuperación la significancia es mayor a 0,05 aceptando la hipótesis nula: “No existen diferencias significativas entre los valores de los porcentajes de recuperación”.

Para saber entre cuáles niveles de concentración existe diferencia significativa se aplica la prueba de Duncan (Tabla 7).

**Tabla 7. Prueba de Duncan teniendo en cuenta la absorbancia**

Duncan						
Nivel de Concentración	N	Subconjunto para alfa =0.05				
		1	2	3	4	5
1	5	0,11700				
2	5		0,24680			
3	5			0,51900		
4	5				0,73580	
5	5					0,99160
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

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

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

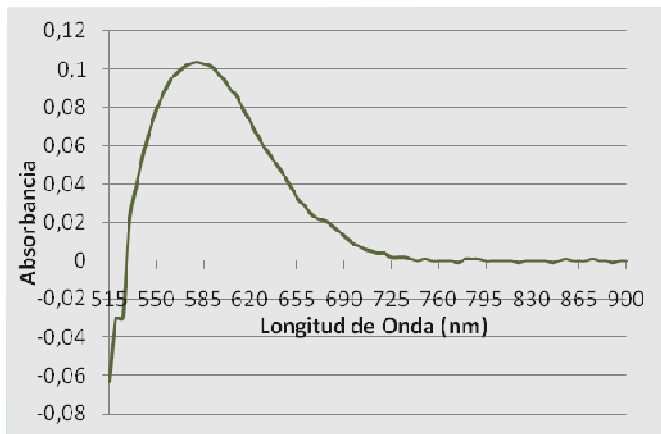
La prueba de Duncan muestra que existe diferencia significativa entre los valores de absorbancia de todos los niveles de concentración siendo significativamente superior el correspondiente al nivel 5 como era de esperarse porque es el mayor nivel. Como ya se mencionó en la Tabla 6 no existe diferencia significativa entre los porcentajes de recuperación correspondientes a cada uno de los cinco niveles, (sig = 0,233) permitiendo así obtener un valor promedio de porcentaje de recuperación equivalente a un 99.53% con una desviación estándar  $s = 0.47$  y un porcentaje de coeficiente de variación (%C.V.) del 0.47 % indicando una alta precisión en la reproducibilidad del equipo, deduciéndose de esta manera que el equipo se encuentra en óptimas condiciones de trabajo.

## 7.2 VALIDACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL

La validación del sistema instrumental del espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 1, ubicado en el laboratorio de suelos de la SDAM, para la metodología de determinación de MOS, se llevó a cabo con curvas de calibración de sacarosa en agua destilada. Se evaluó la linealidad, precisión en términos de precisión intermedia y límites críticos.

### 7.2.1 Barrido espectral y selección de $\lambda$ de máxima absorción:

Inicialmente se hizo un barrido previo entre 450 y 900 nm con una solución patrón de sacarosa de 10 mg/mL. Obteniendo el espectro ilustrado en la Figura 6, en donde se observa que la máxima longitud de onda que correspondió a 585 nm.



**Figura 6:** Espectro de absorción de una solución patrón de sacarosa (10 mg/mL).

### 7.2.2 Rango de trabajo:

Una vez evaluada la longitud de máxima absorción se encuentra el rango en el cual se va a trabajar la metodología; se realiza una curva Ringbom con las concentraciones de patrones de sacarosa que aparecen en la Tabla 8.

**Tabla 8. Soluciones patrón de sacarosa**

Solución patrón Sacarosa (mL)	Concentración (mg C/mL)	mg C
1	0,21	0,42
2	0,42	0,84
4	0,84	1,68
5	1,05	2,10
10	2,10	4,21
15	3,15	6,31
20	4,20	8,41
25	5,25	10,51
30	6,31	12,62
35	7,36	14,72
40	8,40	16,80
50	10,50	21,00
60	12,60	25,20
70	14,70	29,40
80	16,80	33,60
90	18,90	37,80
100	21,00	42,00

Con estos datos se construye la curva de la Figura 6, para poder obtener el rango lineal de trabajo.

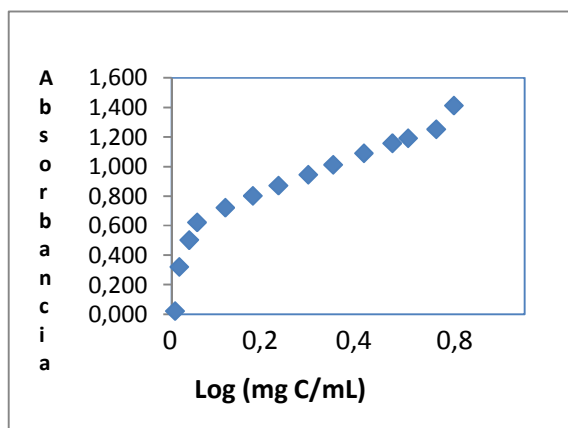


Figura 7. Curva rango de trabajo

En la Figura 7 se muestra la curva de trabajo, encontrándose un intervalo lineal entre valores correspondientes a 2,10 y 14,72 mgC. Este es el rango en el cual se trabajará el sistema instrumental.

### 7.2.3 Preparación de la curva de calibración:

Una vez seleccionado el rango lineal, La curva de calibración se preparó a partir de una solución patrón de sacarosa al 5 % (2.1%C) se preparó las siguientes soluciones patrón en balones aforados de 100 mL, empleando para cada concentración los volúmenes de solución patrón de sacarosa especificados en la Tabla 9.

Tabla 9. Preparación de la curva de calibración de sacarosa.

NIVEL DE CONCENTRACIÓN	Volumen de Solución patrón (mL)	Concentración (mg C/mL Solución)	mg C
1	5	1,05	2,10
2	10	2,10	4,21
3	15	3,15	6,31
4	20	4,20	8,41
5	25	5,25	10,51
6	30	6,31	12,62
7	35	7,36	14,72

Se adicionó una alícuota de 2 mL de cada una de las soluciones de la curva de calibración a erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente se agregó 5 mL de dicromato de potasio 1 N y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, se agitó por 1 min. y se dejó en reposo durante 12 horas, al final de las cuales se tomó una alícuota de los sobrenadantes y midió la absorbancia a 585 nm. Con los resultados obtenidos se

realizó una gráfica por día relacionando los valores de absorbancia en función de los miligramos de carbono de cada solución (Tabla 10 y Figura 8).



**Figura 8.** Curvas de calibración Sacarosa, Dicromato de Potasio, Agua destilada y Ácido sulfúrico.

#### 7.2.4 Linealidad:

Se evaluó a 7 niveles de concentración durante 5 días diferentes. Se preparó una curva de calibración por día, la cual se sometió al método descrito en la metodología Figura 9. Los resultados se presentan en la Tabla 10 (Anexo C).



**Figura 9.** Curva de calibración diaria con siete niveles de concentración

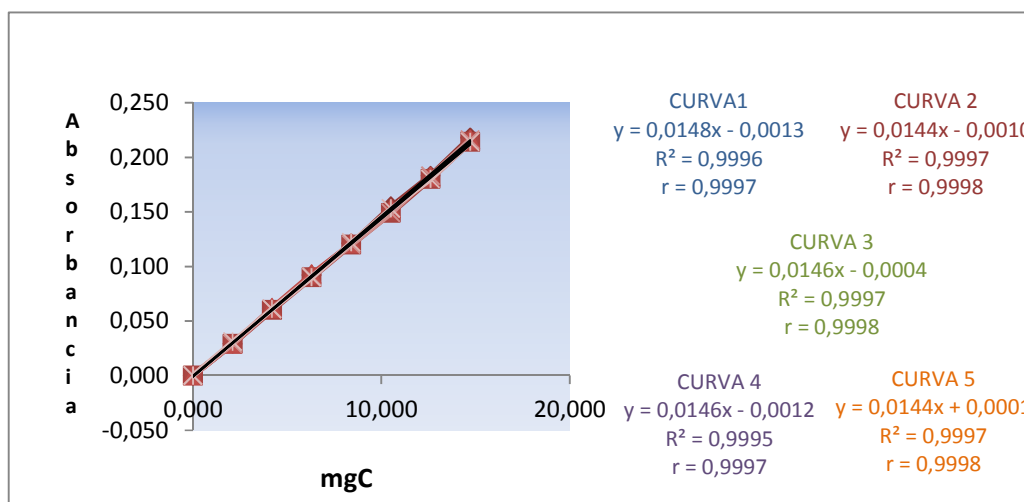
**Tabla 10. Resultados para la evaluación de la linealidad instrumental**

mg C	Absorbancia día 1	Absorbancia día 2	Absorbancia día 3	Absorbancia día 4	Absorbancia día 5
2,10	0,029	0,029	0,029	0,029	0,031
4,21	0,061	0,060	0,062	0,061	0,061
6,31	0,092	0,090	0,093	0,091	0,090
8,41	0,121	0,120	0,121	0,120	0,122
10,51	0,155	0,149	0,153	0,149	0,153
12,62	0,183	0,180	0,182	0,183	0,180
14,72	0,218	0,214	0,216	0,216	0,214

En la Figura 10 se observa la evaluación de la tendencia lineal de los datos relacionando la absorbancia respecto a los miligramos de carbono, se evidenció la

tendencia lineal de los resultados, por lo que se aplicó el método de mínimos cuadrados para hallar una ecuación lineal que relaciona la cantidad de carbono orgánico con la absorbancia.

Se observa en las cinco curvas una tendencia altamente lineal manifestada en los altos valores de coeficiente de correlación  $r$  están comprendidos entre 0,9997 y 0,9998.



**Figura 10.** Evaluación de Linealidad Instrumental

Para evaluar estadísticamente la linealidad instrumental, inicialmente se someten los resultados a una prueba de normalidad, reportada en la Tabla 11 y 12 en donde se evalúa la absorbancia en función de los mgC y la absorbancia en función del día de la prueba encontrando que la mayoría de los resultados se ajustan a la normalidad y por lo tanto se pueden aplicar pruebas paramétricas para su correspondiente análisis estadístico.

**Tabla 11. Pruebas de normalidad para los resultados de linealidad instrumental de absorbancia en función de mgC.**

	mg de C	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
<b>Absorbancia</b>	2,10	0,771	5	0,046
	4,21	0,987	5	0,967
	6,31	0,961	5	0,814
	8,41	0,684	5	0,006
	10,51	0,735	5	0,021
	12,62	0,957	5	0,787
	14,72	0,859	5	0,223



**Tabla 12. Pruebas de normalidad para los resultados de linealidad instrumental de absorbancia en función del día.**

	Día	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Absorbancia	1	0,983	7	0,973
	2	0,979	7	0,955
	3	0,977	7	0,942
	4	0,978	7	0,951
	5	0,978	7	0,950

\* Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a Corrección de la significación de Lilliefors

Aplicando ANOVA a los resultados de linealidad instrumental se obtienen los resultados en la Tabla 13.

**Tabla 13. ANOVA para linealidad instrumental considerando como factor los mg de C.**

Absorbancia					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,130	6	0,022	8950,776	0,000
Intra-grupos	0,000	28	0,000		
Total	0,130	34			

En la tabla anterior se aprecia que existe diferencia altamente significativa (Sig=0,000) entre los valores de absorbancia correspondientes a los diferentes niveles de mgC.

La Prueba de Duncan permite establecer entre cuáles valores existe diferencia significativa (Tabla 14).

**Tabla 14. Prueba de Duncan para absorbancia en función de los mgC.**

Duncan								
mg de C	N	Subconjunto para alfa =0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
2,10	5	0,03140						
4,21	5		0,06200					
6,31	5			0,09340				
8,41	5				0,12320			
10,51	5					0,15380		
12,62	5						0,18340	
14,72	5							0,21520
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

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

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

En la Tabla 14 se observa como era de esperarse que todos los valores de absorbancia son significativamente diferentes entre sí, siendo el nivel que corresponde a 14,72 mgC el que presenta un valor de absorbancia significativamente superior al de los demás.

Si se considera como variable independiente o factor el día; la prueba de ANOVA reportada en la Tabla 15 muestra que no existe diferencia significativa entre los valores de absorbancia de cada nivel de C en los diferentes días de la evaluación, indicando la reproducibilidad del método.

**Tabla 15. ANOVA para los resultados de linealidad instrumental considerando como factor el día de evaluación.**

Absorbancia					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,000	4	0,000	0,001	1,000
Intra-grupos	0,130	30	0,004		
Total	0,130	34			

Seguidamente para observar si hay homogeneidad de varianzas se realiza la prueba estadística de Levene en función de los mgC y el día, los resultados obtenidos se visualizan en las Tablas 16 y 17.

