

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE FOSFORO TOTAL, FENOLES Y NITRATOS PARA  
TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES EN CONSTRUCCIONES  
SUMINISTROS LTDA.**



**BREIDY SAMBONI PALECHOR**

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

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**POPAYAN**

**2017**

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE FOSFORO TOTAL, FENOLES Y NITRATOS PARA  
TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES EN CONSTRUCSUELOS  
SUMINISTROS LTDA.**

**Proyecto De Trabajo De Grado En Modalidad De Pasantía Requisito  
Parcial Para Optar El Título de Químico.**

**BREIDY SAMBONI PALECHOR**

**Director:**

**Ph.D. EDIER HUMBERTO PEREZ**

**DIRECTOR GRUPO DE INVESTIGACIÓN AGROQUÍMICA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

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

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**POPAYAN**

**2017**

## Nota de aceptación

---

---

---

---

Director \_\_\_\_\_  
Dr. Edier Humberto Perez

Jurado \_\_\_\_\_  
Dr. German Cuervo Ochoa

Jurado \_\_\_\_\_  
Dr. Rodrigo A. Sarria Villa

Lugar y fecha de sustentación: Popayán, 20 de Febrero de 2017

## DEDICATORIA

*Esta tesis va dedicada a mis padres.*

*A la memoria de mi padre que, aunque ya no esté conmigo, sé que se sentirá muy orgulloso por este logro.*

*A mi madre Luz Marina Palechor, porque sola ha sido capaz de afrontar las adversidades y darme apoyo cuando más lo necesitaba.*

*A mis "Padres Adoptivos" Dalia Amparo Otoy y Ruben Darío Vargas, porque literalmente se han comportado como otros padres que me han apoyado completa y desinteresadamente en todo este proceso educativo.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*A dios por haberme conducido por este camino dándome la sabiduría y la fortaleza para que sea posible alcanzar esta meta.*

*A mis padres, por apoyarme cuando a veces ni yo mismo creía en mí.*

*A la universidad del Cauca y al departamento de Química.*

*Al profesor Edier Humberto Pérez y la profesora Isabel Realpe por todas sus enseñanzas y valiosa colaboración con la que he podido salir adelante en este proceso.*

*A los profesores que me han dado clases, por sus enseñanzas y paciencia.*

*Al laboratorio de aguas de la empresa Construcsuelos Suministros Ltda. A Jhon Toro, Carolina Benavides, Yudi Vargas, compañeros y amigos.*

*A todos mis amigos de la universidad del Cauca, gracias por su tiempo, apoyo y todos los momentos compartidos.*

*A los jurados por tomarse su tiempo en la evaluación de este trabajo.*

*A esas personas que de una u otra forma fueron parte de este proyecto de vida y me brindaron su apoyo incondicionalmente,*

*Infinitas Gracias*

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág
<b>1. RESUMEN</b>	<b>13</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
2.1. NITRATOS	14
2.2. FÓSFORO	15
2.3. FENOLES	16
2.4. EFECTOS TOXICOLÓGICOS	17
2.5. TRATAMIENTOS	18
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	20
<b>4 FUNDAMENTO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE</b>	<b>21</b>
4.1 ACREDITACIÓN	21
4.2 VALIDACIÓN	21
4.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS, FÓSFORO TOTAL Y FENOLES	21
4.3.1 Determinación de nitratos	21
4.3.2 Determinación de fósforo total	22
4.3.3 Determinación de fenoles	23
4.4 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO	24
4.4.1 <i>Linealidad</i>	24
4.4.2 <i>Sensibilidad</i>	25
4.4.3 <i>Límites</i>	26
4.4.4 <i>Exactitud</i>	28
4.4.5 <i>Recuperación</i>	29
4.4.6 <i>Precisión</i>	30
4.4.7 <i>Incertidumbre</i>	31
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
4.5.1 <i>Pruebas de normalidad</i>	35
4.5.2 <i>Pruebas paramétricas</i>	35
4.5.3 <i>Pruebas no paramétricas</i>	37
<b>5 METODOLOGÍA</b>	<b>38</b>
5.1 EQUIPOS MATERIALES Y REACTIVOS	38
5.1.1 <i>Reactivos para análisis de nitratos</i>	38

5.1.2	<i>Reactivos para análisis de fósforo total</i>	38
5.1.3	<i>Reactivos para análisis de fenoles</i>	39
5.2	CONSERVACIÓN Y PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	39
5.3	CALIBRACIÓN DEL MATERIAL UTILIZADO EN LA VALIDACIÓN	40
5.4	VERIFICACIÓN DE LOS PARAMETRO ESTABLECIDOS EN LA LITERATURA	40
5.4.1	<i>Nitratos</i>	40
5.4.2	<i>Fósforo total</i>	43
5.4.3	<i>Fenoles</i>	44
5.5	PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN	45
<b>6</b>	<b>RESULTADOS Y ANÁLISIS</b>	<b>47</b>
6.1	INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL	47
6.2.	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	47
6.3	PRUEBAS DE NORMALIDAD	48
6.4	EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y LINEALIDAD DE LOS MÉTODOS	51
6.5	DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS	53
6.6	PRECISIÓN	53
6.6.1	<i>Repetibilidad</i>	54
6.6.2	<i>Reproducibilidad</i>	54
6.7	EXACTITUD	55
6.7.1	Sesgo	55
6.7.2	Porcentaje de recuperación	56
6.8	ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LOS MÉTODOS	57
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>60</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>61</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>64</b>

## LISTA DE TABLAS

		pg
<b>Tabla 1</b>	Influencia del pH en la estabilidad de la señal para el método del SS.	41
<b>Tabla 2</b>	Absorbancias obtenidas usando las condiciones propuestas en el método del SS <b>(a)</b> .	42
<b>Tabla 3</b>	Absorbancias obtenidas usando las condiciones alternativas para el método del SS <b>(b)</b> .	43
<b>Tabla 4</b>	Resultados absorbancia blanco de fenoles a diferentes valores de concentración de reactivos.	44
<b>Tabla 5</b>	Resultados absorbancia para estándar de fenol (0,05mg/L) a diferentes concentraciones de reactivos.	45
<b>Tabla 6</b>	Diferencia entre la absorbancia del estándar de fenol (0,05mg/L) y el blanco.	45
<b>Tabla 7</b>	Diseño experimental para la validación de los métodos de determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.	46
<b>Tabla 8</b>	Soluciones preparadas para la validación de los métodos de determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.	48
<b>Tabla 9</b>	Resultados curvas de calibración para la determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.	49
<b>Tabla 10</b>	Evaluación de la normalidad de los datos obtenidos en función del tiempo (días).	49
<b>Tabla 11</b>	Evaluación de la normalidad de los datos obtenidos en función de la concentración.	50
<b>Tabla 12</b>	Resultados prueba de Tukey.	50
<b>Tabla 13</b>	Evaluación del intervalo de respuesta lineal para los métodos de determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.	51

<b>Tabla 14</b>	Evaluación de la sensibilidad y linealidad para los métodos de determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.	<b>52</b>
<b>Tabla 15</b>	Resultados LDD y LDC para los métodos de determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.	<b>53</b>
<b>Tabla 16</b>	Evaluación de la repetibilidad para los métodos de determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.	<b>54</b>
<b>Tabla 17</b>	Evaluación de la reproducibilidad para los métodos de determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.	<b>55</b>
<b>Tabla 18</b>	Resultados evaluación del sesgo en la determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.	<b>56</b>
<b>Tabla 19</b>	Resultados evaluación del porcentaje de recuperación en la determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.	<b>57</b>
<b>Tabla 20</b>	Evaluación de la incertidumbre para los métodos de determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.	<b>58</b>

## LISTA DE FIGURAS

		Pg
<b>Figura 1</b>	Ciclo del nitrógeno.	15
<b>Figura 2</b>	Ciclo del fósforo.	16
<b>Figura 3</b>	Fenoles sintéticos catalogados como muy contaminantes por la EPA.	18
<b>Figura 4</b>	a) Gráfica para la determinación del rango lineal, b) Curva de calibración: respuesta vs concentración.	24
<b>Figura 5</b>	Variación de la pendiente.	26
<b>Figura 6</b>	Esquema para explicar la exactitud.	28
<b>Figura 7</b>	Recolección de muestra de agua residual.	39
<b>Figura 8</b>	Espectrofotómetro spectroquant.	41
<b>Figura 9</b>	Curva de calibración para la determinación de nitratos utilizando condiciones: a) Propuestas por el método del SS. b) Alternativas para el método del SS.	43
<b>Figura 10</b>	Curvas de calibración para la determinación de: a) nitratos, b) fósforo total y c) fenoles.	52
<b>Figura 11</b>	Gráfico de fuentes de incertidumbre.	58

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ANOVA	Análisis de varianza.
4-AAP	4-aminoantipirina.
b	Intercepto de la curva en el eje Y.
CE	Cloruro estañoso.
COT	Carbono orgánico total.
CV	Coefficiente de variación.
DBO	Demanda biológica de oxígeno.
DQO	Demanda química de oxígeno.
EPA	Environmental Protection Agency.
Fig	Figura.
gl	Grados de libertad.
H <sub>a</sub>	Hipótesis alternativa.
H <sub>0</sub>	Hipótesis nula.
ICONTEC	Instituto colombiano de normas técnicas y de verificación.
IDEAM	Instituto de hidrología, metrología y estudios ambientales.
IEC	International Electrotechnical Commission.
ISO	International Organization for Standardization.
IUPAC	International Union of pure and Applied Chemistry.
k	Factor de cobertura.
LC	Límite crítico.
LDD	Límite de detección.
LDC	Límite de cuantificación.
LMP	Límite máximo permitido.
LTDA	Limitada.
m	Pendiente de la curva.
n	Número de lecturas o valores observados.
NTC	Norma técnica Colombiana.
ONU	Organización de las naciones unidas.
r	Coefficiente de correlación.
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación.
R	Recuperación.

RSD	Desviación estándar relativa.
RSDt	Desviación estándar relativa total.
S	Desviación estándar.
SS	Salicilato de sodio.
t	Valor estimador de la t.student.
SM	Standar Methods.
UV-Vis	Ultravioleta-visible.
$\mu$	Incertidumbre.
$\alpha$	Probabilidad de error en $H_a$ .
$\beta$	Probabilidad de error en $H_0$ .

# IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE FOSFORO TOTAL, FENOLES Y NITRATOS PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES EN CONSTRUCSUELOS SUMINISTROS LTDA.

## 1 RESUMEN

La evaluación de la calidad del agua tiene un extenso número de parámetros que indican su grado de afectación, los nitratos, fenoles y la cantidad de fósforo total son algunas determinaciones que se realizan para establecer si un agua está o no contaminada, esto debido a que su presencia en el agua natural modifica procesos químicos y biológicos que pueden traer consigo afectaciones a ecosistemas y al hombre.

En este trabajo se implementan y validan los métodos analíticos para la determinación de nitratos por el método del salicilato de sodio (SS), fenoles por el método de la 4-aminoantipirina (4-AAP)(SM 5530 - B,C) y fósforo total por el método del cloruro estañoso (CE)(SM 4500-P B,D)<sup>[1,2]</sup>, en el laboratorio de aguas de la empresa Construcsuelos Suministros Ltda. (NEIVA), gracias al convenio 43299/008 acordado con la universidad del Cauca.

De la validación de las técnicas empleadas se dejó constancia documentada para el laboratorio de Construcsuelos suministros Ltda, donde se registran valores de coeficiente de variación porcentual menores al 10% y porcentajes de recuperación que van desde 97,26% hasta 102,37% para las metodologías validadas, se registraron límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC) de 0,07 mgN-NO<sub>3</sub>/L y 0,22 mgN-NO<sub>3</sub>/L, 0,03 mgP-PO<sub>4</sub>/L y 0,09 mgP-PO<sub>4</sub>/L y 0,04 mgFenol/L y 0,12mgFenol/L respectivamente, estos resultados indican que se pueden determinar de manera efectiva estos analitos para la matriz agua residual. <sup>[3,4]</sup>

Palabras claves: validación, nitratos, fósforo total, fenoles, aguas residuales.

## **2 INTRODUCCIÓN**

El agua es indispensable para la vida, necesario para la salud y es reconocido por la ONU como uno de los derechos humanos básicos. Por su importancia la calidad del agua es considerado un factor determinante en el bienestar humano.