**Tabla 16. Prueba de homogeneidad de varianzas de absorbancia en función de mg de C**

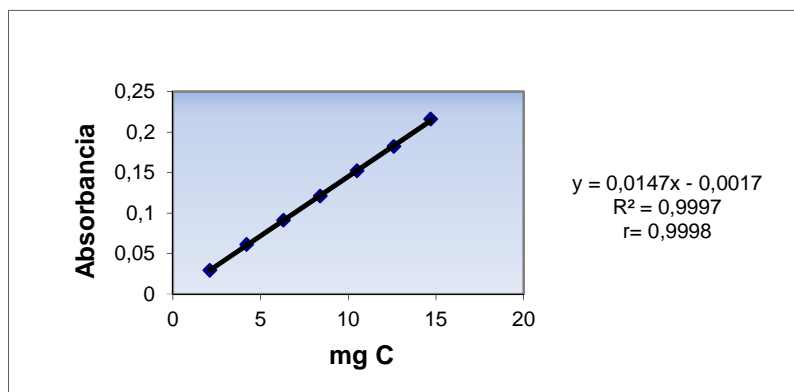
Absorbancia			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,297	6	28	0,291

**Tabla 17. Prueba de homogeneidad de varianzas de absorbancia en función del día.**

Absorbancia			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0,001	4	30	1,000

El análisis estadístico realizado anteriormente permite obtener una curva de calibración promedio ya que las pruebas de Levene (Tablas 16 y 17) indican homogeneidad de varianzas por presentar significancia mayor a 0,05. Por lo tanto

la curva de calibración promedio para la evaluación de linealidad se observa en la Figura 11.



**Figura 11.** Curva de calibración promedio de sacarosa

Ahora, mediante análisis de varianza (ANOVA) se evaluó estadísticamente la regresión en la curva de calibración promedio de sacarosa, los resultados se muestran en la Tabla 18.

Para evaluar la regresión en la curva de calibración promedio de sacarosa se tiene hipótesis nula: “No hay regresión significativa en la curva de calibración ( $R^2 = 0$ ), y como hipótesis alternativa “Hay regresión significativa en la curva de calibración ( $R^2 \neq 0$ )”. Como se observa en la Tabla 18, la significancia para la regresión es menor de 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, concluyendo que existe regresión significativa en la curva de calibración promedio de sacarosa.

**Tabla 18. Análisis de varianza para evaluar la regresión lineal en la curva de calibración promedio de sacarosa.**

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	0,130	1	0,130	56976,970	0,000
	Residual	0,000	33	0,000		
	Total	0,130	34			

a Variables predictoras: (Constante), NIVEL DE CONCENTRACIÓN

b Variable dependiente: ABSORBANCIA

Posteriormente; de las curvas de calibración anteriores para linealidad (Tabla 10) se calcularon los valores promedio para la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación y sus correspondientes desviaciones estándar, obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 19.

**Tabla 19. Evaluación de la linealidad instrumental**

PARÁMETRO	SÍMBOLO	VALOR
Coefficiente de correlación	r	0,9998
Pendiente	b	0,0146
Intercepto	a	0,0017
Desviación estándar para el intercepto	Sa	0,0006
Desviación estándar para la pendiente	Sb	0,0002

El coeficiente de correlación se evaluó estadísticamente teniendo como hipótesis nula: “No existe correlación entre x e y”. Como se observa en la Tabla 20 la prueba es significativa (Sig. 0,000), por lo que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existe correlación significativa entre la cantidad de carbono (mg de C) y la respuesta brindada por el equipo (absorbancia).

**Tabla 20. Resultados obtenidos evaluación estadística del coeficiente de correlación de Pearson.**

		ABSORBANCIA	NIVELES DE CONCENTRACIÓN
ABSORBANCIA	Correlación de Pearson	1	1,000(**)
	Sig. (bilateral)	.	0,000
	N	35	35
NIVELES DE CONCENTRACIÓN	Correlación de Pearson	1,000(**)	1
	Sig. (bilateral)	0,000	.
	N	35	35

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

Para la evaluar estadísticamente la pendiente y el intercepto se tienen las siguientes hipótesis:

- Para la pendiente se tiene como  $H_0$ : “b no es significativamente diferente de cero”, la cual se rechaza cuando la prueba estadística es significativa, es decir cuando sig. < 0,05.
- Para el intercepto se tiene como  $H_0$ : “a no es significativamente diferente de cero”, la cual se rechaza cuando la prueba estadística es significativa, es decir cuando sig. < 0,05.

También se analiza el comportamiento estadísticamente hablando de la pendiente y el intercepto.

**Tabla 21. Resultados obtenidos en la evaluación estadística de la pendiente y el intercepto.**

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
1	Intercepto	0,001	0,001		1,949	0,060	0,000	0,002
	Pendiente	0,031	0,000	1,000	238,698	0,000	0,030	0,031

Como se observa en la Tabla 21, la significancia estadística para la pendiente es inferior a 0,05, por lo que se debe rechazar la hipótesis nula, y concluir que la pendiente es significativamente diferente de cero.

Mientras que el valor de la significancia para el intercepto es superior a 0.05 permitiendo aceptar la hipótesis nula y concluyendo que el intercepto es igual a cero. Los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas anteriores (Tabla 10 hasta Tabla 21) para la evaluación de linealidad permiten concluir que el método instrumental empleado es lineal en el rango entre 2,10 mgC y 14,72 mgC, con un coeficiente de correlación equivalente a 0,9998.

### 7.2.5 Precisión: Repetibilidad y reproducibilidad

Para evaluar la precisión bajo condiciones de repetibilidad (el mismo día) y precisión intermedia (días diferentes) se realizó el siguiente procedimiento:

En condiciones de repetibilidad se prepararon tres curvas de calibración con siete niveles de concentración, las cuales se analizaron el mismo día bajo las mismas condiciones. Los resultados obtenidos de las concentraciones y absorbancia respectivas se presentan en la Tabla 22 (Anexo D).

**Tabla 22. Datos curvas de calibración bajo condiciones de repetibilidad**

mg de Carbono	Absorbancia Curva 1	Absorbancia Curva 2	Absorbancia Curva 3
2,1	0,029	0,031	0,030
4,21	0,060	0,062	0,063
6,31	0,090	0,092	0,092
8,41	0,118	0,122	0,123
10,51	0,152	0,152	0,152
12,62	0,183	0,181	0,182
14,72	0,209	0,211	0,210

Para el ensayo de precisión intermedia bajo condiciones de reproducibilidad, se prepararon cinco curvas de calibración durante cinco días diferentes, una curva de calibración por día, los resultados obtenidos de las concentraciones y absorbancia se presentan en la Tabla 23.

**Tabla 23. Curva de calibración bajo condiciones de reproducibilidad.**

mg de C	Absorbancia día 1	Absorbancia día 2	Absorbancia día 3	Absorbancia día 4	Absorbancia día 5
2,10	0,029	0,029	0,029	0,029	0,031
4,21	0,061	0,060	0,062	0,061	0,061
6,31	0,092	0,090	0,093	0,091	0,090
8,41	0,121	0,120	0,121	0,120	0,122
10,51	0,155	0,149	0,153	0,149	0,153
12,62	0,183	0,180	0,182	0,183	0,180
14,72	0,218	0,214	0,216	0,216	0,214

Para analizar el comportamiento de la metodología se calculó la desviación estándar y el % C.V por nivel de concentración bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, estos resultados se calcularon teniendo en cuenta los datos de las dos tablas anteriores (Tabla 22 y Tabla 23). Los resultados obtenidos para la precisión instrumental se presentan en la Tabla 24.

**Tabla 24. Precisión instrumental bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.**

NIVEL	REPETIBILIDAD		PRECISION INTERMEDIA	
	DES. EST	%CV	DES. EST	%CV
1	0,08	3,65	0,07	3,44
2	0,08	1,82	0,03	0,70
3	0,10	1,50	0,01	0,09
4	0,05	0,60	0,12	1,42
5	0,07	0,71	0,01	0,09
6	0,12	0,97	0,04	0,35
7	0,09	0,62	0,09	0,58

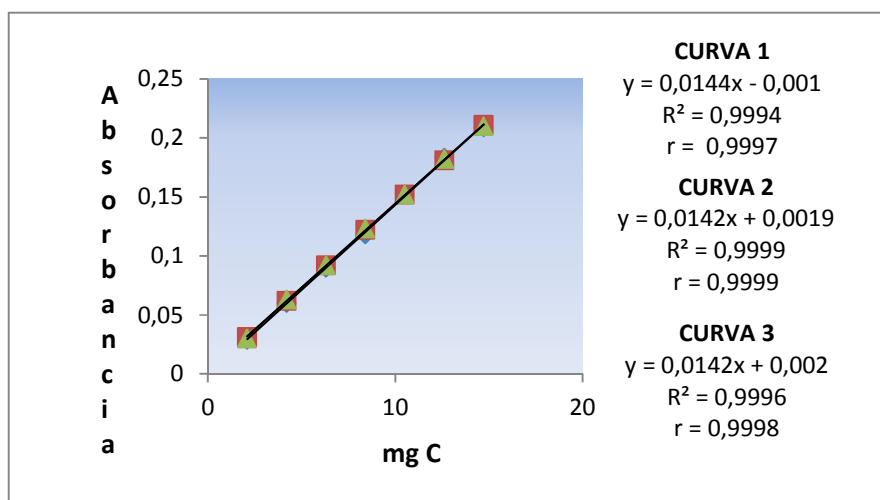
Como se visualiza en la Tabla 24, los % C.V son bajos inferiores al 5%, tanto para condiciones de repetibilidad como de precisión intermedia. Se destaca que el nivel más bajo correspondiente a 2.10mgC presenta mayor variabilidad en sus repeticiones, sin embargo su CV es bajo. Estos resultados muestran que la metodología tiene alta reproducibilidad en el rango comprendido entre 2.10 y 14.72 mg de C en las condiciones del laboratorio SDAM.

### 7.2.6 Límites Críticos:

Con base en la alta reproducibilidad de la metodología para la determinación colorimétrica del C se determinaron teóricamente los límites de detección y cuantificación de la siguiente manera:

Se prepararon tres curvas de calibración las cuales se analizaron el mismo día, bajo las mismas condiciones (Tabla 22).

Con los resultados obtenidos se elaboró un gráfico que relaciona la absorbancia en función de miligramos de carbono de cada una de las curvas trabajadas, las cuales se ilustran en la Figura 12.



**Figura 12.** Curvas de calibración para evaluación de los límites críticos

Seguidamente, se calculó mediante el método de mínimos cuadrados la ecuación de la línea de tendencia en cada curva, obteniendo de esta forma los interceptos y las pendientes para cada una de las tres curvas de calibración, con estos datos se determinó la desviación estándar de los interceptos ( $S_{interceptos}$ ) y el promedio de las pendientes ( $m_{prom}$ ).

Finalmente se aplicaron las ecuaciones 2 y 3 para establecer teóricamente los valores para el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), los resultados se muestran en la Tabla 25.

$$LOD = \frac{0,003}{0,0143} \quad LOD = 0,210$$

$$LOQ = \frac{0,01}{0,0143} \quad LOQ = 0,699$$

**Tabla 25: Cálculo del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ).**

Parámetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3	S estándar	m prom.	LOD (mg C)	LOQ (mg C)
Pendiente	0,0144	0,0142	0,0142	0,001	0,0143	0,210	0,699
Intercepto	-0,0010	0,0019	0,0020				

Los límites críticos determinados teóricamente se evaluaron en forma experimental preparando tres réplicas de una solución al nivel del LOD establecido teóricamente (0,210 mgC) (Tabla 26); para el LOQ se hizo 5 réplicas de una solución al nivel del LOQ calculado (0,699 mgC) (Tabla 27).

Estas soluciones se analizaron de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. Para la solución al LOD se determinó si el sistema instrumental brinda alguna respuesta generando las absorbancias presentadas en la Tabla 26.

**Tabla 26. Resultados para la determinación experimental de LOD.**

LOD (mgC)	No. réplica	Absorbancia
0,210	1	0,003
	2	0,003
	3	0,003

Como se observa en la Tabla 26 el sistema instrumental es lo suficientemente sensible para detectar carbono al LOD 0,21 mgC con una absorbancia de 0,003.

Con los resultados de las cinco réplicas mencionadas se halla la precisión y la exactitud al LOQ como se muestra en la Tabla 27.

**Tabla 27. Resultados para la determinación experimental de LOQ.**

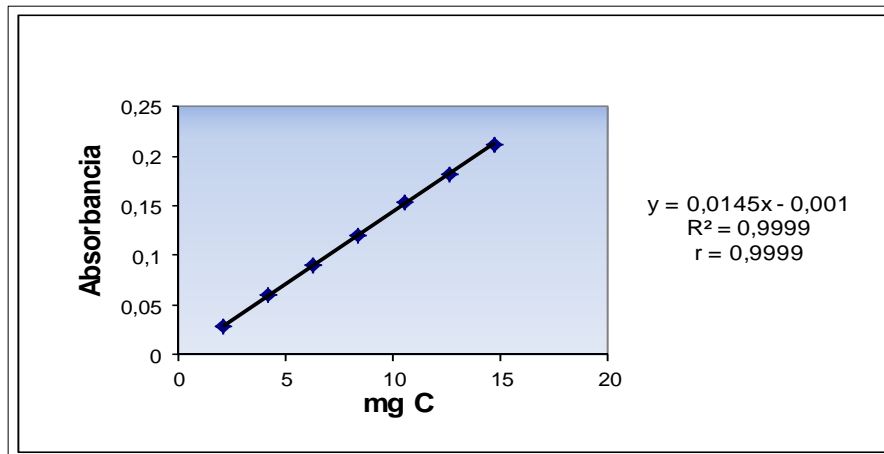
LOQ Teórico (mgC)	Absorbancia	LOQ Experimental	Promedio LOQ experimental	S	% C.V.
0,699	0,009	0,690	0,704	0,030	4,32
0,699	0,009	0,690			
0,699	0,009	0,690			
0,699	0,009	0,690			
0,699	0,010	0,758			

Se observa en la Tabla 27 que el LOQ preparado experimentalmente corresponde a 0.704 mg de C siendo la mínima cantidad que se puede cuantificar con este método en las condiciones del laboratorio, valor muy cercano al hallado



teóricamente (0.699), indicando que la metodología brinda exactitud y precisión adecuadas al LOQ con un %C.V. igual a 4,32.

Para el LOQ se promediaron las absorbancias obtenidas y se interpolaron en una curva de calibración preparada y analizada el mismo día (Figura 13).



**Figura 13.** Curva para la determinación experimental del LOD y LOQ.

Se observa que el coeficiente de correlación es 0,9999 presentando una alta linealidad en la curva.

### 6.3 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA:

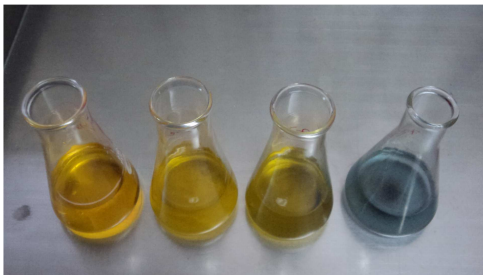
Para la validación de la metodología se utilizaron cuatro muestras de suelos, tres de ellas provenientes del Departamento del Cauca y una del Huila, las cuales se sometieron a la metodología descrita anteriormente para la validación instrumental.

Las especificaciones geográficas de cada muestra se presentan en la siguiente Tabla 28.

**Tabla 28. Especificaciones geográficas de los suelos analizados.**

Muestra	Ubicación geográfica (Departamento)	Tipo de cultivo instalado	Contenido de orgánico
1	Huila	Pino Ocarpa	Bajo
2	Cauca	Pastos	Medio
3	Cauca	Mejoramiento praderas	Alto
4	Cauca	Mejoramiento praderas	Alto

En la Figura 14 se observa las soluciones después del proceso de oxidación con dicromato de potasio y ácido sulfúrico.



**Figura 14.** Muestras analizadas para la validación de la metodología

Para la validación de la metodología se evaluaron los parámetros linealidad, precisión, exactitud, límites críticos e incertidumbre (incertidumbre de precisión, incertidumbre de los equipos, incertidumbre del material de vidrio, incertidumbre del material volumétrico, incertidumbre combinada y expandida). Para la evaluación estadística de estos parámetros se empleó el software estadístico SPSS (Versión 11.5.1).

### 7.3.1 Linealidad:

Correspondiente a la linealidad instrumental, por lo que se emplearon curvas de calibración de sacarosa en agua destilada para la cuantificación del carbono orgánico en las muestras de suelo (Tabla 10 y Figura 5).

### 7.3.2 Precisión y Exactitud:

Se prepararon cinco curvas de calibración durante cinco días diferentes, se leyó una curva de calibración por día. Además se determinó los % C.V. y %R por nivel de concentración en la curva de calibración, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 29.

**Tabla 29. Curvas para determinar precisión y exactitud de la metodología**

DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	S	PROMEDIO	%CV	% R
0,029	0,031	0,031	0,029	0,029	0,001	0,030	3,68	99,24
0,060	0,063	0,060	0,060	0,060	0,001	0,061	2,21	101,00
0,088	0,092	0,093	0,091	0,091	0,002	0,091	2,06	100,62
0,118	0,121	0,120	0,123	0,122	0,002	0,121	1,59	100,44
0,150	0,152	0,151	0,151	0,152	0,001	0,151	0,55	100,33
0,180	0,180	0,182	0,182	0,184	0,002	0,182	0,92	100,74
0,206	0,210	0,213	0,213	0,209	0,003	0,210	1,40	99,67

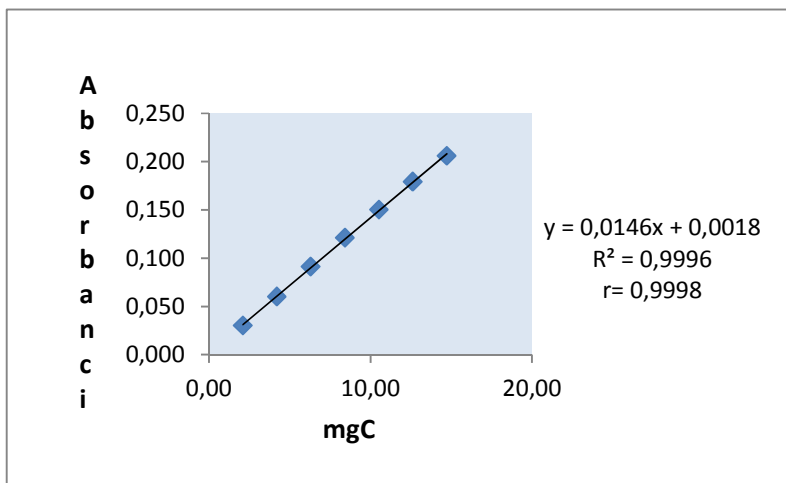
Los % C.V. obtenidos para los porcentajes de recuperación de cada nivel de concentración en los diferentes días son inferiores al 5 %, indicando que se puede obtener un valor promedio global para toda la metodología, estando en un rango del 99,24 al 101,00%. La prueba T para los % de recuperación de los diferentes niveles de concentración en los diferentes días se muestra en la Tabla 30, expresando que no existe diferencia significativa entre dichos porcentajes de recuperación. Con base en estos resultados se obtiene un porcentaje de

recuperación Promedio para todo el rango de la curva correspondiente al 100.12% muy cercano al valor ideal del 100%.

**Tabla 30. Prueba T diferentes niveles de concentración**

	Valor de prueba = 100					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
RECUPERACIÓN	1,238	6	0,262	0,2914	-0,2845	0,8673
NIVEL	-117,576	6	0,000	-96,000	-97,998	-94,002

Para la precisión de las cuatro muestras se realiza un análisis por triplicado realizando las lecturas el mismo día para cada muestra. Los valores de Absorbancia se interpolan en la curva de calibración promedio mostrada en la Figura 15 cuyo coeficiente de correlación  $r = 0,9998$ . Se realizó la corrección en el %  $C_{org}$  obtenido para cada muestra teniendo en cuenta el % R del método.



**Figura 15.** Curva de calibración para precisión de la metodología

Los valores de absorbancia y mgC obtenidos se registran en la Tabla 31.

**Tabla 31. Resultados de precisión de muestras de suelo por triplicado.**

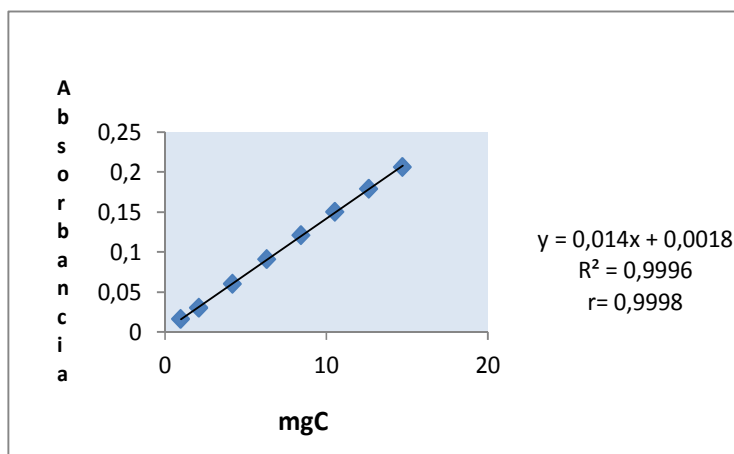
Muestra	Absorbancia	mgC Experimental	Promedio mgC	S	%C.V.
1	0,016	1,01	0,99	0,040	4,16
	0,016	1,01			
	0,015	0,94			
2	0,045	3,09	3,06	0,110	3,56
	0,043	2,94			
	0,046	3,16			
3	0,123	8,66	8,63	0,180	2,08
	0,125	8,80			
	0,120	8,44			
4	0,289				
	0,283				
	0,285				

En la Tabla 31, se aprecia que los valores de absorbancia de las muestras No. 2, y 3, están comprendidos en el rango de la curva de linealidad previamente establecida para esta metodología (0.031 y 0.215), indicando que el C orgánico de estas muestras si pueden determinarse con la metodología implementada.

Se observa una alta repetibilidad en el contenido de C de las réplicas de las dos muestras, con bajos coeficientes de variación y bajas desviaciones estándar, demostrando que se puede obtener un valor promedio de C para cada muestra.

Para la muestra 1 el valor de la absorbancia es inferior al valor más bajo del rango lineal, sin embargo, es superior al límite de cuantificación. Por esta razón su valor de absorbancia se interpola en la Figura 16 elaborada con un valor inferior al del rango lineal establecido, en dicha figura se aprecia que persiste la linealidad con un alto coeficiente de correlación. ( $r=0.9998$ ).

El valor del contenido de C para la muestra 1 corresponde entonces a un valor promedio de 0.99 mg de C, con un coeficiente de variación superior al de las otras muestra como era de esperarse, pero inferior al 5%, por tanto se acepta con una alta exactitud.



**Figura 16.** Curva promedio de linealidad con un nivel más bajo de mgC.

En cuanto a la muestra 4, presenta un valor de absorbancia superior al límite máximo de linealidad, por lo tanto no puede determinarse en las condiciones del método implementado.

Sin embargo, se decidió hacer una dilución previa a la lectura con un factor de 1a10, encontrando los valores de absorbancia de 0.030, 0.030 y 0.031 respectivamente, interpolando en la curva de la Figura 16, obteniéndose un valor promedio de 2,10 mg de C.

Se deduce que el % C.V. para las muestras analizadas son inferiores al 5%, lo cual indica la precisión de la metodología para el análisis de muestras de suelo por colorimetría para los diferentes valores de C expresados en mg C.

De acuerdo a referencia SCSS <sup>[41]</sup> los valores de MO de las muestras analizadas corresponden a los niveles de acuerdo al clima de su procedencia.

Los valores de MO correspondientes a la muestras de acuerdo al clima y altura sobre el nivel del mar se encuentran en 1,95%, 6,00 % y 16.04% de materia orgánica, se observan en la Tabla 32.

**Tabla 32. Porcentaje de materia orgánica de acuerdo al clima y altura sobre el nivel del mar.**

Muestra	Procedencia Clima	Altura	Promedio mgC	% CO	% MO	Interpretación
1	Cálido	Baja	1,01	1,13	1,95	Bajo (menor 2%)
2	Medio	Medio	3,02	3,48	6,00	Alto (Mayor 5%)
3	Medio	Medio	8,63	9,30	16,04	Alto (Mayor 5%)

**7.3.3 Incertidumbre de precisión**  $u_p$  : Con los datos de la Tabla 24 se puede calcular la incertidumbre de precisión. Se emplean los datos de precisión intermedia y no los de repetibilidad, para abarcar el mayor número de factores de variación. Tabla 33.