Alrededor del 70% de nuestro planeta es agua y sigue un ciclo que permite el intercambio entre el agua de la atmósfera y la tierra esto es producido por la energía aportada por el sol y la fuerza de gravedad de la tierra. Este es un sistema de purificación natural muy conveniente para los seres vivos, sin embargo, las aguas naturales son el vertedero habitual de desechos provenientes de diferentes industrias, centros urbanos y aguas lluvias que llevan componentes que modifican su calidad, haciéndola no adecuada para un determinado uso o que causan un efecto perjudicial sobre los organismos vivos.

Una de las principales causas de la contaminación del agua es debido al crecimiento de los núcleos de población, que conlleva al aumento de la cantidad de agua residual. Por otro lado, el arrastre de suelo agrícola que lleva consigo compuestos naturales como agroquímicos y por el agua residual de los procesos industriales.

Existen diferentes formas para evaluar la calidad del agua y son llamados indicadores de calidad, estos pueden ser parámetros físicos, químicos o biológicos. Entre los parámetros físicos más comunes se encuentran la conductividad, el color, la temperatura, el olor, la turbidez. Los indicadores químicos más comunes son el pH, la dureza, la alcalinidad, indicadores de contaminación orgánica (DBO, DQO, COT), fósforo total, indicadores de contaminantes inorgánicos (sulfatos, nitratos, fosfatos, cloruros), fenoles, metales pesados. Algunos indicadores biológicos son, mesófilos, coliformes totales, E. coli, microinvertebrados bentónicos y macroinvertebrados. <sup>[5,6]</sup>

Independientemente del uso que se le dé al agua, el ser humano debe asegurarse de la ausencia de contaminantes químicos orgánicos e inorgánicos o metales pesados que pueden proceder de fuentes industriales, de la escorrentía superficial urbana y de campos agrícolas, a continuación, se hace una breve introducción a los analitos tratados en este documento.

### **2.1 NITRATOS**

Los iones nitrato son iones inorgánicos de origen natural que forman parte del ciclo del nitrógeno, en primera instancia se forma amoníaco por acción de la descomposición microbiana de la materia orgánica, luego se da la formación de iones nitrito por nitrosación, por nitratación se convierten en iones nitrato, el ciclo se esquematiza en la figura 1.

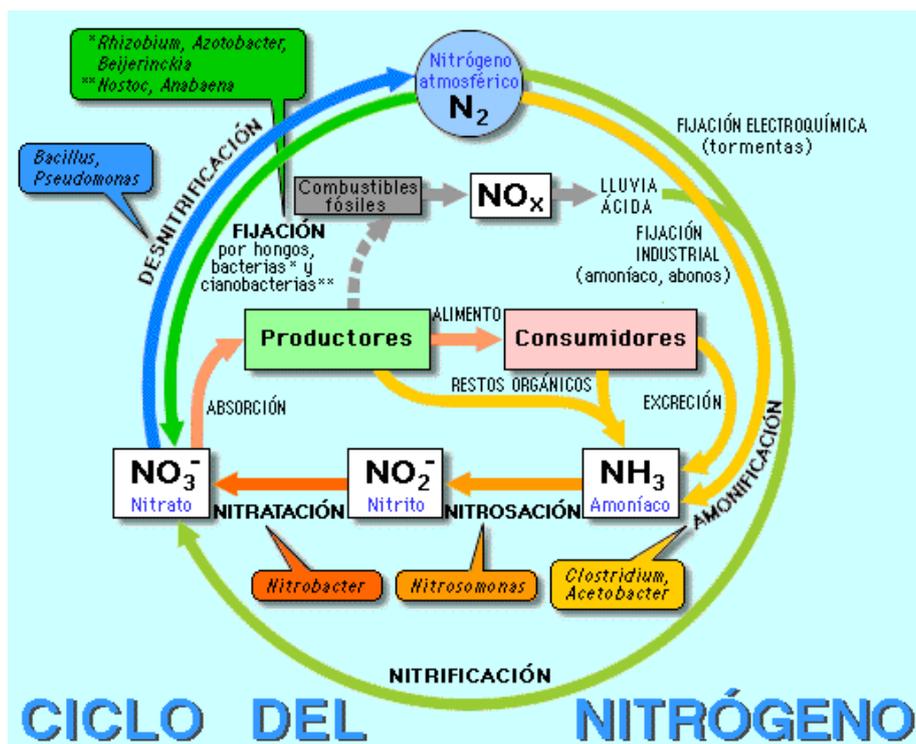


Fig 1: Ciclo del nitrógeno. [7]

El ion nitrato dada su alta polaridad es muy soluble en agua, siendo la forma del nitrógeno más estable termodinámicamente en presencia de oxígeno.

Su presencia es natural como se observa en el ciclo del nitrógeno, cualquier alteración antropogénica modificará las concentraciones normales de nitratos.

Entre las alteraciones más importantes se encuentra la emisión de óxidos nitrogenados provenientes de las zonas urbanas, la fijación industrial de nitrógeno, el uso de fertilizantes nitrogenados, el uso de aditivos alimentarios y la disposición de los desechos municipales e industriales. [8], el límite permisible de descarga de nitratos a un cuerpo de agua dulce es de 10 mg N-NO<sub>3</sub>. [9,10]

## 2.2 FÓSFORO

Las rocas fosfatadas son la principal fuente de fósforo, mediante la meteorización liberan el fósforo en forma de fosfatos, estos pasan a las plantas por el suelo y posteriormente a los animales. Cuando se excretan, los organismos descomponedores vuelven a producir los fosfatos, el ciclo del fósforo se ilustra en la figura 2.

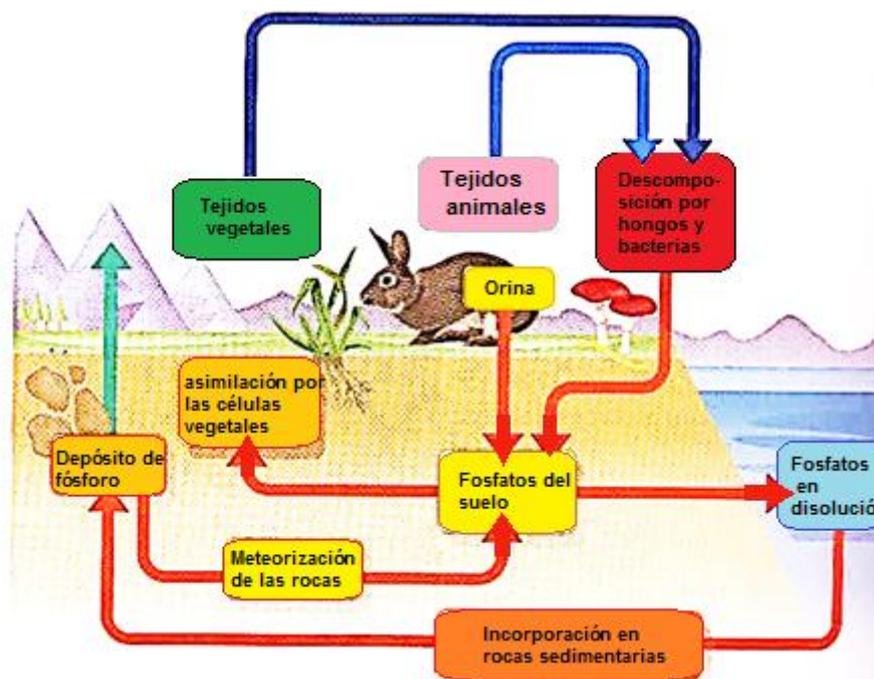


Fig 2: Ciclo del fósforo.<sup>[11]</sup>

Alteraciones antropogénicas como las emisiones de grandes cantidades de fosfatos al ambiente debido a la minería, los cultivos y sistemas deficientes de purificación de aguas residuales producen altas concentraciones de fósforo en los cuerpos de agua donde se produce un incremento desmesurado de algas y otros microorganismos, generando problemas ambientales cuando estos mueren y comienza el proceso de descomposición, consumiendo gran cantidad de oxígeno disuelto en el agua (eutrofización) dejándola poco apta para la mayoría de seres vivos <sup>[12,13]</sup>, por esta razón se han impuesto límites de descarga en alcantarillado de 15mgP-PO<sub>4</sub>/L.<sup>[9,10]</sup>

### 2.3 FENOLES

El fenol como sus derivados son utilizados en una amplia variedad de industrias como la fabricación de resinas sintéticas, colorantes, medicamentos, plaguicidas, explosivos, polímeros, biocidas, plastificantes, aditivos de aceite entre otros.

Los fenoles naturales como la vitamina E o la vainilla son fácilmente degradados por los microorganismos, caso contrario que ocurre con los fenoles sintéticos, debido a que estos compuestos suelen ser tóxicos y al no poder ser degradados presentan una alta bio-acumulación en los cuerpos de agua.

Los niveles de fenol en aguas naturales se ven aumentados por la contaminación de aguas residuales industriales y domésticas, así como por la degradación de pesticidas, fungicidas y herbicidas <sup>[14]</sup>, es por esto que se ha determinado un nivel de concentración máximo permisible para descarga en alcantarillado, en Colombia ese nivel es de 0,2mgFenol/L. <sup>[9,10]</sup>

Para conocer los niveles de afectación por compuestos orgánicos, inorgánicos o metales al recurso hídrico se debe contar con métodos y técnicas de análisis

implementadas y validadas, estas validaciones se realizan con el fin de asegurar la calidad de las mediciones que permitan dar una estimación de la calidad del agua.

Los laboratorios ambientales encargados del análisis de aguas requieren la implementación de métodos validados con resultados rápidos, alto grado de confianza y económicos.

Por esta razón el laboratorio de aguas de la empresa Construcsuelos Suministros LTDA. Implementó su sistema de gestión de calidad bajo la norma ISO/NTC 17025 “Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayo y calibración” ante el instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales (IDEAM) encargado de la acreditación de los laboratorios en el sector ambiental. En este estudio se tiene como propósito la implementación y validación de técnicas analíticas para la determinación de nitratos (método del SS), fósforo total (SM 4500-P B, D) y fenoles (SM 5530- B, C) en aguas residuales.

Para la validación de las técnicas se dejó evidencia documental para el laboratorio de aguas de la empresa Construcsuelos Suministros LTDA. donde se presenta los resultados obtenidos dejando constancia de su precisión y exactitud dentro de los parámetros establecidos para demostrar competitividad de las técnicas, entre estos se encuentran: Linealidad e intervalo de respuesta lineal, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud e incertidumbre.<sup>[3,4]</sup>

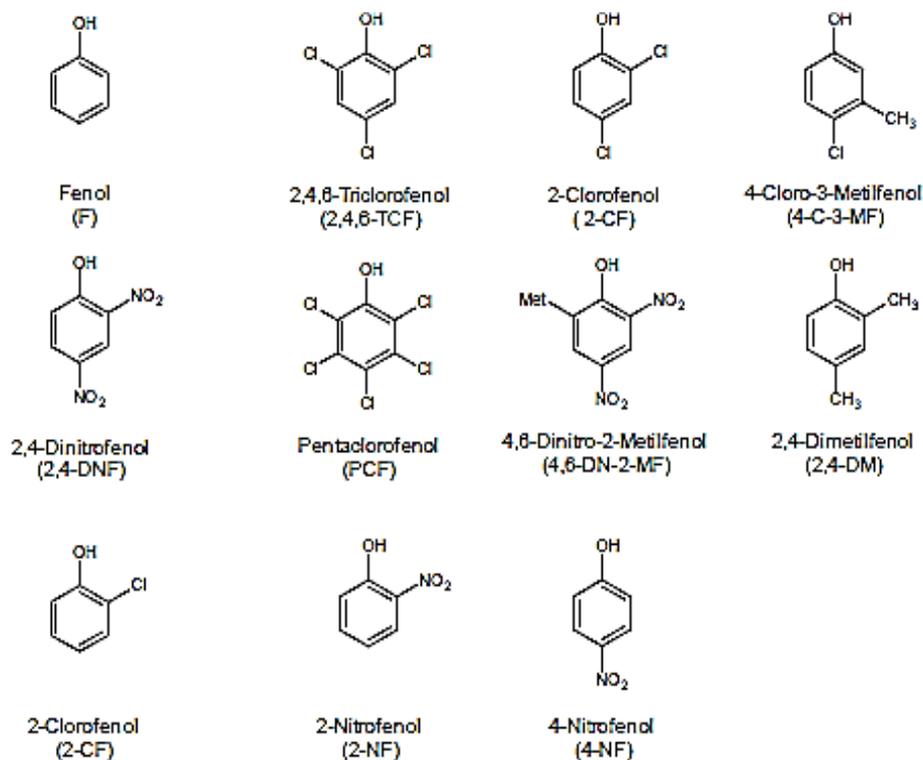
## **2.4 EFECTOS TOXICOLÓGICOS**

El nitrato puede ocasionar problemas en la salud humana cuando es ingerido ya que es transformado por la nitrato reductasa en nitrito y este reacciona con el ión ferroso ( $Fe^{2+}$ ) de la desoxihemoglobina formando metahemoglobina donde el hierro se encuentra en estado férrico ( $Fe^{3+}$ ) por lo que es incapaz de transportar el oxígeno, esta enfermedad conocida como metahemoglobinemia reduce el transporte de oxígeno, generando cianosis y en concentraciones más altas asfixia, pueden causar la formación endógena de N-nitrosocompuestos, de efectos cancerígenos (como las nitrosaminas).<sup>[15]</sup>

El fósforo ocasiona problemas medioambientales en gran medida debido a que su acumulación junto con el nitrógeno proveniente de sus diferentes formas, contribuye en la eutrofización, en la salud humana pueden presentarse problemas respiratorios y compuestos como fertilizantes a base de fósforo pueden producir muertes fetales y malformaciones.<sup>[13,16]</sup>

Los fenoles producidos de manera natural se degradan fácilmente por lo que no presenta bio-acumulación, sin embargo, los fenoles producidos de manera sintética, en especial los catalogados como “compuestos refractarios” presentan una baja degradabilidad y una larga permanencia en los cuerpos de agua, razón por la cual la Agencia para la Protección del Ambiente de Estados Unidos (EPA) los clasifica como agentes contaminantes medioambientales de

gran importancia. En la figura 3 se presenta algunos fenoles sintéticos que son considerados como muy contaminantes por la EPA. <sup>[17]</sup>



**Fig 3:** Fenoles sintéticos catalogados como muy contaminantes por la EPA. <sup>[17]</sup>

Los fenoles actúan como un veneno protoplasmático que daña todo tipo de células, puede ocasionar problemas sobre el sistema nervioso central y dependiendo del nivel de exposición puede ocurrir la muerte en un corto lapso de tiempo, además, puede causar perturbaciones intestinales, fallos en el sistema circulatorio y riñón, edema pulmonar. <sup>[18]</sup>

## 2.5 TRATAMIENTOS

Para las aguas que se encuentran con niveles altos de nitratos se debe tener en cuenta que el nitrato es un ion muy estable y altamente soluble por lo que tratamientos de filtración o ablandamiento no son adecuados, existen métodos físico químicos efectivos para la eliminación de este contaminante, uno comúnmente usado por los bajos costos es el de intercambio iónico, mediante el uso de columnas de resina de cloruro o bicarbonato donde el nitrato es intercambiado. <sup>[19]</sup>

Otro tratamiento es la ósmosis inversa, que consiste en forzar el movimiento del agua en sentido inverso a través de una membrana semipermeable dejando las especies como el nitrato al otro lado de la membrana. <sup>[19]</sup>

El uso de bacterias nitrificantes y desnitrificantes son usadas comúnmente para la remoción de compuestos nitrogenados en general, donde se convierte la mayoría de compuestos nitrogenados en nitrato y luego con el uso de bacterias

desnitrificantes el nitrato es convertido en nitrógeno que es liberado a la atmósfera.<sup>[20]</sup>

Para el tratamiento de aguas contaminadas con fósforo en forma de fosfatos se utiliza principalmente la precipitación usando cal apagada, para diferentes compuestos de fósforo se usan bacterias específicas llamadas bacterias acumuladoras de polifosfatos que acumulan grandes cantidades de fósforo en sus células, los biosólidos obtenidos pueden ser usados como fertilizantes.

Para el tratamiento de aguas contaminadas con fenoles tiene gran interés la aplicación del proceso de Fenton debido al bajo costo, baja toxicidad y el exceso se descompone en productos inocuos, además, los requerimientos de equipos son bajos y las condiciones de reacción son suaves, tiene inconvenientes con la cantidad de peróxido que se debe utilizar y la necesidad de etapas posteriores para la eliminación de hierro.<sup>[21]</sup>

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Validar los métodos analíticos para la determinación de fósforo total, nitratos y fenoles en aguas residuales en el laboratorio de análisis de aguas de la empresa **CONSTRUCSUELOS SUMINISTROS LTDA.**

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Implementar y validar la metodología del cloruro estañoso para la determinación de fósforo total SM 4500-P B, D.
- Implementar y validar la metodología del salicilato de sodio para la determinación de nitratos.
- Implementar y validar la metodología de la 4-aminoantipirina para la determinación de fenoles SM 5530- B, C.
- Establecer los protocolos de procedimiento para la determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.

## 4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### 4.1 ACREDITACIÓN

La acreditación es la herramienta establecida a escala internacional para generar confianza sobre la actuación de un tipo de organización: que se denominan de manera general Organismos de Evaluación de la conformidad y que abarca a los Laboratorios de ensayo, Laboratorios de Calibración, Entidades de inspección, Entidades de Certificación y Verificadores Ambientales. El proceso de acreditación de un laboratorio ante una organización como el IDEAM y bajo la norma NTC ISO 17025, proporciona reconocimiento y confianza de la precisión de los resultados entregados.

**ISO/IEC 17025.** La norma internacional ISO/IEC 17025 fue ratificada por el Concejo Directivo en 2005-10-26. En esta norma se establecen los requisitos generales para la competencia de laboratorios en la realización de muestreos, ensayos y calibraciones, que al cumplirlos se debe demostrar que funcionan con un sistema de calidad, que son técnicamente competentes y se encuentran capacitados para generar resultados válidos y confiables. <sup>[4,22]</sup>

### 4.2 VALIDACIÓN

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.

En este sentido, es importante que para el proceso de validación se asigne a un responsable de realizar dicha tarea. De manera que la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable. <sup>[23]</sup>

Para este trabajo se propone realizar una validación menor, puesto que se trata con métodos normalizados y se adecúan haciendo mínimas modificaciones o ninguna.

### 4.3 METODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS, FÓSFORO TOTAL Y FENOLES.

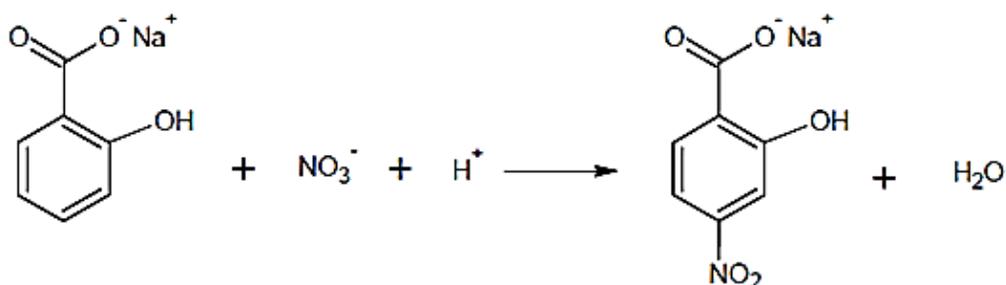
Existen varios métodos para la determinación de nitratos, fósforo total y fenoles, la mayoría de los laboratorios se guían por el libro standar methods<sup>[1]</sup>, en nuestro caso la determinación de fósforo total y fenoles se guía siguiendo esta referencia. Para nitratos la determinación se realiza siguiendo el método del SS aprobado por el IDEAM y descrito en el libro de Rodier <sup>[2]</sup>, puesto que este procedimiento se ajusta mejor a la matriz agua residual.

#### 4.3.1. DETERMINACIÓN DE NITRATOS

Los nitratos presentan una gran cantidad de interferentes en especial con la materia orgánica por lo que es recomendado que para su determinación la muestra sea filtrada por membrana de 0,45µm; la mayoría de los métodos espectrofotométricos que buscan la determinación de nitratos implican la

formación de compuestos azoicos cuya intensidad del color es función del tiempo y de la temperatura por lo que se debe tener muy en cuenta a la hora de realizar la medida por espectrofotometría UV-Vis. Algunos de los métodos espectrofotométricos utilizados para la determinación de nitratos son los basados en el uso de ácido cromotrópico, ácido fenoldisulfónico, brucina y SS.<sup>[1]</sup>

El método se basa en la nitración del SS en condiciones ácidas produciéndose p-nitrosalicilato de sodio ( Reacción 1); los iones nitronio ( $\text{NO}_2^+$ ) sufren reacciones de diazotización al reaccionar con el hidróxido de sodio y tartrato de sodio y potasio produciendo un compuesto coloreado (amarillo) el cual es medido a una longitud de onda de 415nm.



### Reacción 1

El procedimiento implica llevar a sequedad la muestra con SS antes de agregar el medio ácido, esto conlleva gran laboriosidad, lentitud y limitación del número de muestras que se pueden analizar, sin embargo, el color que se desarrolla es estable por un periodo cercano a 2 días.<sup>[2, 24]</sup> (anexo 1a).

#### 4.3.2 DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL

Para la determinación de fósforo total se debe realizar primero una digestión con ácido sulfúrico y persulfato de amonio con el fin de obtener todo el fósforo como ortofosfatos y estos se pueden determinar por diferentes métodos, entre los métodos más usados está el del ácido vanadomolibdofosfórico, ácido ascórbico y el del CE.

Para un rango de 1 a 20 mgP- $\text{PO}_4/\text{L}$  el método del ácido vanadomolibdofosfórico es el más indicado, consiste en la reacción entre los ortofosfatos y el molibdato de amonio en condiciones ácidas para generar el ácido fosfomolibdico.

El método del ácido ascórbico trabaja en un rango de 0,01 a 6 mgP- $\text{PO}_4/\text{L}$ , se basa en la reacción entre el tartrato de antimonio y potasio, y el molibdato de amonio en medio ácido con los ortofosfatos formando el ácido fosfomolibdico el cual se reduce por el ácido ascórbico a azul de molibdeno que es fuertemente coloreado.<sup>[1]</sup>

El método escogido es el del cloruro estañoso descrito por el método SM 4500-P B, D ya que presenta gran sensibilidad con un rango de trabajo de 0,01 a 6mgP-PO<sub>4</sub>/L.

Se basa en la reacción de los ortofosfatos con el ácido molíbdico para formar el ácido 12-molibdofosfórico que posteriormente es reducido por el cloruro de estaño a azul de molibdeno, compuesto de composición desconocida que contiene una mezcla de Mo (VI) y Mo (V) (Reacción 2), se mide su absorbancia por UV-Vis a una longitud de onda de 690nm teniendo en cuenta el tiempo en que se realiza la medida debido a que el compuesto formado es estable entre los 10 y 12 minutos<sup>[1]</sup> (Anexo 1b).

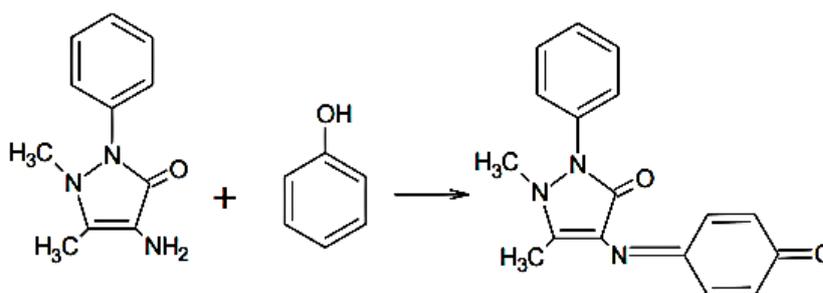


## Reacción 2

### 4.3.3 DETERMINACIÓN DE FENOLES

Los fenoles tienen varias reacciones de interés para su determinación por espectrofotometría, las más corrientes son las que generan colorantes azoicos debido a que presentan colores intensos permitiendo ser analizados en el espectro visible, sin embargo, la determinación de estos compuestos se hace sin tener en cuenta la distinción entre los diferentes compuestos. Los cinco métodos espectrofotométricos comúnmente usados para la determinación de bajas concentraciones de fenoles en aguas residuales y potables son: Gibbs, Nitrosfenol, 4-AAP, ultravioleta e infrarrojo.<sup>[1]</sup>

En estudios anteriores<sup>[25]</sup> se determinó que el método de la 4-AAP es el más rápido y con mayor precisión por lo que es el método seleccionado en este trabajo. La reacción entre el fenol y la 4-AAP se presenta en la reacción 3.