**Tabla 33. Incertidumbre de precisión bajo condiciones de reproducibilidad**

Niveles de C	%R	$S_{prom}$	% C.V. <sub>prom</sub>
1	99,24		
2	101,00		
3	100,62		
4	100,44	0,002	1,77
5	100,33		
6	100,74		
7	99,67		

En este caso la incertidumbre se determina por la Ecuación 2

Donde, n es el número de mediciones (35) con cinco datos para cada uno de los siete niveles de concentración, además se parte de los porcentajes de recuperación y se calcula una desviación estándar relativa promedio que es el mismo C.V. Tabla 33.

$$u_p = \frac{1,77\%}{\sqrt{35}}$$

$$u_p = 0,30\%$$

**7.3.3.1 Incertidumbre asociada al material volumétrico:**

En los instrumentos volumétricos es más probable que el valor verdadero esté más cerca del valor nominal que de los extremos, para calcular la incertidumbre se estima a través de la ecuación:

$$u_{vol} = \frac{A}{\sqrt{24}} \tag{Ecuación 7}$$

Para el caso de la pipeta de 2mL se tiene:

Tolerancia por calibración del fabricante (a 20°C)  $\pm 0,010$  mL,  $A = 0,02$ mL.

$$up_2 = \frac{0,02mL}{\sqrt{24}} = 0,004mL$$

El valor nominal del volumen de la pipeta es de 2mL, se obtiene entonces un 2% de incertidumbre.

De esta misma manera se realiza el cálculo de la incertidumbre de la pipeta de 5 mL y 10 mL, del balón aforado de 100 mL y la bureta 25 mL, material utilizado en la validación colorimétrica.

En la Tabla 34 se observa los valores obtenidos de cada incertidumbre correspondiente al material volumétrico utilizado.

**Tabla 34. Incertidumbre asociada al material de volumétrico.**

	Pipeta 2mL $up_2$	Pipeta 5mL $up_5$	Pipeta 10mL $up_{10}$	Balón 100 mL $u_{balón}$	Bureta 25 mL $u_{bur}$
<b>Tolerancia</b>	0,010	0,05	0,075	0,08	0,02
<b>A</b>	0,02	0,1	0,15	0,16	0,04
<b>% Incertidumbre</b>	2	0,4	0,3	0,03	0,03

Posteriormente se calcula la incertidumbre combinada del material volumétrico:

Este paso se realiza con los valores obtenidos de  $up_2$ ,  $up_5$ ,  $up_{10}$ ,  $u_{balón}$  y  $u_{bur}$  por medio de la ley de propagación de errores se determina el valor de aporte de incertidumbre asociada a cada material y se combinan para determinar el aporte total  $u_{vol}$

$$u_{vol} = \sqrt{(up_2)^2 + (up_5)^2 + (up_{10})^2 + (u_{balón})^2 + (u_{bur})^2}$$

$$u_{vol} = \sqrt{(2)^2 + (0,4)^2 + (0,3)^2 + (0,03)^2 + (0,03)^2}$$

$$u_{vol} = \sqrt{(2)^2 + (0,4)^2 + (0,3)^2}$$

$$u_{vol} = 2,2\%$$

La incertidumbre del balón aforado  $u_{balón}$  y la incertidumbre de la bureta  $u_{bur}$  en este caso se consideran como despreciables, ya que su valor no altera el resultado de la incertidumbre  $u_{vol}$

Entonces, el aporte total a la incertidumbre del material volumétrico es de 2,2%.

### 7.3.3.2 Incertidumbre asociada a los reactivos:

Los reactivos que se utilizan para la determinación de materia orgánica para el método colorimétrico son ácido sulfúrico Merck (Pureza 95-97%), dicromato de potasio (Pureza 99,9%). En la Tabla 35 se observa los datos correspondientes a la determinación de la incertidumbre asociada a los dos reactivos.

**Tabla 35. Incertidumbre asociada a los reactivos**

Reactivo	Pureza %	Amplitud	$u_{\text{reac}} = \frac{A}{\sqrt{12}}$
Ácido sulfúrico $u_{as}$	95-97	2	0,58
Dicromato de Potasio $u_{dp}$	99.9	0,2	0,06
	$u_{\text{reac}T}$		0,58

Se calcula la incertidumbre combinada de los reactivos:

Con los valores obtenidos de  $u_{as}$ ,  $u_{dp}$ , por medio de la ley de propagación de errores se determina el valor de aporte de incertidumbre asociada a cada material y se combinan para determinar el aporte total  $u_{\text{reac}T}$

$$u_{\text{reac}T} = \sqrt{(u_{as})^2 + (u_{dp})^2}$$

$$u_{\text{reac}T} = \sqrt{(0,58)^2 + (0,06)^2}$$

$$u_{\text{reac}T} = 0,58\%$$

Se desprecia el valor de la incertidumbre que aporta el dicromato de potasio ya que su valor no altera la incertidumbre final, por lo tanto la incertidumbre debida a los reactivos es 0,58%.



### 7.3.3.3 Incertidumbre asociada a los equipos: $u_e$

En la determinación de materia orgánica se utiliza el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 1 y una balanza Mettler P1210.

### 7.3.3.4 Incertidumbre asociada a la balanza: $u_b$

Se realizó 10 mediciones sucesivas con una pesa de referencia cuyo valor nominal es 0,10 g, los resultados se resumen en la Tabla 36. Para realizar los cálculos se utiliza la ecuación 4.

**Tabla 36. Incertidumbre asociada a la balanza**

Mediciones	Promedio	S	%CV
0,11			
0,11			
0,10			
0,11			
0,10	0,11	0,005	4,87
0,11			
0,10			
0,11			
0,10			
0,11			

$$u_b = \frac{4,87 \%}{\sqrt{10}}$$

$$u_b = 1,54\%$$

### 7.3.3.5 Incertidumbre asociada al espectrofotómetro: $u_e$

Se realizaron 10 mediciones sucesivas a un estándar de sacarosa de 10 mg/mL, los resultados se resumen en la Tabla 37.

**Tabla 37. Incertidumbre asociada al espectrofotómetro**

Mediciones	Absorbancia	Promedio	S	% C.V
1	0,101			
2	0,101			
3	0,102			
4	0,101	0,102	0,001	0,51
5	0,101			
6	0,102			
7	0,102			
8	0,102			
9	0,102			
10	0,102			

$$u_e = \frac{0,51 \%}{\sqrt{10}}$$

$$u_e = 0,16\%$$

Se calcula la incertidumbre combinada para la balanza y el espectrofotómetro (equipos):

$$u_e = \sqrt{(u_b)^2 + (u_e)^2}$$

$$u_e = \sqrt{(1,54)^2 + (0,16)^2}$$

$$u_e = 1,56\%$$

La incertidumbre debida a los equipos es de 1,56 %.

### 7.3.3.6 Incertidumbre Combinada Total: $u_{cT}$

Con los valores obtenidos de  $u_p, u_{vol} + u_{react} + u_{be}$  por medio de la ley de propagación de errores se determina el valor de aporte total de la incertidumbre.

$$u_{cT} = \sqrt{(u_p)^2 + (u_{vol})^2 + (u_{react})^2 + (u_{be})^2}$$

$$u_{cT} = \sqrt{(0,30)^2 + (2,20)^2 + (0,58)^2 + (1,56)^2}$$

$$u_{cT} = 7,91\%$$

### 7.3.3.7 Incertidumbre expandida:

El resultado se debe expresar en forma de incertidumbre expandida, se utiliza la ecuación 4.

$$U = 7,91\% \times 2$$

$$U = 15,82\%$$

Para el reporte de M.O en un análisis de realizado en el laboratorio de la SDAM se debe expresar como:

$$\text{M.O (mgC)} = \text{valor medido} \pm (\text{valor medido} \times 0,158) \quad (\text{Ecuación 8})$$

Existe un 95% de seguridad de que el valor verdadero de M.O de una muestra, esté dentro del intervalo dado por el valor obtenido al analizar la muestra y su incertidumbre.

### 7.3.4 Comparación de la metodología Volumétrica y Metodología colorimétrica:

Se utilizaron las muestras analizadas anteriormente ( 1, 2 y 3) valores que serán comparados con ambas metodologías método colorimétrico y método volumétrico de Walkley-Black utilizando las mismas muestras, para evaluar si el método propuesto proporciona resultados estadísticamente diferentes a la metodología convencional. En la Tabla 38 se muestra los datos que corresponden el análisis por la metodología colorimétrica, se observa la absorbancia para tres repeticiones de cada una de las muestras problema.

**Tabla 38. Datos obtenidos método colorimétrico**

Muestras	Absorbancia	mgC	Promedio mgC	S	%C.V.
1	0,014	0,94	0,99	0,04	4,10
	0,015	1,01			
	0,015	1,01			
2	0,045	3,12	3,10	0,10	3,27
	0,046	3,19			
	0,043	2,99			
3	0,123	8,65	8,61	0,16	1,84
	0,125	8,75			
	0,120	8,44			

En la Tabla 38, se observa que los %C.V. oscilan entre 1,84 y 4,10 lo cual indica que la metodología colorimétrica tiene porcentajes de coeficientes de variación que son considerados bajos ( $\leq$  al 5%) para la determinación analizada. Se realiza la determinación del contenido de mg de C para las muestras por el método volumétrico, los datos se presentan en la Tabla 39.

**Tabla 39. Datos obtenidos método volumétrico**

Muestras	mgC	Promedio mgC	S	%C.V.
1	1,13	1,12	0,07	6,25
	1,05			
	1,19			
2	3,2	3,09	0,12	3,91
	3,0			
	3,1			
3	8,22	8,48	0,27	3,13
	8,75			
	8,46			

En la Tabla 39 se visualiza los valores correspondientes a la determinación de mg de C por volumetría; el primer dato que es relacionado con la muestra más baja en su contenido de mgC presenta un %C.V. de 6,25 considerado, superior al del mismo nivel valorado con la metodología colorimétrica. Sin embargo, está dentro del límite propuesto por la IUPAC como aceptable (7%).

Los demás %C.V. son menores al %5 pero todos mayores comparados con los de la metodología colorimétrica.

**Tabla 40. Comparación de la metodología colorimétrica con la metodología volumétrica.**

Muestra	METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA		METODOLOGÍA VOLUMÉTRICA	
	DESV. EST	%CV	DESV. EST	%CV
1	0,04	4,10	0,07	6,25
2	0,10	3,27	0,12	3,91
3	0,16	1,84	0,27	3,13
4	0,23	1,12	0,36	1,76

Se observa en la Tabla 40 que los %C.V. son mayores para la metodología volumétrica para este tipo de determinación en cada una de las tres muestras, por

lo tanto la metodología colorimétrica presenta mayor reproducibilidad y precisión que la volumétrica.

Para corroborar si hay diferencia significativa estadística entre los valores obtenidos por ambas técnicas se procede a realizar la prueba T para muestras relacionadas obtenida en la Tabla 40.

Se adopta la hipótesis nula: “No Existen diferencias significativas entre los valores de mg C obtenidos por colorimetría y volumetría”.

En la Tabla 41 se observa una significancia mayor a 0,05; aceptando la hipótesis nula; mostrando que los contenidos de C (mg) obtenidos mediante las dos metodologías para cada una de las muestras analizadas, no presentan diferencia significativa, indicando que queda debidamente implementada la metodología colorimétrica en el laboratorio de SDAM para la determinación de MO en muestras de suelos en los rangos analizados.

**Tabla 41. Prueba t colorimetría y volumetría con mg de C de todas las réplicas**

		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	mgC Colorimetría - mgC Volumetría	,0044	,20206	,06735	-,1509	,1598	,066	8	0,949

### 7.3.5 Pruebas inter e intra laboratorios:

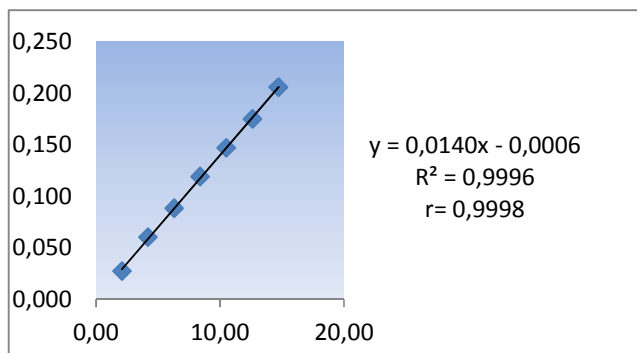
Se realizó pruebas inter e intra laboratorios realizando análisis de las tres muestras de suelo analizadas en el laboratorio de la SDAM.

#### 7.3.5.1 Intralaboratorios:

La prueba intralaboratorios se realiza con un analista 1 y analista 2, en el laboratorio de la SDAM, se evaluó el comportamiento del método cuando lo realiza otro analista.

Cada analista preparó una curva de calibración con los niveles de concentración establecidos (2,10 mgC hasta 14,72 mgC) y se realizó el mismo tratamiento a las tres muestras de suelo.

En la Figura 17 se muestra la curva realizada por el analista 1, obteniéndose un coeficiente de correlación r de 0,9995.