## REACCIÓN 3

El método colorimétrico de la 4-AAP se lleva a cabo como lo descrito en SM 5530- B, C, presenta una etapa de limpieza aprovechando la volatilidad de los fenoles donde se destilan y posteriormente se hacen reaccionar con 4-AAP a un pH de 7,9 ± 0.1; en presencia de ferricianuro de potasio forma un compuesto de color naranja rojizo que se puede medir por espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 500nm<sup>[1]</sup> (Anexo 1c).

## 4.4 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

Para demostrar objetivamente que se cumple con los requisitos exigidos para cada uno de los métodos se realiza la determinación estadística de figuras analíticas de mérito como son: intervalo de respuesta lineal, linealidad, sensibilidad, LDD, LDC, precisión, y exactitud. [3,23]

### 4.4.1 LINEALIDAD

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.

Con el fin de determinar el rango lineal se puede realizar un gráfico de respuesta versus concentración, que se conoce como Función Respuesta (normalmente llamada recta de calibrado). Ésta se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de trabajo de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo. En este sentido se recomienda abarcar valores desde cercano al cero y valores superiores al LMP (límite máximo permitido) o al valor de interés. El número de puntos a analizar deberá ser establecido por el analista (en general, se utiliza un mínimo de 4 valores). Luego de realizar el gráfico se puede observar el comportamiento de la curva y establecer cualitativamente el intervalo lineal (fig.4a). Después de establecer el comportamiento lineal del método se deberá realizar la Curva de trabajo o curva de calibración (fig.4b). Graficar los datos de concentración de la lectura observada (Y) v/s los estándares de calibración estimados (X). [23]

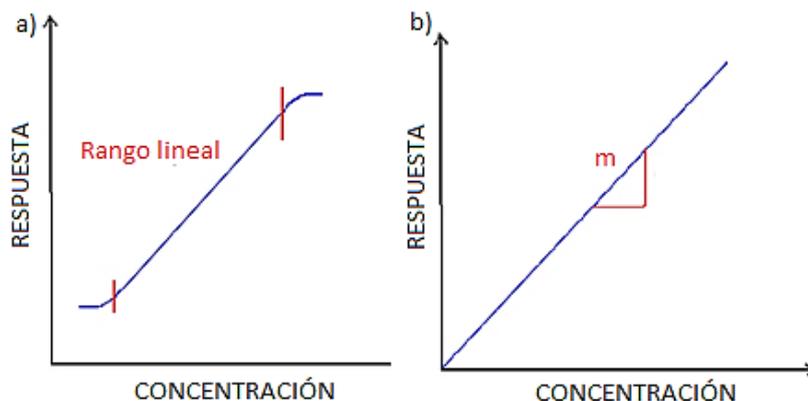


Fig 4 a) Gráfica para la determinación del rango lineal, b) Curva de calibración respuesta vs concentración

Evaluar los estimadores de regresión lineal del gráfico: pendiente (m), coeficiente de correlación (r), punto de corte (intercepto) con el eje de la ordenada (b).

$$Y = mx + b$$

**Ecuación 1**

En general el criterio de aceptación cualitativo que se usa para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación:

El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable concentración (X) y la variable respuesta (Y) de la curva de calibración. Los valores máximos que puede alcanzar son -1 y 1. El valor máximo de 1 indica una correlación positiva perfecta (entre X e Y) con una pendiente positiva. Cuando  $r=0$ , no existe correlación alguna, por lo que existiría independencia total de los valores X e Y. [23]

En la práctica si  $r$  tiene un valor cercano a uno (1), esto significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Para una curva de calibración o trabajo, es recomendable que el coeficiente de correlación obtenido sea mayor o igual a 0,999, aunque para el caso de trazas se admite un valor igual o mayor que 0,99.

Se puede realizar una evaluación de curva de calibración global (construida con más de una curva de calibración de las mismas características) en la cual se puede realizar una evaluación estadística de prueba t-Student, como un mejor indicador del modelo lineal. Se calcula un valor de  $t$  con  $n-2$  grados de libertad y se compara con el valor tabulado de  $t$  para el nivel de confianza requerido ( $\alpha = 0,05$ ), dos-colas, en este caso para un "n" (observaciones) que depende de los niveles de calibración.

Se desea probar si existe entonces una correlación significativa: La hipótesis nula  $H_0$  es que no existe correlación entre X e Y. Si el valor observado de  $t_r$  es mayor que  $t_{cri}$ , se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ , siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada. [23]

$$t_r = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

$t_r$  = Valor del estimador t Student obtenido para el coeficiente de correlación.

$|r|$  = Valor absoluto del coeficiente de correlación.

$n - 2$  = Número de grados de libertad.

$r^2$  = Valor del coeficiente de determinación.

#### 4.4.2 SENSIBILIDAD

La sensibilidad es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición. [23]

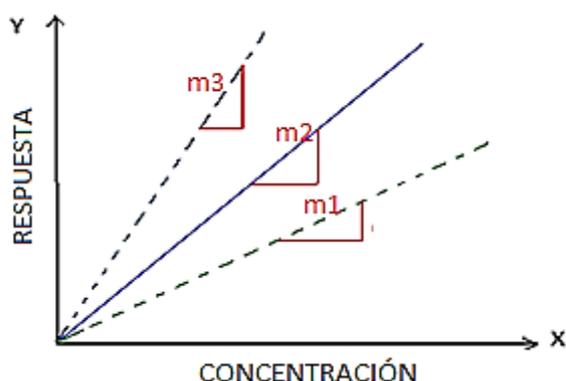
En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente ( $m$ ) de la recta de calibración.

Se calcula como:

$$m = \frac{\sum X_i Y_i - (\sum X_i \sum Y_i / n)}{\sum X_i^2 - ((\sum X_i)^2 / n)} \quad \text{Ecuación 3}$$

El valor de sensibilidad obtenido (m) debe permitir una adecuada discriminación de los valores de concentración en base a la lectura.

En la figura 5, se puede observar que mientras más próxima al eje de las Y esté la recta, significa que a ligeros cambios en las concentraciones esperadas habrá grandes variaciones en los resultados de las lecturas observadas ( $m_3$ ) En el caso de ( $m_1$ ) grandes cambios en la concentración no son significativos para la lectura.



**Fig 5:** Variación de la pendiente, a una mayor pendiente mejor discriminación de datos. <sup>[23]</sup>

Se dice, que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito. <sup>[23]</sup>

#### 4.4.3 LÍMITES

Se debe tener en consideración los siguientes parámetros: Valor crítico, límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC).

Valor crítico (LC): El valor de la concentración o cantidad neta que en caso de superarse da lugar, para una probabilidad de error dada  $\alpha$ , a la decisión de que la concentración o cantidad del analito presente en el material analizado es superior a la contenida en el material testigo. <sup>[23]</sup>

Se recomienda para su cálculo a lo menos seis mediciones de blanco matriz o testigo reactivo.

$$LC = t(1-\alpha; gl) S_0 \quad \text{Si: } t(0,05, \infty) \rightarrow 1,645 \quad LC = (1,645)S_0 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

t = t-Student.

1- $\alpha$ = probabilidad b.

gl= Grados de libertad.

S<sub>0</sub> = Desviación estándar de las lecturas del blanco matriz o testigo reactivo.

Un resultado inferior al LC que determine la decisión “no detectado” no deberá interpretarse como demostración de que el analito está ausente. No se recomienda notificar tal resultado como “cero” o como < LDD. Deberá hacerse constar en todos los casos el valor estimado y su incertidumbre.

Límite de detección (LDD): Concentración o cantidad real del analito presente en el material objeto de análisis que llevará, con una probabilidad (1- $\beta$ ), a la conclusión de que la concentración o cantidad del analito es mayor en el material analizado que en el material testigo.

Se recomienda para su cálculo a lo menos seis mediciones de blanco matriz, testigo reactivo o concentración estimada cercana al blanco.

$$\text{LDD} = 2t(1-\alpha;v) S_0 \quad \text{Si: } t(0,05,\infty) \rightarrow 1,645 \quad \text{LC} = (3,29)S_0 \quad \textbf{Ecuación 5}$$

LDD = 3,29S<sub>0</sub>, cuando la incertidumbre del valor medio (esperado) del material testigo es insignificante,  $\alpha = \beta = 0,05$  y el valor estimado tiene una distribución normal con una varianza constante conocida.

Un criterio de aceptación adecuado es LC < LDD < LMP. En general también se sugiere, para un LMP > 0,1 mg/L un LDD < 1/10 LMP y para un LMP < 0,1 mg/L un LDD < 1/5 LMP.

Límite de cuantificación (LDC): Una característica del funcionamiento del método que suele expresarse como señal del valor (verdadero) de la medición que producirá estimaciones con una desviación estándar relativa (RSD) generalmente de 6 % o 10 %. El LDC se calcula mediante la ecuación 6.

$$\text{LDC} = 10S_0 \quad \textbf{Ecuación 6}$$

Se recomienda para su cálculo a lo menos seis mediciones de blanco matriz, testigo reactivo o concentración estimada cercana al blanco.

En este caso, el LDC es exactamente 3,04 veces el límite de detección, dada la normalidad y  $\alpha = \beta = 0,05$ . En el LDC es posible lograr una identificación positiva con un nivel de confianza razonable.

Un criterio de aceptación adecuado es LC < LDD << LDC < LMP. En general también se sugiere, para un LMP > 0,1 mg/L un LDC < 1/5 LMP y para un LMP < 0,1 mg/L un LDC < 2/5 LMP. <sup>[23]</sup>

#### 4.4.4 EXACTITUD

El término “exactitud”, está aplicado a un conjunto de resultados de un ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios y un componente común de error sistemático o sesgo.

Cuando se aplica a un método de ensayo, el término “exactitud” se refiere a una combinación de veracidad y precisión. En el siguiente esquema de “Tiro al Blanco”, ampliamente utilizado para ejemplificar esto, los puntos u orificios equivaldrían a los resultados analíticos y el círculo rojo al centro el rango en el cual se espera este el valor de referencia (o verdadero).

En la figura 6 se esquematiza como entre más veraz y preciso sea un resultado analítico es más exacto. <sup>[23]</sup>

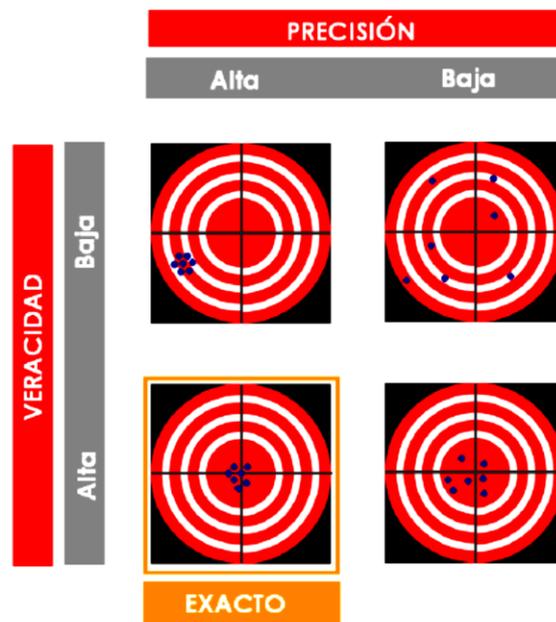


Fig 6: Esquema de tiro al blanco para explicación de la exactitud. <sup>[23]</sup>

- **VERACIDAD:** Determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado. La veracidad puede ser determinada por sesgo o recuperación. <sup>[23]</sup>
- **SESGO:** La diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o una medición y el valor verdadero. En la práctica el valor convencional de cantidad puede sustituir el valor verdadero. El sesgo es el error sistemático total en contraposición al error aleatorio.

Para determinar el sesgo puede utilizarse material de referencia, material fortificado, material control, material ensayo de aptitud: Para este fin, se debe medir un analito de concentración conocido y se determina la diferencia en valor absoluto entre el valor conocido y la

media del valor obtenido (ecuación 7). Una diferencia sistemática importante en relación al valor de referencia aceptado se refleja en un mayor valor del sesgo, cuanto más pequeño es el sesgo, mayor veracidad indica el método. <sup>[23]</sup>

$$s = \mu - X_i \quad \textbf{Ecuación 7}$$

Donde

s: sesgo

$\mu$ : valor esperado

$X_i$ : valor promedio obtenido

Para evaluar el sesgo se debe realizar la prueba t la cual se calcula en la ecuación 8:

$$t_{cal} = \frac{|\mu - X_i|}{S\sqrt{n}} \quad \textbf{Ecuación 8}$$

Donde:

$t_{cal}$ = t observado o calculado.

$X_i$ = Valor esperado o valor certificado en concentración.

$\mu$ = Promedio de valores leídos u observados en concentración.

S= Desviación estándar.

n= Numero de lecturas o valores observados.

**4.4.5 RECUPERACIÓN:** Es la fracción de la sustancia agregada a la muestra (muestra fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar.

La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original. Por lo cual, la recuperación está intrínsecamente relacionada a las características de la matriz de la muestra.

Se recomienda realizar a lo menos 6 mediciones de cada uno en lo posible en tres niveles. Se debe considerar al elegir estos niveles el rango de la curva de calibración del método, el LDD y el LMP establecido. De manera que los

niveles seleccionados permitan entregar la mejor información posible respecto a la capacidad de recuperación del método, en cuanto a estos valores críticos.<sup>[23]</sup>

La ecuación 9 se usa para determinar la recuperación.

$$R = \frac{C_e - C_0}{C_a} \quad \text{Ecuación 9}$$

Siendo:

R= Recuperación.

C<sub>e</sub> = es la concentración de analito de la muestra enriquecida.

C<sub>0</sub> = es la concentración de analito medida en la muestra sin adicionar.

C<sub>a</sub> = es la concentración de analito adicionado a la muestra enriquecida.

Se puede igualmente expresar en porcentaje de recuperación (%R) (ecuación 10)

$$\%R = R * 100 \quad \text{Ecuación 10}$$

En caso de evaluar la recuperación, se deberá realizar prueba t, en la cual el  $t_{cal} < t_{crit}$ : (ecuación 11)

$$t_{cal} = \frac{100 - \%R}{S/\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde:

t<sub>cal</sub>= t observado o calculado

R= Recuperación

S= Desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación

n= No de lecturas o valores observados

#### 4.4.6 PRECISIÓN

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados.<sup>[23]</sup>

- **REPETIBILIDAD:** Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos en el

mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo. <sup>[23, 26]</sup>

Se puede determinar registrando a lo menos 6 mediciones bajo las mismas condiciones (mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y en corto intervalo de tiempo) de un analito en un Material de Referencia. Calcular la Desviación Estándar (S) y el porcentaje de coeficiente de variación (%CV).

- **REPRODUCIBILIDAD:** Es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítem idénticos de análisis en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros.

Para determinar la precisión de la reproducibilidad intralaboratorio ( $R_i$ ) (es decir, la precisión dentro de un laboratorio), se sugiere realizar 3 mediciones de un Material de Referencia (MRC o material control) una vez por cada semana o el comportamiento de la curva de calibración en 3 días distintos.

También, se puede determinar registrando a lo menos 10 mediciones en días distintos, o en un mismo día cambiando a lo menos una condición analítica (ejemplo: operador, aparato, reactivos y largo intervalo de tiempo) de un analito en un Material de Referencia. Calcular la desviación estándar (S) y el porcentaje de coeficiente de variación (%CV).

Cuando se desea determinar la reproducibilidad interlaboratorios para fines de validación de un método, deben participar diferentes laboratorios, se debe tener en consideración que estos utilicen el mismo método y misma muestra, en un intervalo de tiempo preferentemente establecido, se determina de este modo la desviación estándar de los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios. <sup>[23, 27]</sup>

#### 4.4.7 INCERTIDUMBRE

La incertidumbre de una medición es el parámetro asociado al resultado, es decir, caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al mesurando. <sup>[22,23,27]</sup>

En este sentido, es importante que, para un método validado o verificado por el laboratorio, se realice la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presentes:

- Muestreo.
- Efectos de la muestra: tipo de matriz, almacenamiento, etc.

- Sesgos Instrumentales: Las debidas a las características de los equipos utilizados para realizar las medidas tales como: deriva, resolución, magnitudes de influencia. Ejemplo: temperatura.
- Pureza de Reactivos: materiales de referencia, preparación de estándares.
- Analista: Las debidas a la serie de mediciones: variaciones en observaciones repetidas bajo condiciones aparentemente iguales. Ejemplo: paralelaje.
- Condiciones de medición: Las debidas al certificado de calibración: en él se establecen las correcciones y las incertidumbres asociadas a ellas, para un valor de  $k$  determinado, en las condiciones de calibración. Ejemplo: material volumétrico, etc.
- Condiciones de medición: temperatura, humedad, etc.
- Otras: Método (por ejemplo, al interpolar en una recta), tablas (por ejemplo, las constantes), pesada, alícuota, efectos computacionales, etc.

La incertidumbre de la medición comprende, en general, muchos componentes. Algunos de estos pueden ser evaluados por tipo.

Para este fin el laboratorio deberá realizar una evaluación de las incertidumbres tipo A y B que están presentes en el método:

Evaluación de incertidumbre tipo A: Evaluación de un componente por un análisis estadístico de los valores de mediciones obtenidos en condiciones de medición definidas. Ejemplo: realizar varias mediciones en condiciones de repetibilidad.

Evaluación de incertidumbre tipo B: Evaluación de un componente incertidumbre de la medición realizada por otros medios distinto a los del tipo A. Ejemplos: La evaluación basada en la información, obtenidos a partir de un certificado de calibración, obtenidos a partir de los límites deducirse a través de la experiencia personal, etc. <sup>[22,23,27]</sup>

La determinación de la incertidumbre incluye generalmente 4 pasos, el primero como se ha dicho anteriormente corresponde a la determinación de las fuentes, el segundo en expresar los componentes en una incertidumbre estándar, el tercero combinar las diferentes incertidumbres y el cuarto paso es la determinación de la incertidumbre expandida es decir, multiplicar la incertidumbre combinada por un factor de cobertura ( $k$ ) = 2, a fin de entregar un 95% de confianza, y así establecer el intervalo entorno al resultado de la medición en el cual se puede esperar que se incluya la mayor fracción de la distribución de los valores que se pueden atribuir razonablemente al mesurando.

En algunos casos pueden existir mayores exigencias en cuanto al valor del factor de cobertura utilizado para obtener la incertidumbre expandida, pudiéndose solicitar o requerir un  $k = 3$ , a fin de entregar un 99,7 % de confianza, esto generalmente se puede solicitar frente a determinados contaminantes o residuos.

La determinación de la incertidumbre realizada por el laboratorio debe estar debidamente documentada.

Para demostrar que un método analítico es adecuado para el fin previsto, el laboratorio deberá demostrar a través de una evidencia objetiva que el método analítico ha sido adecuadamente validado o verificado.<sup>[23,27]</sup>

- **Cálculo de la Incertidumbre Teniendo en Cuenta las Fuentes Globales de Incertidumbre**

Se calcula con base en los resultados de evaluaciones de repetibilidad, reproducibilidad y exactitud, de la siguiente forma:<sup>[28]</sup>

Se calcula inicialmente el promedio de los resultados obtenidos tanto a concentraciones bajas de analito, como a altas concentraciones mediante la ecuación 12.

$$X_{prom} = \frac{\sum X_i}{n} \quad \text{Ecuación 12}$$

Se calcula la desviación de los resultados obtenidos aplicando ecuación 13.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{prom})^2}{(n-1)}} \quad \text{Ecuación 13}$$

Posteriormente se calcula la desviación estándar relativa de cada grupo de datos Ecuación 14.

$$RSD = \frac{S}{X_{prom}} \quad \text{Ecuación 14}$$

Finalmente, mediante ecuación 15 se calcula la Desviación Estándar Relativa del total de datos (**RSDt**).

$$RSDt = \sqrt{\frac{\left( \left( \frac{S_1}{X_{p1}} \right)^2 X(n-1) \right) + \left( \left( \frac{S_2}{X_{p2}} \right)^2 X(n-1) \right)}{(n-1)_1 + (n-1)_2}} \quad \text{Ecuación 15}$$

Y adicionalmente se calcula la recuperación en función de porcentajes (**%R**) de los patrones con base en la ecuación 16.

$$\%R = \frac{\text{Concentración Experimental Obtenida}}{\text{Concentración Real Preparada}} * 100 \quad \text{Ecuación 16}$$

Se calcula el promedio de los porcentajes de recuperación con la ecuación 17.

$$\bar{R}_p = \frac{\sum \%R_i}{n} \quad \text{Ecuación 17}$$

La desviación estándar de los recuperados (**SRp**) con ecuación 18.

$$SRp = \sqrt{\frac{\sum (R_i - R_{prom})^2}{(n-1)}} \quad \text{Ecuación 18}$$

También se debe calcular la incertidumbre en la recuperación promedio, mediante la ecuación 19:

$$U_{SRp} = \frac{SRp}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 19}$$

Se evalúa si el factor de recobro es significativamente diferente de 1 para un nivel de significancia ( $\alpha$ ) del 5% y un nivel de confianza del 95%, para (n-1) grados de libertad (gl). Para determinar si hay diferencia estadísticamente significativa entre el valor obtenido de recuperación y 1.

Se establece la hipótesis nula ( $H_0$ ). El factor de recobro no es significativamente diferente de 1.

Se calcula el *t experimental* ( $t_{exp}$ )(ecuación 20) y se compara con el *t critico* ( $t_{crit}$ ).

Si  $t_{exp} > t_{crit}$  se rechaza la  $H_0$ .

Si  $t_{exp} < t_{crit}$  se acepta la  $H_0$ .

$$t_{exp} = \frac{|R-1|*\sqrt{n}}{s} \quad \text{Ecuación 20}$$

Donde  $t_{exp}$  es el t experimental; R es el factor de recobro experimental; S es la Desviación estándar y n es el número de datos.

La incertidumbre se calcula mediante las ecuaciones 21, 22 y 23.

Incertidumbre Combinada Total ( $U_{c_{total}}$ ).

$$U_{c_{total}} = \sqrt{\left(\left(\frac{U_{Rp}}{Rp}\right)^2 + RSDt^2\right)} \quad \text{Ecuación 21}$$

Incertidumbre Expandida del Método ( $U_{exp\ met}$ ) ( $\pm$ ).

$$U_{exp\ met} = 2 * U_{c_{total}} \quad \text{Ecuación 22}$$

La incertidumbre expandida en la medición  $U(\pm)$  se expresa:

$$U = \mp C * U_{exp\ met} \quad \text{Ecuación 23}$$

## 4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realiza con la ayuda del programa Excel y la extensión XLSTAT integrada a Excel donde se pudieron llevar a cabo las pruebas estadísticas requeridas para este trabajo.