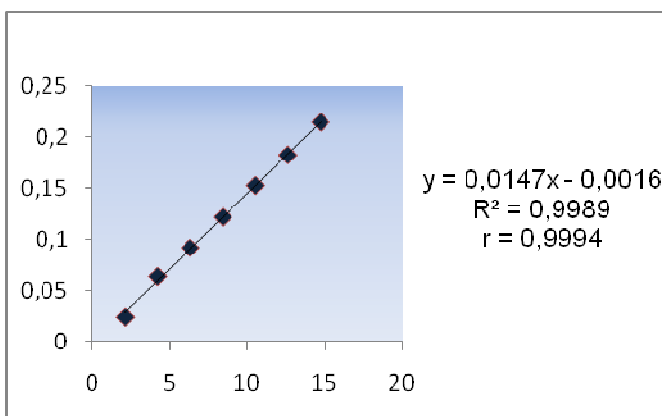
**Figura 17.** Curva de calibración realizada por el analista 1.

En la Tabla 42 se observa la absorbancia, los mg de C y desviación estándar promedio para cada una de las muestras, así como los % C.V. los cuales son menores al % 5 para el analista 1.

**Tabla 42. Datos obtenidos de la valoración de la metodología (Analista 1)**

Muestra	Prom absorbancia	Prom mgC	S prom	% C.V.
1	0,016	1,08	0,001	3,69
2	0,046	2,90	0,001	2,17
3	0,126	8,14	0,003	2,10

En la Figura 18 se muestra ahora, la curva de calibración que realizó un analista 2, igualmente el coeficiente de correlación es cercano a 1,  $r = 0,9994$ , demostrando la linealidad de la curva.



**Figura 18.** Curva de calibración realizada por el analista 2.

En la Tabla 43 se observa la absorbancia, los mg de C y la desviación estándar promedio para cada una de las muestras, así como los % C.V. los cuales son menores al % 5 como para el caso del analista 1.

**Tabla 43. Datos obtenidos de la valoración metodológica (Analista 2)**

Muestra	Prom absorbancia	Prom mgC	S	% C.V.
1	0,015	1,05	0,001	3,46
2	0,042	2,95	0,002	4,92
3	0,119	8,23	0,003	2,48

De las dos Tablas 42 y 43 donde se registran los resultados obtenidos por el analista 1 y 2 respectivamente, se puede inferir que la metodología funciona de manera precisa con coeficientes de variación menores al 5%, donde los valores con respecto al % C.V. es de 2,10% y 3,69% para el analista 1 y 2,48 y el 4,92% el analista 2.

Se realiza la Prueba T (Tabla 44) para muestras relacionadas con el fin de analizar si hay diferencias significativas entre los análisis realizados, en donde se involucra los valores de los promedios de mg C obtenidos para cada una de las muestras por los dos analistas.

Para ello, se adopta la hipótesis nula: “No existen diferencias significativas entre los mg de C obtenidos por el analista 1 y el analista 2”.

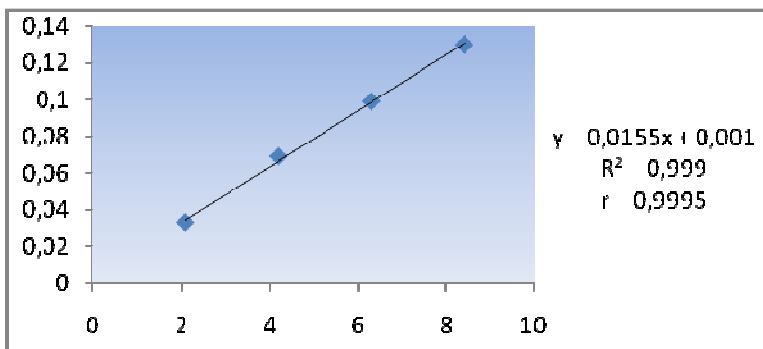
Comprobándose lo anterior se puede decir que el método es reproducible para el laboratorio de la SDAM ya que la significancia es de 0,351 valor superior a 0,05 de significancia. Tabla 44.

**Tabla 44. Prueba T para muestras relacionadas: Analista 1- Analista 2 con las réplicas**

		t	gl	Sig. (bilateral)
Par 1	ANALISTA 1 ANALISTA 2	-1,102	2	0,351

**7.3.5.2 Interlaboratorios:** Adicionalmente a las pruebas que se realizaron con CALS (Control Analítico de Laboratorios de Suelos), se analizaron las muestras de suelo en el laboratorio de Agroquímica de la Universidad del Cauca, para realizar una prueba interlaboratorios que compruebe que la metodología es aplicable en diferentes condiciones. Se obtiene los resultados relacionados en la Tabla 45.

Al igual que en el caso anterior se realiza la curva de calibración respectiva Figura 19, en donde se interpolan los valores de absorbancia obtenidos para las cuatro muestras para obtener los mg de C.



**Figura 19.** Curva de calibración realizada en el laboratorio de Agroquímica

Se observa en la Figura 18, alta linealidad con un coeficiente de correlación igual a 0,9995. Igualmente se tabula la desviación estándar promedio y los %C.V para cada una de las tres repeticiones de las cuatro muestras.

Se evidencia que los %C.V. para la prueba interlaboratorio son mayores que los realizados en el laboratorio de la SDAM, pero igualmente son menores al %5 esto puede atribuirse al cambio en material, equipos entre otros (Tabla 45).

**Tabla 45. % C.V. muestras analizadas en el laboratorio de Agroquímica.**

MUESTRA	S	% C.V.
1	0,001	3,46
2	0,002	4,49
3	0,005	4,16

#### **7.4 EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA POR PARTE DE CALS (Control Analítico de Laboratorios de Suelos)**

Durante el período de validación de la metodología se recibió dos remesas provenientes de CALS, cada remesa con siete muestras patrón, evaluando en total catorce muestras con la metodología colorimétrica validada para la determinación de materia orgánica.



**Primer envío (Figura 20):** Las muestras 709, 710,712 son muestras diferentes; en la Tabla 45 se muestra los valores correspondientes al %C.O reportado por el laboratorio de la SDAM y el %C.O reportado por CALS.



**Figura 20.** Primer envío de CALS

**Tabla 46. Resultados CALS Remesa No.1 para muestras problema diferentes.**

MUESTRA	% C.O CALS	% C.O SDAM	%R	ASTERISCOS
709	14,01	14,22	101,49	0
710	6,01	5,97	99,33	0
712	1,63	1,61	98,77	0

Como se mencionó anteriormente, la exactitud de la metodología CALS se reporta mediante un número determinado de asteriscos (\*, \*\*, \*\*\*) a medida que aumenta el número de asteriscos disminuye la exactitud, siendo tres el máximo número de asteriscos que indicaría una menor exactitud. Como se observa en la Tabla 46 los porcentajes de recuperación están alrededor del 100% además, indicando una alta exactitud. CALS no reporta ningún asterisco para ninguna de las muestras analizadas por el laboratorio de suelos de la SDAM.

En la Tabla 47 se presentan los datos de otras cuatro muestras patrón relacionadas como 711, A, B y C enviadas por CALS. Por información posterior se deduce que las cuatro muestras son réplicas enviadas para comprobar la precisión de la metodología. Se observa el %C.O promedio obtenido en el laboratorio de la SDAM corresponde a 1.34% y el reportado por CALS es de 1.30%, con una alta precisión denotada por su baja desviación estándar y un %C.V. bajo. El porcentaje de recuperación de acuerdo al dato del valor reportado por CALS para dichas muestras de 1.30%, corresponde a un 103.08%, valor aceptado.

**Tabla 47. Resultados CALS Remesa 1  
(Una muestra con tres repeticiones A, B y C).**

MUESTRA	% C.O SDAM	DESV. EST	PROMEDIO		%C.V	%R
			% C.O SDAM	% C.O CALS		
711	1,37					
A	1,32	0,060	1,34	1,30	4,5	103,08
B	1,39					
C	1,26					

**Segundo envío (Figura 21):** Se recibe un segundo envío de muestras patrón por parte de CALS para que el laboratorio de suelos de la SDAM realice el análisis pertinente. En la Tabla 48 se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 21.** Segundo envío de CALS

Las muestras 713,714 y 715 son muestras diferentes, en la Tabla 48, se muestra los valores correspondientes al %C.O reportado por el laboratorio de la SDAM y el %C.O reportado por CALS.

CALS no reporta nuevamente ningún asterisco para ninguna de las tres muestras analizadas.

**Tabla 48. Resultados CALS Remesa No.2 muestras problema diferentes.**

MUESTRA	% C.O CALS	% C.O SDAM	%R	ASTERISCOS
713	13,97	13,82	98,93	0
714	8,28	8,37	101,1	0
715	11,19	11,0	98,3	0

Se observa también en la Tabla 48 que la metodología implementada en el laboratorio de la SDAM presenta una alta exactitud denotada en su alto porcentaje de recuperación, y en la ausencia de asteriscos reportada por CALS.

En la Tabla 49 se muestra los valores correspondientes al %CO de las muestras patrón 716, A, B y C enviadas por CALS, con un valor promedio de de 1.25% encontrado con la metodología colorimétrica, una alta precisión denotada por su

baja desviación estándar y una alta exactitud deducible de su muy bajo % CV y alto porcentaje de recuperación.

**Tabla 49. Resultados CALS Remesa No.2  
(Una muestra con tres repeticiones A, B y C).**

MUESTRA	% C.O SDAM	DESV. EST	PROMEDIO% C.O SDAM	% C.O CALS	%C.V	%R
716	1,26					
A	1,24	0,022	1,25	1,22	1,77	102,46
B	1,23					
C	1,28					

Del anterior análisis se deduce que los resultados de las dos remesas anteriores enviadas en el período de la pasantía evidencian que la metodología colorimétrica validada para determinación de materia orgánica en el laboratorio de la SDAM, presenta valores con un nivel alto de precisión y de exactitud.

Para comprobar si hay diferencias significativas en los valores obtenidos en el laboratorio de la SDAM y los obtenidos por el consenso de CALS, se realiza la prueba T para muestras relacionadas teniendo como hipótesis nula: “No existe diferencias significativas entre los mg de C” obteniendo los datos que aparecen en la Tabla 50.

**Tabla 50. Prueba T de muestras relacionadas CALS.**

		t	gl	Sig. (bilateral)
Par 1	CALS - SDAM	-,452	13	0,659

Se observa que la significancia es de 0,659, lo cual indica que no hay diferencias significativas entre los dos valores analizados, por lo tanto se puede decir que la metodología es reproducible, exacta y precisa.

**7.4.1 Porcentaje de error:** Para el cálculo del porcentaje de error se toma como valores teóricos, los valores de mg de C de muestras patrón remitidas por CALS, que en el caso de la primera remesa y muestra 709 es 14,01. Por lo tanto se tiene que:

Porcentaje de error de la muestra 709: (Ecuación 9)

$$\frac{|\text{valor experimental} - \text{valor teórico}|}{|\text{valor teórico}|} \times 100\%$$

$$\frac{|14,22 - 14,01|}{|14,01|} \times 100\%$$

Porcentaje de error = 1,50%

El porcentaje de error para la muestra 709 es 1,50%.

De la misma manera se realiza el cálculo de porcentaje de error para las demás muestras, los resultados se visualizan en las siguientes Tablas 51 y Tabla 52:

**Tabla 51. Resultados porcentajes de error remesa 1.**

No. Muestra	Porcentaje de error (%E)
709	1,50
710	0,66
711 (A,B,C)	3,10
712	1,23

**Tabla 52. Resultados porcentajes de error remesa 2.**

No. Muestra	Porcentaje de error (%E)
713	1,10
714	1,10
715	1,70
716 (A,B,C)	2,40

Se observa que los porcentajes de error calculados para las dos remesas remitidas por CALS, son inferiores al 3.5%, demostrando así que la metodología funciona de manera adecuada, que quedó debidamente implementada, estandarizada y validada.

## **7.5 ELABORACIÓN DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO (POE)**

El POE describe en forma detallada el procedimiento que se debe seguir para realizar la determinación de materia orgánica en muestras de suelo. Este documento consta de un objetivo principal, notas de seguridad, alcance, preparación de las soluciones, elaboración de la curva de calibración, manejo de resultados, bibliografía. La descripción del POE (Anexo E).