### 4.5.1 PRUEBAS DE NORMALIDAD

La distribución normal es, probablemente, la distribución teórica más importante en estadística y sirve como punto de referencia para describir cómo se distribuyen muchos de los datos de los análisis que realizamos. Se utilizan dos pruebas, la de Shapiro-Wilk para un tamaño de muestra menor o igual a 50, y la prueba de Kolmogorov-Smirnov que se utiliza para número de datos mayores a 50. Ambas pruebas permiten contrastar la hipótesis nula que indica que los resultados de los análisis proceden de poblaciones normales. Rechazaremos la hipótesis de normalidad cuando el nivel crítico o significancia (Sig.) sea menor que el nivel de significación establecido (generalmente 0,05). Cuando los valores presentan una distribución normal, se acepta la hipótesis nula y se aplican pruebas paramétricas. Cuando ocurre lo contrario, se aplican pruebas no paramétricas. <sup>[23,26]</sup>

### 4.5.2 PRUEBAS PARAMÉTRICAS

Son pruebas de hipótesis estadísticas que asumen cierto comportamiento de muestras obtenidas aleatoriamente, distribución normal de las observaciones y donde existe un parámetro de interés que buscamos estimar. Son un tipo de pruebas de significación estadística que cuantifican la asociación o

independencia entre una variable cuantitativa y una categórica. Las pruebas paramétricas exigen ciertos requisitos previos para su aplicación: la distribución normal de la variable cuantitativa en los grupos que se comparan y la homogeneidad de varianzas en las poblaciones de las que proceden los grupos.<sup>[22]</sup>

**Análisis de Varianza (ANOVA) de un Factor:** El análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ( $K > 2$ ) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de K 'tratamientos' o 'factores' con respecto a la variable dependiente o de interés, la hipótesis es evaluada de la siguiente forma: Si el nivel crítico asociado al estadístico F es menor que 0,05, se rechaza la hipótesis de igualdad de medias y se concluye que no todas las medias poblacionales comparadas son iguales. En caso contrario, no se puede rechazar la hipótesis de igualdad y no se puede afirmar que los grupos comparados difieran en sus promedios poblacionales. En otras palabras, nos ayuda a comparar varios grupos en una variable cuantitativa. A la variable categórica (nominal u ordinal) que define los grupos que deseamos comparar la llamamos independiente o factor. A la variable cuantitativa (de intervalo o razón) en la que deseamos comparar los grupos la llamamos dependiente.<sup>[22, 29]</sup>

**Prueba de Tukey – Prueba de Duncan:** Son test de comparaciones múltiples. Permiten comparar las medias de los t niveles de un factor después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA. Estas pruebas permiten definir grupos entre un conjunto de datos.<sup>[22,29]</sup>

**Prueba T:** Esta Prueba permite contrastar hipótesis con base a una media poblacional, ajustándose a un modelo de distribución de probabilidad t de student cuando la población muestreada es normal.<sup>[23,26]</sup>

**Prueba T Para Muestras Independientes:** Permite contrastar hipótesis referidas a la diferencia entre dos medias independientes. Si la probabilidad asociada al estadístico de Levene es mayor que 0,05, podremos suponer que las varianzas poblacionales son iguales; si la probabilidad asociada al estadístico de Levene es menor que 0,05, rechazaremos la hipótesis de igualdad de varianzas y supondremos que son distintas.

**Prueba T Para Muestras Relacionadas:** Permite contrastar hipótesis referidas a la diferencia entre dos medias relacionadas. Si el valor del nivel crítico  $< 0,05$  se rechaza la hipótesis de igualdad de medias.

**Coefficiente de Correlación de Pearson (r):** Es una prueba paramétrica que mide el grado de asociación lineal entre dos variables cuantitativas, tomando valores entre -1 y +1. Los valores próximos a +1 indican una fuerte asociación lineal positiva; los valores próximos a -1 indican una

fuerte asociación lineal negativa; valores próximos a 0 indican que no existe asociación lineal entre las variables <sup>[23,26]</sup>

### 4.5.3 PRUEBAS NO PARAMÉTRICAS

Una prueba no paramétrica es una prueba de hipótesis que no requiere que la distribución de la población se caracterice en función de determinados parámetros. Por ejemplo, numerosas hipótesis se basan en el supuesto de que la población sigue una distribución normal con los parámetros  $\mu$  y  $\sigma$ . Las pruebas no paramétricas no tienen este supuesto, de modo que son útiles cuando sus datos sean firmemente no normales y resistentes a transformaciones. <sup>[22]</sup>

Sin embargo, las pruebas no paramétricas no están completamente exentas de supuestos sobre los datos. Por ejemplo, las pruebas no paramétricas requieren que los datos sean una muestra aleatoria independiente. Se aplican a una gran variedad de situaciones, ya que no se requiere que cumplan ciertas condiciones como lo es el de la distribución normal de los datos como es el caso de los métodos paramétricos. Los resultados estadísticos se obtienen de procedimientos de ordenación o en otros casos de recuento, donde el parámetro de centralización es la mediana que se define como un punto donde el valor de X está el 50% de las veces por debajo y el 50% por encima. Como pruebas no paramétricas se tiene:

- **Prueba de Kruskal Wallis:** Es un método para probar si un grupo de datos proviene de la misma población. Esta prueba es paralela al ANOVA con los datos reemplazados por categorías. Para determinar las diferencias significativas se aplica la prueba U de Mann-Whitney.
- **Prueba de U Mann Whitney:** Es una excelente alternativa a la prueba t sobre diferencia de medias cuando: 1) no se cumplen los supuestos en los que se basa la prueba t (normalidad y homocedasticidad), o 2) no es apropiado utilizar la prueba t porque el nivel de medida de los datos es ordinal.
- **Coefficiente de Correlación de Spearman:** Es una prueba que mide la asociación o interdependencia entre dos variables discretas medidas, al menos una de ellas, en escala ordinal. Los valores próximos a +1 indican una correlación fuerte y positiva. Los valores próximos a -1 indican una correlación fuerte y negativa. Los valores próximos a 0 indican que no hay correlación lineal. <sup>[23,26]</sup>
- **ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL SIMPLE:** En estadística, la regresión lineal o ajuste lineal es un modelo matemático usado para aproximar la relación de dependencia entre una variable dependiente Y, las variables independientes  $X_i$  y un término aleatorio  $\epsilon$ . El procedimiento implica, básicamente, obtener la ecuación mínimo-cuadrática que mejor expresa la relación entre la variable dependiente y la variable independiente y estimar mediante el coeficiente de determinación la calidad de la ecuación de regresión obtenida. <sup>[22]</sup>

## 5. METODOLOGÍA

La metodología que se sigue es la propuesta por el IDEAM, en su protocolo de estandarización de métodos analíticos. <sup>[3]</sup>

### 5.1 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Espectrofotómetro Spectroquant®Pharo 300, bomba de vacío Vacuubrand, plancha de calentamiento Equifar, Incubadora Binder, pH-Metro Thermo, balanza analítica Boeco, micropipetas Schott Duran, condensadores, unión claisen, celdas de cuarzo, embudos de caña larga, magnetos.

Material de vidrio clase A, marca Schott Duran, beakers, balones aforados, erlenmeyers de boca esmerilada, erlenmeyers, buretas, probetas.

#### 5.1.1 REACTIVOS PARA ANÁLISIS DE NITRATOS

- a) Solución de SS al 5% p/v: disolver 5g de SS en 1000mL de agua destilada.
- b) Solución de tartrato de sodio y potasio: Disolver 400g de NaOH y 60g de tartrato de sodio y potasio anhidro en agua destilada, dejar enfriar y diluir a 1000mL con agua destilada.
- c) Ácido sulfúrico concentrado:  $H_2SO_4$  al 98%.
- d) Hidróxido de sodio 2,5N: pesar 100g de NaOH y diluir a 1000mL con agua desionizada.

#### 5.1.2 REACTIVOS PARA ANÁLISIS DE FÓSFORO TOTAL

- a) Fenolftaleína.
- b) Solución ácida fuerte: Añadir cuidadosamente 300mL de  $H_2SO_4$  concentrado a 600mL de agua destilada. Enfriar, agregar 4mL de  $HNO_3$  concentrado y diluir a 1 litro con agua destilada. (Concentración aproximada de 11N).
- c) Solución de Molibdato: Disolver 25g de  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  en 175mL de agua destilada, cuidadosamente agregar 280mL de  $H_2SO_4$  concentrado a 400mL de agua destilada. Enfriar, adicionar la solución de molibdato y diluir a 1Litro con agua destilada.
- d) Cloruro estañoso: Disolver 2,5g de  $SnCl_2 \cdot 2H_2O$  en 100mL de glicerina. Calentar en baño de agua para acelerar la disolución.
- e) Estándar de fosfato: disolver 219,5mg de  $KH_2PO_4$  en 1 litro de agua destilada, 1mL=50 $\mu$ g P- $PO_4^{3-}$ .
- f) Persulfato de amonio:  $(NH_4)_2S_2O_8$  sólido.
- g) Hidróxido de sodio 1N: pesar 40g de NaOH y diluir a 1L con agua destilada.

### 5.1.3 REACTIVOS PARA ANÁLISIS DE FENOLES

- a) Solución de ácido fosfórico: diluir 10mL de ácido fosfórico al 85% en 100mL de agua destilada.
- b) Solución indicadora de naranja de metilo.
- c) Solución patrón de fenol: disolver 1g de fenol cristalizado y diluir a 1L con agua destilada, requiere estandarización.
- d) Hidróxido de amonio  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,5N: diluir 35mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado en 1000mL de agua destilada.
- e) Solución buffer de fosfatos: Disolver 104,5g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 72,3g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en agua desionizada hasta 1000mL, el pH de la solución debe estar alrededor de 6,8.
- f) Solución de 4-aminoantipirina: disolver 2,0g de 4-aminoantipirina pura en 100mL de agua destilada, su preparación debe ser diaria.
- g) Solución de ferricianuro de potasio: disolver 8,0g de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en agua desionizada y diluir hasta 100mL. Filtrar si es necesario, guardar en una botella marrón, se debe preparar semanalmente.

### 5.2 CONSERVACIÓN Y PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para la recolección de las muestras se toma 1 litro para cada uno de los análisis en recipientes de plástico. En la figura 7 se presenta la recolección de una muestra de agua residual; con el fin de reducir al mínimo la actividad microbiana se lleva a un pH <2 y se almacena a una temperatura de 4°C.



**Fig 7:** Recolección de muestra de agua residual.

Para la determinación de nitratos se usa ácido sulfúrico concentrado asegurando un  $\text{pH} < 2$  para preservar las muestras, el tiempo de conservación es de 2 días. Para realizar el análisis es necesario asegurar que las muestras sean translucidas por lo que se filtran por membrana de  $0,45\mu\text{m}$ , se lleva la muestra a  $\text{pH} 7$  y se procede con el análisis de las muestras por el método seleccionado.<sup>[2,30]</sup>

Para determinar fósforo total se emplea ácido nítrico concentrado asegurando un  $\text{pH} < 2$  para preservar las muestras, el tiempo de conservación es de 1 mes. Para realizar el análisis del fósforo total es necesario hacer una digestión que asegure que el fósforo se ha convertido en ortofosfatos, posteriormente se filtra por membrana de  $0,45\mu\text{m}$ , se lleva a  $\text{pH} 7$  y se procede al análisis de las muestras por el método seleccionado.<sup>[1,30]</sup>

Las muestras para análisis de fenoles se preservan usando ácido sulfúrico concentrado hasta obtener un  $\text{pH} < 2$ , el tiempo de conservación es de 28 días. Para realizar el análisis de fenoles es necesario purificar la muestra por lo que se realiza una destilación de la muestra recogiendo una cantidad de 250mL del destilado para el análisis.<sup>[1,30]</sup>

### **5.3 CALIBRACIÓN DEL MATERIAL UTILIZADO EN LA VALIDACIÓN.**

Se debe realizar la calibración de la balanza analítica, el pH-Metro, la incubadora, el espectrofotómetro, siguiendo el manual del usuario.

La calibración del material volumétrico se realizó siguiendo el método de la reproducción de la definición de la magnitud, donde se determina el volumen contenido en un recipiente (referido a una temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ ) a partir de la pesada del volumen de agua destilada contenido en dicho recipiente.<sup>[31]</sup>

### **5.4 VERIFICACIÓN DE LOS PARAMETROS ESTABLECIDOS EN LA LITERATURA**

Antes de proceder con el procedimiento para validar las técnicas analíticas se verificaron las condiciones que se encuentran registradas en la literatura, esto es: longitud de onda, estabilidad de la señal con respecto al tiempo, efecto del  $\text{pH}$  en la muestra.

#### **5.4.1 NITRATOS**

Para las medidas de absorbancia se utiliza un equipo UV-Vis marca spectroquant, en la figura 8 se presenta el equipo utilizado.

La longitud de onda reportada en la literatura es de  $415\text{nm}$  por lo que se realizaron varias medidas entre los  $400\text{nm}$  y  $500\text{nm}$  obteniéndose que efectivamente la longitud de onda que se reporta es el máximo ( $415\text{nm}$ ).



**Fig.8:** Espectrofotómetro spectroquant.

La estabilidad de la señal y la influencia del pH se realizó a 3 diferentes valores de pH, 4, 7 y 10 donde se midieron por 2 horas de manera consecutiva, cada hora hasta completar 8 horas y luego de completar 20 horas. Los resultados se registran en la tabla 1.

**Tabla 1:** Influencia del pH en la estabilidad de la señal para el método del SS

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Absorbancia</b>		
	<b>pH 4</b>	<b>pH7</b>	<b>pH10</b>
<b>10</b>	0,823	0,860	0,865
<b>20</b>	0,821	0,860	0,863
<b>40</b>	0,819	0,859	0,860
<b>60</b>	0,818	0,859	0,857
<b>120</b>	0,818	0,858	0,855
<b>240</b>	0,815	0,856	0,855
<b>360</b>	0,813	0,856	0,855
<b>480</b>	0,813	0,854	0,854
<b>1200</b>	0,803	0,841	0,831

A pH neutro o básico se encuentra que las absorbancias son similares, mientras que si se trabaja a pH ácido la absorbancia es menor, por lo que se debe de neutralizar la muestra (si esta ha sido preservada) antes de proceder al análisis, además, se encuentra que durante las 2 primeras horas no hay una diferencia significativa.

Las condiciones propuestas por el método en cuanto a cantidades y concentraciones son las siguientes:

- a) 10mL de muestra se secan a 80°C con 1mL de SS al 5%, una vez seco se adicionan 2mL de ácido sulfúrico, se deja reposar por 10 min, después de esto se adicionan 15mL de agua desionizada y 15mL de la solución de tartrato de sodio y potasio (5.1.2), las muestras son llevadas al espectrofotómetro donde se realiza la lectura de absorbancia a 415nm se encuentran en la tabla 2 <sup>[2]</sup>.

**Tabla 2:** Absorbancias obtenidas usando las condiciones propuestas en el método del SS (a)

<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>Absorbancia</b>
<b>0,5</b>	0,021
<b>1,0</b>	0,072
<b>2,0</b>	0,138
<b>4,0</b>	0,265
<b>6,0</b>	0,395
<b>8,0</b>	0,529
<b>10,0</b>	0,649
<b>12,0</b>	0,790
<b>15,0</b>	0,989

El procedimiento bajo estas condiciones requiere de un promedio de 12 horas para llevar a sequedad las muestras teniendo precaución en la última hora puesto que una vez secas se deben retirar de la incubadora para que las muestras no se oscurezcan y produzcan errores en la lectura.

Dado que la ejecución del método requiere demasiado tiempo y energía, diferentes autores<sup>[24, 30]</sup> han utilizado una cantidad de muestra menor y una menor cantidad de reactivos manteniendo las proporciones.

En nuestro caso para la validación del método en el laboratorio se optó por mantener las proporciones de los reactivos y usar una cantidad prudente de muestra, las cantidades fueron las siguientes:

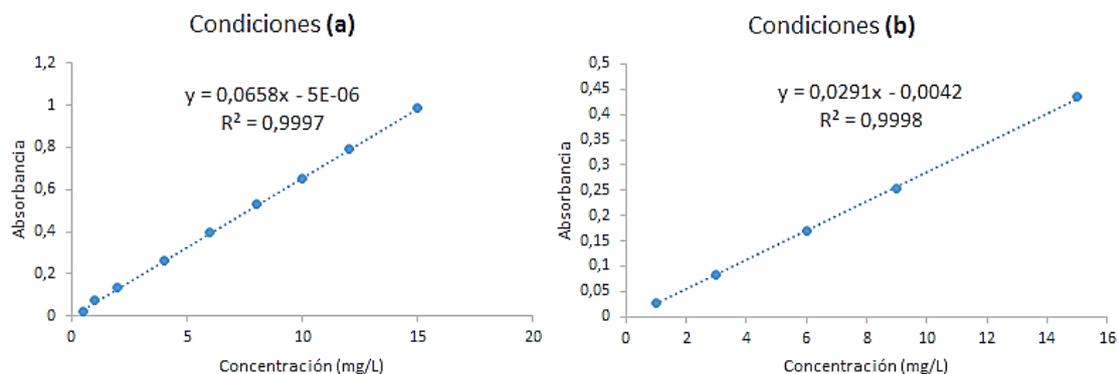
- b)** 3mL de muestra.  
0,7mL de salicilato.  
1,4ml de ácido sulfúrico.  
10,5 mL de agua desionizada.  
10,5 mL de tartrato de sodio y potasio.

En la tabla 3 se consignan los resultados registrados en el desarrollo del método aplicando las cantidades y condiciones registradas en b).

**Tabla 3:** Absorbancias obtenidas usando las condiciones propuestas en el método del SS (b).

Concentración (mg/L)	Absorbancia
1	0,0262
3	0,0832
6	0,1706
9	0,2544
15	0,4344

Las curvas de calibración utilizando los datos de las tablas 2 y 3 se muestran en la figura 9.



**Fig 9:** Curvas de calibración para la determinación de nitratos utilizando condiciones: **a)** Propuestas por el método del SS, **b)** Condiciones alternativas para el método del SS.

Se observa que utilizando las condiciones de ambos apartados (**a** y **b**) se obtienen buenos resultados, las figura 9 se muestran que ambas curvas presentan un buen coeficiente de determinación, sin embargo, el usar las condiciones del apartado **b** se reduce el tiempo a 4 horas de secado y uso de menor cantidad de reactivos, además, se realizó una prueba usando las condiciones del apartado **b** y aumentando la cantidad de muestra, como resultado se obtiene que la cantidad de muestra usada incrementa la sensibilidad de la técnica, los resultados se muestran en las tablas 1 y 2 del anexo 2.

#### 5.4.2 FÓSFORO TOTAL

La longitud de onda reportada para el método del cloruro estañoso en UV-vis es de 690nm por lo que se realizaron varias medidas entre los 650nm a 750nm obteniéndose que efectivamente la longitud de onda que se reporta es el máximo (690nm).

Debido a que para esta prueba fue considerado el pH y el tiempo de estabilidad del compuesto coloreado se optó por seguir las condiciones sugeridas ya que cualquier variación podría influir de manera considerable.<sup>[1]</sup>

### 5.4.3 FENOLES

La longitud de onda reportada en la literatura en UV-Vis es de 500nm por lo que se realizaron varias medidas entre los 450nm a 550nm obteniéndose que efectivamente la longitud de onda que se reporta es el máximo (500nm).

No se variaron condiciones de pH ya que la metodología requería ajustes precisos de pH para garantizar un análisis efectivo.

El uso de 500mL de muestra para destilar hace que el procedimiento sea muy extenso, por esto se toma como referencia el protocolo planteado por el IDEAM donde sigue el mismo procedimiento con un volumen de 200mL para destilar<sup>[31]</sup>, el uso de los reactivos ferricianuro de potasio y 4-aminoantipirina a las concentraciones sugeridas producen blancos que son bastante intensos, caso particular, con estándares bajos a pesar de presentar una tonalidad rojiza evidente y diferente del blanco, el blanco presentaba una mayor absorbancia, lo que limitaba el rango inferior de la curva.

En la literatura se encuentran procedimientos basados en la reacción de fenoles con la 4-aminoantipirina donde las concentraciones utilizadas son menores que las propuestas en el Standard Methods<sup>[32,33]</sup> (el procedimiento de referencia se encuentra registrado en el anexo 1c) usar los reactivos a concentraciones más bajas produce blancos de menor intensidad y una mayor diferencia en la absorbancia con estándares más bajos, esto se confirma con los siguientes datos:

Se prepararon 4 diferentes concentraciones de ferricianuro y 2 de 4-AAP.

A= 4-AAP a concentración sugerida en el estándar (2% p/v).

A/2= 4-AAP a concentración 1% p/v.

F= ferricianuro a concentración sugerida en el estándar (8% p/v).

F/2= ferricianuro a 4% p/v.

F/3= ferricianuro a 2,67% p/v.

F/4 = ferricianuro a 2% p/v.

Estos fueron los resultados:

Midiendo el blanco y el estándar de 0,5mg/L por duplicado, los resultados se consignan en la tabla 4 y 5.

**Tabla 4:** Resultados absorbancia blanco de fenoles a diferentes valores de concentración de reactivos.

	<b>A</b>	<b>A/2</b>	<b>A</b>	<b>A/2</b>
<b>F</b>	0,109	0,032	0,102	0,031
<b>F/2</b>	0,031	0,032	0,027	0,030
<b>F/3</b>	0,019	0,016	0,018	0,016
<b>F/4</b>	0,018	0,018	0,012	0,012

**Tabla 5:** Resultados de absorbancia para estándar de fenol 0,05mg/L a diferentes concentraciones de reactivos.

	<b>A</b>	<b>A/2</b>	<b>A</b>	<b>A/2</b>
<b>F</b>	0,165	0,103	0,161	0,104
<b>F/2</b>	0,092	0,099	0,091	0,100
<b>F/3</b>	0,083	0,085	0,084	0,085
<b>F/4</b>	0,073	0,048	0,073	0,044

Se hace diferencia entre el estándar de 0,05mg/L y el blanco, los resultados se registran en la tabla 6.

**Tabla 6:** Diferencia entre la absorbancia del estándar de fenol 0,05mg/L y el blanco.

	<b>A</b>	<b>A/2</b>	<b>A</b>	<b>A/2</b>
<b>F</b>	0,056	0,071	0,059	0,073
<b>F/2</b>	0,061	0,072	0,067	0,070
<b>F/3</b>	0,067	0,069	0,065	0,069
<b>F/4</b>	0,055	0,030	0,061	0,032

Se puede ver como la diferencia es baja entre el blanco y el estándar de menor concentración usando los estándares F y A, y la diferencia usando (F - A/2) y (F/2 - A/2) no es significativamente alta entonces se optó por el uso de los reactivos a la mitad de las concentraciones sugeridas, esto permitió dejar un estándar bajo de 0,3mg/L obteniéndose buenos resultados.

## 5.5 PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN

El procedimiento de validación se divide en tres etapas a realizar que son:

- Prevalidación
- Validación
- Presentación de resultados a través de un informe escrito

La prevalidación consiste en determinar el rango de concentraciones que se tendrán en cuenta para realizar el estudio estadístico y así generar resultados confiables a través de los procedimientos experimentales ejecutados de forma habitual en el laboratorio. Para lograrlo, se da inicio a la fase experimental cuantificando la cantidad en mg/L del analito presente en 10 soluciones blanco (agua desionizada) y frente a estos resultados, se establece el límite crítico (LC), de detección (LDD) y de cuantificación (LDC) de la técnica a evaluar.

El diseño experimental que se sigue es el consignado en la tabla 7.

Tabla 7: Diseño experimental para la validación de nitratos, fósforo total y fenoles.

<b>Matriz de las muestras</b>		<b>AGUA RESIDUAL</b>		
<b>Testigos reactivos</b>	KNO <sub>3</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhidro, Fenol			
<b>Blanco matriz</b>	Agua desionizada			
<b>Muestras fortificadas</b>	Muestra sin fortificar			
	Muestra fortificada con concentración baja			
	Muestra fortificada con concentración alta			
<b>Pruebas y parámetros de validación a evaluar</b>	<b>Linealidad</b>			
	<b>Sensibilidad</b>			
	<b>Limites</b>	Límite de detección		
		Límite crítico		
		Límite de cuantificación		
		Intervalo de linealidad		
	<b>Exactitud</b>	Sesgo		
		Porcentaje de recuperación		
	<b>Precisión</b>	Desviación estándar		
		Varianza		
Error relativo				
Coeficiente de variación				
<b>Incertidumbre</b>				
<b>PARÁMETRO</b>		<b>CRITERIO</b>		
<b>Criterios de aceptabilidad para cada parámetro de validación</b>	<b>Linealidad</b>	$r^2 > 0.995$ ,		
		$t_{cal} < t_{tab}$ (curva de calibración global)		
	<b>Sensibilidad</b>	Calculo de la pendiente obtenida por regresión lineal		
	<b>Límite de detección</b>	Producto de dos veces la t-student por la desviación estándar del blanco		
	<b>Límite crítico</b>	Producto del valor de la t-student por la desviación estándar del blanco		
	<b>Límite de cuantificación</b>	Diez veces la desviación estándar del blanco		
	<b>Exactitud</b>	tcal<ttab en evaluación del sesgo.		
		tcal<ttab en la evaluación del porcentaje de recuperación		
	<b>Precisión</b>	Repetitividad	Evaluada por S, %CV, t-student	
		Reproducibilidad	Evaluada por S, %CV, t-student	
<b>Incertidumbre</b>	Identificación de fuentes o componentes de la incertidumbre en la medición.			