## 8 CONCLUSIONES

- Se realizó una calibración inicial del espectrofotómetro Perkin Elmer lambda1 presentando linealidad en el rango de 4 a 32 ppm de dicromato en KOH 0.06M, con un % C.V. de 0,47, además de %R entre 97,25 y 101,00 por lo que es posible obtener un promedio correspondiente a 99,53%.
- Se validó el sistema instrumental empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer lambda 1, el cual brindó linealidad en el rango de 2,10 mgC a 14,72 mgC con un coeficiente de correlación (r) de 0,9998 preciso, y %C.V. en términos de repetibilidad desde 0,60 a 3,65 y un %C.V. en términos de precisión intermedia desde 0,09 a 3,44.
- La validación de la metodología mostró una linealidad en el rango de 2,10 mgC y 14,72 mgC, siendo precisa con %C.V. comprendidos entre 2,08 y 4,16 %, y exacta con %R de 100,29. Suficientemente sensible con LOD y LOQ de 0,210 mgC y 0,699 mgC respectivamente.
- La incertidumbre de precisión para la metodología bajo condiciones de reproducibilidad es de 0,30% y la incertidumbre expandida es de 15.82% por lo tanto el valor de M.O. se debe reportar como: M.O = valor medido ± (valor medido × 0,158).
- En la prueba intralaboratorio se obtuvo %C.V. inferiores al %5, para el caso del analista 1 el C.V. se encuentra entre 2,10 y 3,69; para el analista 2 se tiene que el %C.V. está entre 2,48 y 4,92, además de la prueba T para muestras relacionadas que demuestra con una significancia de 0,351 que la metodología funciona de manera precisa.
- Para el caso de la prueba interlaboratorio realizada en el laboratorio de Agroquímica de la Universidad del Cauca el %C.V. está entre 3,46 y 4,49 por lo tanto se considera que la metodología es precisa ya que los coeficientes de variación son menores del 5%.
- La metodología colorimétrica implementada en el laboratorio de la SDAM evaluada por parte de CALS mediante el análisis de muestras problema suministradas, da como resultado %C.V. menores a %5 (1,77 y 4,5) para las muestras con sus respectivas repeticiones, demostrando así que la metodología es precisa exacta y reproducible.
- Para los porcentajes de error que corresponden a los análisis de muestras de CALS se obtiene un valor máximo de 3,10% y mínimo de 0.66% demostrando nuevamente la exactitud y reproducibilidad de la metodología y su debida validación.

- Se realizó el documento donde se reporta el Procedimiento Operativo Estandarizado (POE) de la metodología validada para la determinación de materia orgánica con los diferentes parámetros de validación y la incertidumbre del método.
- Con los tratamientos matemáticos, estadísticos y pruebas realizadas a la determinación de materia orgánica por el método colorimétrico se contribuye al proceso de acreditación bajo la norma NTC ISO/IEC 17025 que adelanta el laboratorio de suelos de la SDAM.
- Durante el desarrollo de esta pasantía se apoyó en las labores propias del laboratorio como son: pedidos de reactivos, compras de suministros, servicio al cliente, apoyo en la lectura de muestras, adecuación de áreas, estimación de costos por muestra de suelo y todas las actividades que el jefe de laboratorio designó en su momento y que están encaminadas al buen funcionamiento del laboratorio de suelos.

## 9. RECOMENDACIONES

- Es conveniente para el laboratorio de la SDAM, utilizar material de referencia certificado dentro de los diferentes procesos de medición del laboratorio para ser utilizado como un medio de comparación.
- Realizar mantenimiento técnico preventivo continuo a cada uno de los equipos utilizados para la determinación de materia orgánica (Balanza, Horno de Secado, Espectrofotómetro).
- Llevar una bitácora de cada uno de los equipos utilizados ya que este es un indicador de uso.
- Realizar continuo registro documental de los certificados de análisis y de calibración de equipos, reactivos y materiales utilizados en el laboratorio que sirven para determinar la incertidumbre de las mediciones.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] DATTARI. **2004**. Importancia de la materia orgánica. Revista Terralia. Vol. 43 14-22.
- [2] GALVIS, J, **2005**. Evaluación de parámetros de calidad para la determinación de carbono orgánico en suelos. Revista colombiana de química, Vol.34, No. 2,201- 209.
- [3] SCHNITZER, M. A. **2000**. A lifetime perspective on the chemistry of soil organic matter. Advances in Agronomy, 68, 1-59.
- [4] BUURMAN, P., PETERSE, F. & ALMENDROS MARTIN, G. **2007**. Soil organic matter chemistry in allophanic soils: a pyrolysis-GC/MS study of a Costa Rican Andisol catena. European Journal of Soil Science, 58, 1330–1347.
- [5] SHOJI, S., NANZYO, M., & DAHLGREN, R. **1993**. Volcanic Ash Soils, Genesis Properties and utilization. Elsevier Science Publishers Amsterdam - London - New York - Tokyo ISBN: 0-444-89799-2, Tokyo. 277.
- [6] GUY, K., **2004**. The Biogeochemistry of Submerged Soils Copyright John Wiley & Sons Ltd, England. 283.
- [7] KUMADA, K.**1987**. Chemistry of Soil Organic Matter. Japan Scientific Societies Press and Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Japan ISBN 0-444-98936-6, Vol. 17.
- [8]. ROBERT, M. **2002**. Captura de C en los suelos para un mejor manejo de la tierra. Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación (FAO), Roma. 4-57p.ISBN 92-5-304690-2.
- [9] HAIDER K & SCHAFFER ANDREAS. **2009**. Soil Biochemistry Science Publishers United States of America. ISBN 978-1-57808-579-8,pag 17-49.
- [10] ALMENDROS, G., KGATHI, D. SEKHWELA, M., ZANCADA, M.C., Tinoco, P. & Pardo, M.T. **2003**. Biogeochemical assessment of resilient humus formations from virgin and cultivated northern Botswana soils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4321– 4330.
- [11] STEVENSON, F. ELLIOT, E.T. **1989**. Methodologies for assessing the quantity and quality of soil organic matter. Chapter 7. In: Dynamics of SOM



in tropical ecosystems. Edit for: Coleman, C.D.; Malcolm, O., A.; Uehara, G. 249.

- [12] KONONOVA, M. **1972**. Current problems in the study of soil organic matter. *Sov. S. Sci.* 420-427.
- [13]. PICCOLO, A., MBAGWU, J. S.C. **1999**. Role of Hydrophobic Components of Soil Organic Matter in Soil Aggregate Stability. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63, 1801–1810.
- [14] ZAPATA, R. **2004**. Química de la acidez del suelo. Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. Medellín. Colombia.
- [15] ZAPATA, R. **2006**. Química de los Procesos Pedogenéticos. Universidad Nacional de Colombia Primera edición, Medellín Colombia,.
- [16] BRAVO I, MOSQUERA C y HANSER W EDDY. **2007** “Comportamiento estructural de la Ácidos Húmicos Obtenidos de un Suelo Andisol del departamento del Cauca “Revista Colombiana de Química” Vol 36 No.1, pp31-41. Bogotá Colombia. ISSN0120-2804
- [17]. MOSQUERA C, BRAVO I. **2006**. Comportamiento de los ácidos húmicos en medio básico. Suelos Ecuatoriales Revista de la Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. Volumen 36 No.1, p 36-42 Bogotá Colombia ISSN 0562-5351
- [18] USSIRI N., D. A.; JOHNSON E, C. **2003**. Characterization of organic matter in a northern hardwood forest soil by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy and chemical methods. *Geoderma*, 111, 123-149.
- [19] ANDERSON, D. W.; SCHOENAU, J. **1993**. Soil Humus Fractions. In: *Soil Sampling and Methods*.
- [20] VAN BERGEN, P.F., BULL, I.D., POULTON, P.R. & EVERSLED, R.P. **1997**. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments - I. Total lipid extracts, solvent insoluble residues and humic acids from Broadbalk Wilderness. *Organic Geochemistry*, 26, 117–135.
- [21] NAAFS, D.F.W. **2004**. What are humic substances? A molecular approach to the study of organic matter in acid soils. PhD thesis, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands.,

- [22] SAIZ JIMENEZ C, DE LEEUW JW. **1986**. Chemical characterization of soil organic matter fractions by analytical pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 9, :99–119
- [23] ANDREUX, F. **1996**. Humus in world soils. In: Piccolo A (ed) *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Elsevier, Ámsterdam, 45– 100
- [24] ANDREUX, F. **2005**. Función de la materia orgánica sobre los aspectos bioquímicos del suelo: formación y consecuencias de los enlaces entre grupos amino y ciclos aromáticos. Encuentro nacional de la ciencia del suelo “Materiales orgánicos y microorganismos en la agricultura Colombiana”. Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. (memorias), Medellín. Colombia.
- [25] HIRADATE, S., HIRAI, H., HASHIMOTO, H. **2006**. Characterization of allophanic Andisols by solid-state  $^{13}\text{C}$ ,  $^{27}\text{Al}$ , and  $^{29}\text{Si}$  NMR and by C stable isotopic ratio  $\delta^{13}\text{C}$ . *Geoderma*. 136, 696–707.
- [26] RICE, J.A, KOHL, S. **1989**. The Binding of Organic Contaminants to humin. *Sci. Total Environ*. 81, 61-69.
- [27] RICE, J. **1997**. Fractionation of pesticide residues bound to humin. *Soil Science*. 162, 6, 424-429.
- [28] RICE, J.A., & MACCARTHY, P. **1990**. A model of humin. *Environ. Sci. Technol.*, 24, 1875-1878.
- [29] MACCARTHY, P. **2001**, the principles of humic substances. *Soil Science*. 166. N°11. USA. 738-751.
- [30] MUÑOZ, B. **2004**. Extracción y caracterización preliminar de huminas de un suelo Andisol del Departamento del Cauca. Trabajo de grado (Químico). Universidad del Cauca. 24-26. Popayán.
- [31] FASSBENDER, H.W. BORNEMISZA E. **1987**, Química de los suelos con énfasis en suelos y América Latina, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Costa Rica p: 45-99.
- [32] JHONBRYNNER G. G, BALLESTEROS M.I. **2005**. Evaluación de Parámetros de Calidad Para la Determinación de Carbono Orgánico en Suelos. *Revista Colombiana de Química*. Vol. 34. No. 2 p. 201-209.

- [33] BRAVO I., GIRALDO E., **2003** Manual de agroquímica I. Guía 10. Universidad del Cauca. p: 49-53.
- [34] ARRIECHE I., PACHECO Y. **2008**. Determinación de Carbono Orgánico en Muestras de Suelos Mediante dos Procedimientos Analíticos. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Estado Yaracuy. Revista Venesuelos. p: 1-8.
- [35] ICONTEC. **2004** .Cómo Implementar un Sistema de Gestión Práctico y Eficaz en Laboratorios de Ensayo y Calibración p.40-51,67-87.
- [36] Certificación y acreditación de laboratorios de ensayo. Tomado de Internet 20 de marzo de 2009.  
<http://www.uis.edu.co/portal/acreditacion/laboratorios/documentos/INTRODUCCION.pdf>.
- [37] COLÍN R.E. **2010** Validación de Métodos de Medición. EMA (Entidad Mexicana de Acreditación). México.
- [38] MARTINEZ R.J. GUTIERREZ I.H. **2004**. La Validación de métodos. Un enfoque práctico. Simposio de metrología. Centro nacional de metrología. P 1-5.
- [39] CENAM Centro Nacional de metrología. **2008.**, Guía Técnica sobre Trazabilidad e Incertidumbre en las Mediciones Analíticas que Emplean la Técnica de Espectrofotometría de Ultravioleta-Visible. EMA Entidad Mexicana de Acreditación. México p: 1-69.
- [40] GLOSARIO BÁSICO DE TÉRMINOS ESTADÍSTICOS, **2006** INEI (Instituto Nacional de estadística e informática). Lima Pág. 6-66.
- [41] SOCIEDAD COLOMBIANA DE LA CIENCIA DEL SUELO. **2000**. Fundamentos para la interpretación de análisis de suelos, plantas y aguas para riego. Editor Francisco Silva Mojica. Tercera edición.Colombia.
- [42] LLAMOSA R.L., CONTRERAS L.M., ARBELAEZ M.B **2007**.Estudio de Repetibilidad y Reproducibilidad Utilizando el Método de Promedios y Rangos Para el Aseguramiento de la Calidad de los Resultados de Calibración de Acuerdo con la Norma Técnica NTC ISO/IEC 17025. Scientia et Technica año XIII, No. 35. Universidad Tecnológica de Pereira.
- [43] SOSO A. RIMINI A. **1998**.Validación de Métodos Analíticos. Argentina. 3-48.

- [44] FAO, **2007**. Aseguramiento de Calidad y Validación de la Metodología para Análisis Químico, Bogotá Colombia p: 1-103

## ANEXOS

### ANEXO A

#### Cálculos para muestras de suelo

##### ➤ Determinación de humedad:

$$\% H = \frac{(P_{whúmeda} - P_{w \text{ sec } a})}{P_{whúmeda}} * 100$$

##### ➤ Fórmula para la determinación de carbono orgánico en muestras de suelo:

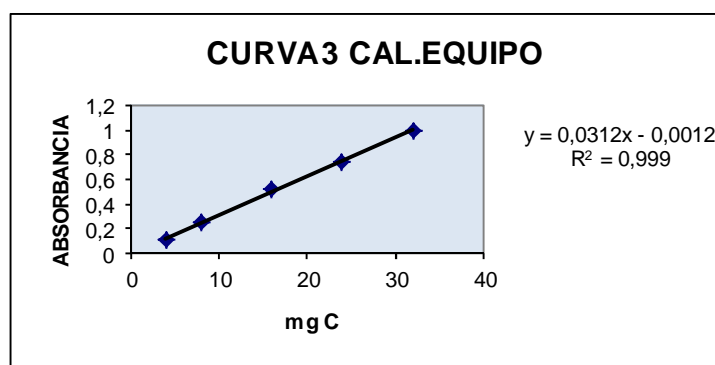
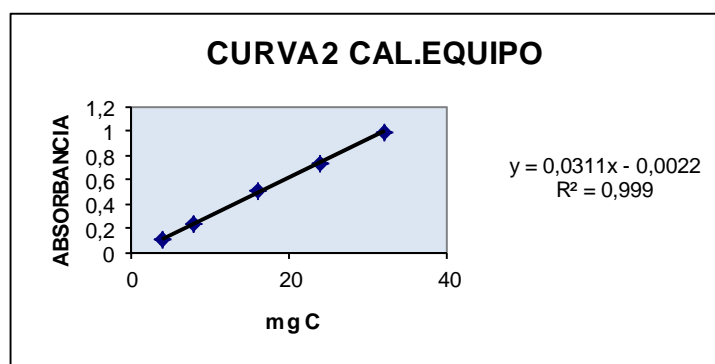
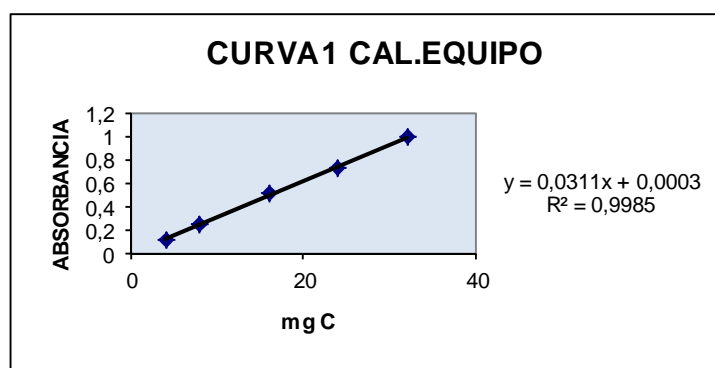
$$\% C = \frac{mg \ C_{exp} \times (100 + P_w)}{g \ suelo \times 1000}$$

##### ➤ Cálculo del contenido de materia orgánica en muestras de suelo:

$$\% MO = \% CO * 1,724$$

## ANEXO B

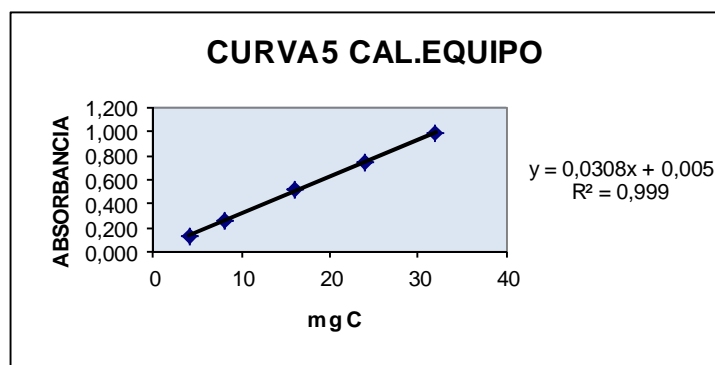
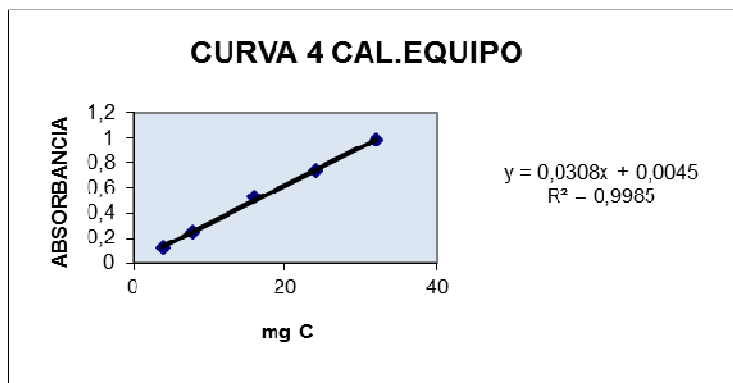
### Curvas individuales para calibración del equipo Perkin Elmer Lambda 1



## ANEXO B

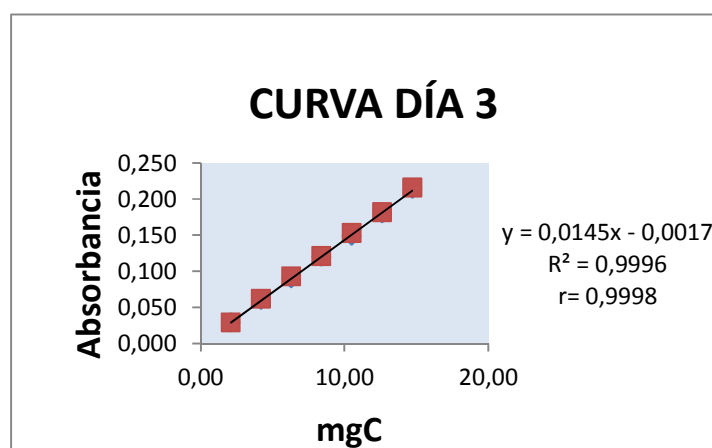
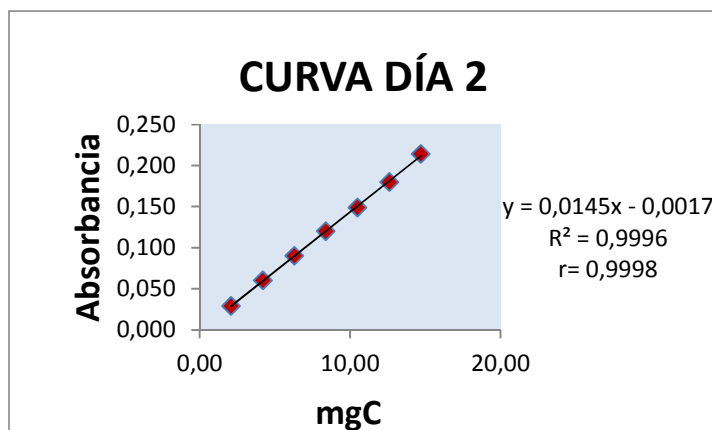
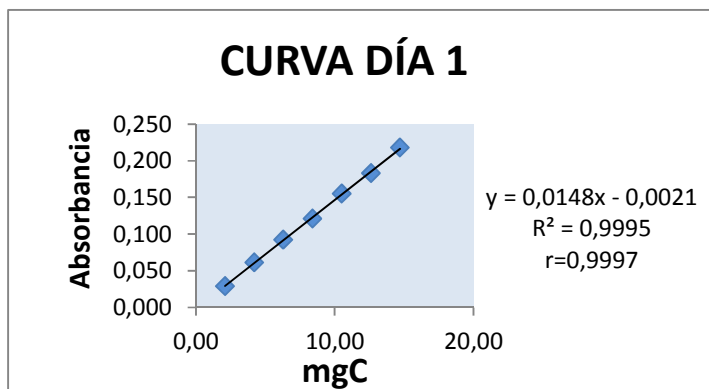
Cont. Curvas individuales para calibración del equipo Perkin Elmer Lambda

1



## ANEXO C

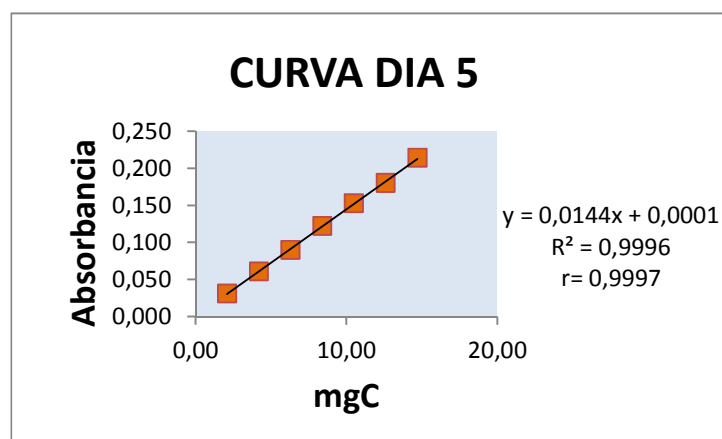
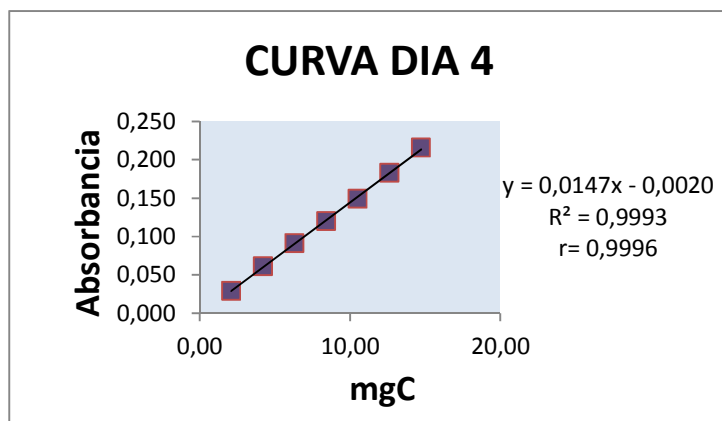
### Curvas individuales de linealidad instrumental y reproducibilidad





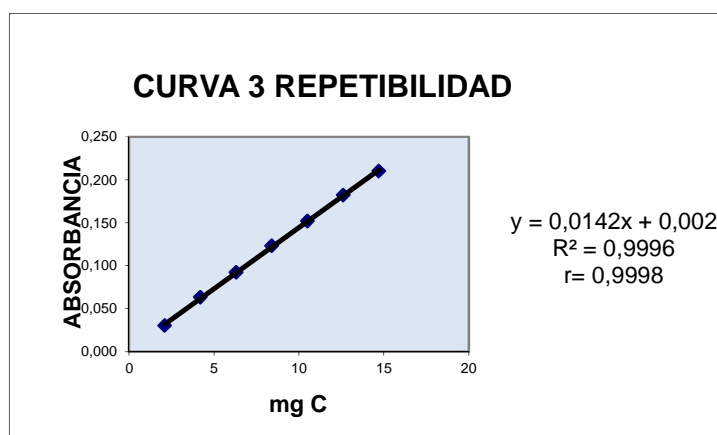
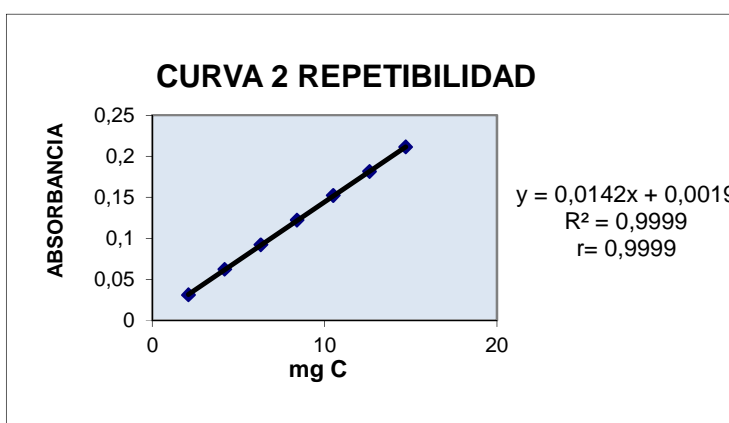
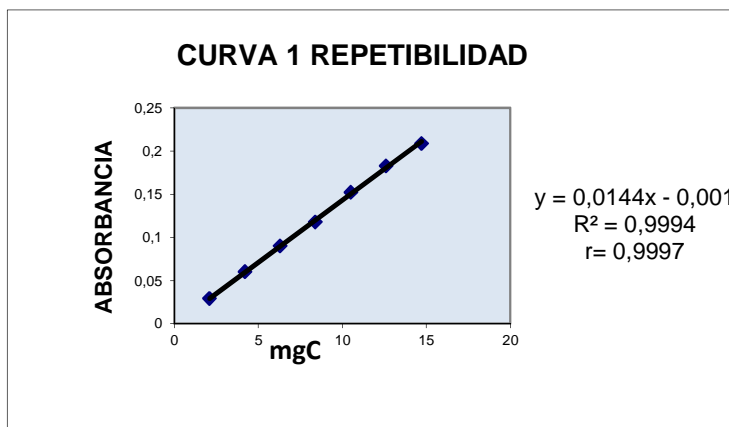
## ANEXO C

Cont. Curvas individuales de linealidad instrumental.



## ANEXO D

### Curvas individuales de repetibilidad



## ANEXO E

### POE: PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA POR COLORIMETRÍA.

DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGANICA (MÉTODO COLORIMÉTRICO)					
Folio No.: POE procedimientos					
Archivo electrónico: C:\LABSUELOS\DOCUMENTOS \ POES DE PROCEDIMIENTOS\ DETERMINACION DE CARBONO ORGANICO COLORIMETRÍA.DOC					
POE TIPO Y No.	M-1	ELABORADO POR	_____	<u>VAMP</u> Código	Fecha 13/01/10
Revisión No.	1		Firma		
Fecha efectiva:	13/01/2010	AUTORIZADO POR	_____	<u>ISBR</u> Código	Fecha 13/01/10
Total de páginas:	5		Firma		

#### OBJETIVO

Este POE describe el procedimiento que se debe seguir para la determinación de carbono orgánico en suelos mediante la oxidación del carbono orgánico con dicromato de potasio y ácido sulfúrico concentrado, la determinación se realiza por espectrofotometría visible y la cuantificación mediante curva de calibración. La metodología ha sido implementada y validada en el Laboratorio de Suelos de la Secretaría de Desarrollo Agropecuario y Minero del Cauca (SDAM).

#### NOTAS DE SEGURIDAD

- Use guantes, bata, protección respiratoria y gafas protectoras todo el tiempo.
- El proceso de oxidación de la muestra se debe realizar en campana extractora debido a la emisión de vapores ácidos.

#### ALCANCE

Este procedimiento aplica para muestras de suelo con contenidos de carbono orgánico entre 0.699 % y 14.72 % C<sub>org</sub>. Para muestras con % C<sub>org</sub> superior a este rango se deben realizar las diluciones requeridas para que las muestras puedan ser cuantificadas.

## Reactivos

- Sacarosa (Merck).
- Dicromato de Potasio (99,9% Merck).
- Ácido Sulfúrico Concentrado (Pureza: 95-97 %, Merck).
- Agua Destilada.

## 1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

### 1.1 SOLUCIÓN PATRÓN DE SACAROSA AL 5 %.

Pese 12,56 g Sacarosa en un vaso de precipitados de 250 mL limpio y seco, disuelva en agua destilada y afore a 250 mL.

### 1.2 CURVA DE CALIBRACIÓN INSTRUMENTAL

Prepare una curva de calibración de sacarosa por dilución de la solución patrón (aprox. 5%) preparada en el numeral 1.1, de la siguiente manera:

- 1.2.1 Prepare 8 balones aforados de 100 mL clase A, limpios y secos.
- 1.2.2 Marque los balones con N y # según nivel de la curva.
- 1.2.3 Prepare un bureta de 25 mL (Clase A o B) y un vaso de 50 mL limpio y seco.
- 1.2.4 Llene el vaso con aproximadamente 40 mL de la solución patrón de sacarosa preparada en el numeral 1.1.
- 1.2.5 Purgue la bureta de 25 mL adicionando en ella aproximadamente 5 mL de la solución contenida en el vaso.
- 1.2.6 Descarte los 5 mL de la solución patrón de sacarosa adicionados como purga en la bureta.
- 1.2.7 Llene la bureta con la solución de sacarosa contenida en el vaso de 50 mL.
- 1.2.8 Verifique la ausencia de burbujas de aire en el extremo inferior de la bureta.
- 1.2.9 Al balón N1 adicione agua destilada y afore (PARA EL BLANCO).
- 1.2.10 Al balón N2 adicione aprox. 5 mL de la solución patrón.
- 1.2.11 Al balón N3 adicione aprox. 10 mL de la solución patrón.
- 1.2.12 Al balón N4 adicione aprox. 15 mL de la solución patrón.
- 1.2.13 Al balón N5 adicione aprox. 20 mL de la solución patrón.
- 1.2.14 Al balón N6 adicione aprox. 25 mL de la solución patrón.
- 1.2.15 Al balón N7 adicione aprox. 30 mL de la solución patrón.
- 1.2.16 Al balón N8 adicione aprox. 35 mL de la solución patrón.
- 1.2.17 Lleve a volumen cada uno de los balones con agua destilada.
- 1.2.18 Agite vigorosamente cada balón para homogenizar.

### 1.3 SOLUCION DE DICROMATO DE POTASIO 1 N.

Adicione aproximadamente 40 g de dicromato de potasio a una caja de petri limpia y seca. Lleve la caja de petri con el Dicromato a la estufa a 105 °C: Mantenga el dicromato en la estufa durante 2 h, cumplido este periodo de tiempo retire la caja petri con el dicromato de la estufa y llévela al desecador.

En vaso de precipitados de 250 mL limpio y seco, pese 12,52 g de dicromato de potasio previamente seco a 105 °C. Disuelva con agua destilada y afore a 250 mL. Cubra el balón con papel aluminio, y manténgalo en un lugar fresco.

## 2. ANÁLISIS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

- 2.1.1 Prepare 8 erlenmeyers de 250 mL limpios y secos.
- 2.1.2 Marque los erlenmeyers con N y # según nivel de la curva.
- 2.1.3 Tome 2 mL de cada una de las soluciones empleando pipetas aforadas de 2 mL (clase A) y añádalos al erlenmeyer correspondiente.
- 2.1.4 Lleve los erlenmeyers de 250 mL a la campana de extracción.
- 2.1.5 Ponga en funcionamiento la campana de extracción.
- 2.1.6 Empleando una pipeta aforada de 5 mL (clase A) añada 5 mL de dicromato de potasio 1 N a cada uno de los erlenmeyer.
- 2.1.7 Inmediatamente después añada lentamente a cada erlenmeyer 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (pureza = 95-97 %) empleando una pipeta aforada de 10 mL (clase A). **Nota:** La reacción es fuertemente exotérmica, con desprendimiento abundante de vapores ácidos.
- 2.1.8 Agite vigorosamente durante aproximadamente 1 min.
- 2.1.9 Deje en reposo durante 30 min.
- 2.1.10 Adicione 135 mL de agua destilada.
- 2.1.11 Homogenice mediante agitación y traslade los erlenmeyers al lugar más cercano al espectrofotómetro.
- 2.1.12 Deje decantar durante un periodo de 12 horas.
- 2.1.13 Con la ayuda de una pipeta tome cuidadosamente las alícuotas de cada sobrenadante y adiciónelas a la celda.
- 2.1.14 Lea la absorbancia de cada sobrenadante a una longitud de onda de 585 nm, llevando el equipo a cero con un blanco de reactivos.

**Nota:** Realice un blanco de reactivos adicionando a un erlenmeyer de 250 mL limpio y seco 5 mL de Dicromato de potasio 1 N, 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (pureza = 95-97 %) y 135 mL de agua destilada, siguiendo el procedimiento descrito en los ítems 2.1.1 a 2.1.14.

### 3. PREPARACIÓN DE LA MATRIZ

- 3.1 La muestra debe ser en cantidad suficiente (1kg o más).
- 3.2 Empaque en bolsa plástica identificándola con nombre de la finca, vereda, municipio, fecha de muestreo.
- 3.3 Determine la humedad de campo según el manual.
- 3.4 Extienda la muestra sobre hojas de papel Kraft y seque al aire en un lugar seco y a la sombra.
- 3.5 La muestra seca se muele y se pasa por un tamiz de 2 mm.
- 3.6 Determine la humedad higroscópica según el manual.

### 4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

#### 4.1 HOMOGENIZADO DE LA MATRIZ

- 4.1.1 Con cuidado extienda la totalidad de la muestra sobre hojas de papel.
- 4.1.2 Mezclar tirando de las esquinas opuestas, alternando las diagonales.
- 4.1.3 Luego dividir en 4 partes, de las cuales se guardan dos partes opuestas.
- 4.1.4 Volver a mezclar y repetir el cuarteo alternando las diagonales.
- 4.1.5 Realice este procedimiento hasta obtener aproximadamente 1 g de muestra.

#### 4.2 TOMA Y ANÁLISIS DE LA PORCIÓN ANALÍTICA

##### 4.2.1 Oxidación de la muestra.

- 4.2.1.1 En un erlenmeyer de 250 mL limpio y seco, pese 0,1 g del suelo previamente cuarteado.
  - 4.2.1.2 Lleve el erlenmeyer de 250 mL con la muestra a la campana de extracción.
  - 4.2.1.3 Ponga en funcionamiento la campana de extracción.
  - 4.2.1.4 Empleando una pipeta aforada de 5 mL (clase A) añada 5 mL de dicromato de potasio 1 N.
  - 4.2.1.5 Inmediatamente después añada lentamente 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (pureza = 95-97 %) empleando una pipeta aforada de 10 mL (clase A).
- Nota:** La reacción es fuertemente exotérmica, con desprendimiento abundante de vapores ácidos.
- 4.2.1.6 Agite vigorosamente durante aproximadamente 1 min.
  - 4.2.1.7 Deje en reposo durante 30 min.
  - 4.2.1.8 Adicione 135 mL de agua destilada.
  - 4.2.1.9 Homogenice mediante agitación y traslade el erlenmeyer al lugar más cercano al espectrofotómetro.

**4.2.1.10** Deje decantar durante un periodo de 12 horas.

**4.2.1.11** Con la ayuda de una pipeta tome cuidadosamente una alícuota del sobrenadante y adiciónela a la celda.

**4.2.1.12** Lea la absorbancia a una longitud de onda de 585 nm, llevando el equipo a cero con un blanco de reactivos.

## 5 RECUPERADOS DE CONTROL

El recuperado control se obtiene con un nivel intermedio de la curva de calibración por ejemplo al N4 interpolando la absorbancia obtenida para este patrón en la curva de calibración. Los miligramos de carbono obtenidos mediante interpolación se consideran experimentales (mg  $C_{exp}$ ) y los mg de carbono teóricos (mg  $C_{teor}$ ) corresponden al valor teórico al cual se preparó dicho nivel en este caso aprox. 6,31 mg de carbono. El porcentaje de recuperación se calcula a través de la siguiente ecuación:

$$\% R = \frac{mg C_{exp}}{mg C_{teor}} \times 100$$

El desempeño de la metodología se verifica mediante el % R, el cual debe encontrarse dentro del intervalo de confianza establecido para este parámetro durante la validación de la metodología, este y otros parámetros importantes como la precisión (% C.V) y los límites críticos (LOD y LOQ) se presentan en la tabla N° 1.

**Tabla N° 1** Exactitud, precisión y límites críticos para la metodología.

% R $\pm$ sz/ $\sqrt{n}$	% C.V máx.	Límite Detección (mg/Kg)	Límite Cuantificación (mg/Kg)
99,53 $\pm$ 0,9	4,10	0,210	0,704

\*%R: porcentaje de recuperación; % C.V: Coeficiente de Variación; LD: Límite de Detección; LC: Límite de Cuantificación.

## 6 MANEJO DE RESULTADOS

Todos los resultados obtenidos en la experimentación (análisis de curvas de calibración, recuperado control, análisis de blancos y muestras, cálculos y resultados) deben ser archivados en la carpeta de servicios.

Expresar los resultados en porcentaje de carbono (% C). Para ello aplique la siguiente ecuación:

$$\% C = \frac{mg C_{exp} \times (100 + P_w)}{g suelo \times 1000}$$

Dónde:

**mg C<sub>exp</sub>**: miligramos de C obtenidos al interpolar la absorbancia de la muestra en la curva de calibración.

**g suelo**: gramos de suelo empleados para el análisis.

**P<sub>w</sub>** : porcentaje de humedad higroscópica de la muestra en análisis.

El reporte de M.O en un análisis de realizado en el laboratorio de la SDAM se debe expresar como: M.O (mgC) = valor medido ± (valor medido × 0,158).



## 7 REFERENCIAS

- Arrieche I.; Pacheco Y. Determinación de carbono orgánico en muestras de suelos mediante dos procedimientos analíticos. Revista Venesuelos, Vol. 6, N° 1 y 2, 1998.
- García Galvis J.; Ballesteros González M. I. Evaluación de parámetros de calidad para la determinación de carbono orgánico en suelos. Revista Colombiana de Química, Vol. 34, N° 2, 2005, p.p: 201-209.
- Bravo I., Giraldo E. Manual de Prácticas de Laboratorio de Química Agrícola: Análisis de Suelos. Universidad del Cauca, 1999.