## 6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Con las condiciones establecidas para las metodologías de nitratos, fósforo total y fenoles, se procedió a realizar las pruebas necesarias con sus correspondientes análisis estadísticos teniendo como fin el implementar las metodologías ya mencionadas en el laboratorio de aguas de la empresa Construcsuelos Suministros Ltda.

### 6.1 INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL

Se prepararon varios estándares de valores de concentración determinados de tal manera que cubriera valores mínimos hasta perder la linealidad o su valor de absorbancia era superior a 1, determinando así el rango más apropiado de trabajo para cada metodología.

Para nitratos se determinó que el rango apropiado estaba entre 0,23mg N-NO<sub>3</sub>/L y 3,39mgN-NO<sub>3</sub>/L, para fósforo total se determinó que era entre 0,1 mg P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>/L y 2 mg P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>/L, y para fenoles se encontró que el rango apropiado es de 0,3 mg fenol/L a 6 mg fenol/L, todos obedecen la ley de Lambert Beer en estos intervalos.

### 6.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Para la preparación de las soluciones se siguieron los procedimientos de validación estipulado por el protocolo de estandarización del IDEAM <sup>[3]</sup>.

Para nitratos se preparó un estándar de 100mg NO<sub>3</sub>/L a partir de nitrato de potasio seco por un día a 105°C, se pesa 0,163g de KNO<sub>3</sub> y se diluye en 1000mL de agua destilada.

Para fósforo total el estándar se prepara disolviendo 219.5mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y diluyendo a 1000mL con agua destilada 1mL  $\cong$  50 $\mu$ g P-PO<sub>4</sub>.

Para fenoles las soluciones patrón y el enriquecimiento se hace con un patrón de 400mg Fenol/L preparado con 100mL de un patrón certificado de fenol de 1000mg de fenol/L y aforado por 250mL con agua destilada.

Con los patrones preparados se realizan las correspondientes diluciones y enriquecimiento a las muestras de agua residual.

En la tabla 8 se presentan las soluciones que se preparan para la validación de nitratos, fósforo total y fenoles.

**Tabla 8:** Soluciones preparadas para la validación de los métodos de determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.

MUESTRA	CODIFICACIÓN	CONCENTRACIÓN (mg/L)		
		Nitratos	Fósforo total	Fenoles
Blanco	Bk	0,00	0,00	0,00
Estándar 1 rango bajo	E1b	0,23	0,10	0,30
Estándar 2 rango bajo	E2b	0,68	0,50	1,00
Estándar rango medio	Em	1,35	1,00	2,00
Estándar 1 rango alto	E1a	2,03	1,50	4,00
Estándar 2 rango alto	E2a	3,39	2,00	6,00
Muestra de agua residual + estándar 2 rango bajo	E2bMR	X+0,68	X+0,5	X+1,0
Muestra de agua residual + estándar 1 rango alto	E1aMR	X+2,03	X+1,5	X+4,0

Adicionalmente para analizar los efectos de la matriz se miden las mismas muestras residuales a las que se les hace el enriquecimiento, el código de estas muestras es M1R.

### 6.3 PRUEBAS DE NORMALIDAD

Con el fin de determinar cuál es la distribución que siguen los datos obtenidos se realiza la prueba de Shapiro-Wilk, puesto que nuestro tamaño de muestra es menor de 50.

Se preparan curvas de calibración para nitratos, fósforo total y fenoles durante 7 días diferentes usando 5 niveles de concentración.

Los resultados obtenidos se consignan en la tabla 9.

Se evalúa la normalidad de los datos en función de los días y en función de la concentración teniendo en cuenta el valor de significancia (p) de la prueba Shapiro-Wilk, las hipótesis planteadas son:

$H_0$ : La variable de la cual se extrajo la muestra sigue una distribución Normal.

$H_a$ : La variable de la cual se extrajo la muestra no sigue una distribución Normal.

**Tabla 9:** Resultado curvas de calibración de nitratos, fósforo total y fenoles.

	Nivel de concentración (mg/L)	Absorbancias						
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
<b>Nitratos</b>	0,23	0,227	0,223	0,230	0,199	0,230	0,242	0,211
	0,68	0,680	0,649	0,723	0,661	0,669	0,676	0,665
	1,35	1,359	1,324	1,344	1,348	1,355	1,413	1,336
	2,03	2,026	2,026	2,050	2,042	1,988	1,995	1,941
	3,39	3,403	3,392	3,438	3,326	3,353	3,392	3,322
<b>Fósforo total</b>	0.10	0,102	0,106	0,089	0,101	0,094	0,096	0,093
	0.50	0,481	0,477	0,493	0,526	0,556	0,563	0,535
	1,00	0,935	1,000	0,988	1,011	1,024	1,000	0,989
	1.50	1,396	1,444	1,488	1,590	1,649	1,604	1,479
	2,00	1,955	2,023	1,981	1,965	1,998	1,954	2,018
<b>Fenoles</b>	0,30	0,318	0,299	0,294	0,310	0,322	0,290	0,318
	1,00	1,007	1,007	1,002	0,980	0,927	0,955	1,021
	2,00	1,963	2,005	2,052	1,993	2,019	1,995	2,014
	4,00	4,010	4,010	3,935	3,998	4,001	4,034	4,034
	6,00	6,011	5,988	5,903	5,999	6,049	5,983	6,002

El criterio de rechazo se da para valores de significancia menor a  $(p) = 0,05$  los resultados se consignan en las tablas 10 y 11 para nitratos, fósforo total y fenoles.

**Tabla 10:** Evaluación de la normalidad de los datos obtenidos en función del tiempo (días).

Variable	Shapiro-Wilk (p)		
	Nitratos	Fósforo total	Fenoles
Día 1	0,783	0,951	0,626
Día 2	0,760	0,941	0,655
Día 3	0,788	0,938	0,690
Día 4	0,821	0,880	0,637
Día 5	0,780	0,864	0,619
Día 6	0,782	0,884	0,638
Día 7	0,784	0,967	0,650

**Tabla 11:** Evaluación de la normalidad de los datos obtenidos en función de la concentración.

Nitratos		Fósforo total		Fenoles	
<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>(p) Shapiro-wilk</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>(p) Shapiro-wilk</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>(p) Shapiro-wilk</b>
0.23	0,722	0,1	0,825	0,3	0,369
0.68	0,140	0,5	0,341	1,0	0,280
1.35	0,097	1,0	0,139	2,0	0,915
2.03	0,404	1,5	0,622	4,0	0,060
3.39	0,537	2,0	0,317	6,0	0,206

Dado que para todos los casos el valor de significancia (p) de la prueba Shapiro-Wilk tanto en función de los días como en función de la concentración es mayor que  $(p) = 0,05$  la hipótesis nula  $H_0$  es aceptada y se considera que en función de los días y de la concentración los resultados siguen una distribución normal.

Para saber si hay una diferencia significativa entre cada nivel de concentración se realizó la prueba de Tukey, con un intervalo de confianza del 95% los resultados de la prueba se registran en la tabla 12, para nitratos, fósforo total y fenoles.

**Tabla 12:** Prueba de Tukey.

	<b>Categoría</b>	<b>Medias LS</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Límite inferior (95%)</b>	<b>Límite superior (95%)</b>	<b>Grupos</b>
<b>Nitratos</b>	<b>3,39</b>	3,375	0,012	3,351	3,399	A
	<b>2,03</b>	2,010	0,012	1,986	2,034	B
	<b>1,35</b>	1,354	0,012	1,330	1,378	C
	<b>0,68</b>	0,675	0,012	0,651	0,699	D
	<b>0,23</b>	0,223	0,012	0,199	0,247	E
<b>Fósforo total</b>	<b>2,00</b>	1,985	0,018	1,948	2,022	F
	<b>1,50</b>	1,521	0,018	1,484	1,559	G
	<b>1,00</b>	0,993	0,018	0,955	1,030	H
	<b>0,50</b>	0,519	0,018	0,481	0,556	I
	<b>0,10</b>	0,097	0,018	0,060	0,134	J
<b>Fenoles</b>	<b>6,00</b>	5,991	0,012	5,966	6,015	K
	<b>4,00</b>	4,003	0,012	3,979	4,028	L
	<b>2,00</b>	2,006	0,012	1,981	2,030	M
	<b>1,00</b>	0,985	0,012	0,961	1,010	N
	<b>0,30</b>	0,307	0,012	0,283	0,332	O

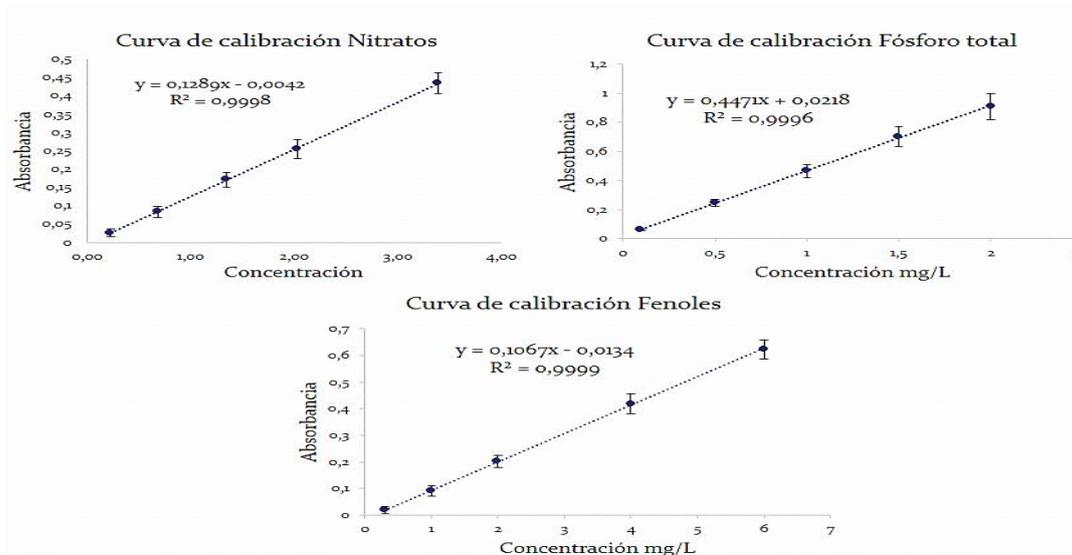
Como se observa en la tabla 12, los resultados de la prueba de Tukey para los diferentes métodos analíticos, indica que hay diferencia significativa entre cada pareja de nivel de concentración y los agrupa en 5 diferentes grupos correspondientes a los niveles de concentración planteados; esto indica que la absorbancia difiere considerablemente entre cada nivel de concentración propuesta por lo que es posible realizar una curva de absorbancia versus concentración.

#### 6.4 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y LINEALIDAD DE LOS MÉTODOS

Para la evaluación de la sensibilidad y linealidad de los métodos se tomaron los datos de la tabla 9 y se les realizó un análisis por mínimos cuadrados construyendo así las curvas de calibración de los métodos para la determinación de nitratos, fósforo total y fenoles. En la tabla 13 se registran los resultados de la evaluación de los intervalos de respuesta lineal y en la figura 10 se presentan las curvas de calibración de nitratos, fósforo total y fenoles.

**Tabla 13:** Evaluación del intervalo de respuesta lineal para los métodos de determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.

	Estándar	Promedio	S X10 <sup>-2</sup>	% CV	Error Relativo	Varianza	t- calculada
Nitratos	0,23	0,236	1,387	5,88	2,59	1,92E-04	122,46
	0,68	0,678	4,082	6,02	0,29	1,67E-03	
	1,35	1,356	5,334	3,93	0,43	2,85E-03	
	2,03	2,006	5,528	2,76	1,19	3,06E-03	
	3,39	3,402	2,549	0,75	0,35	6,50E-04	
Fósforo total	0,10	0,092	0,886	9,67	8,30	7,86E-05	86,59
	0,50	0,506	1,337	2,64	1,10	1,79E-04	
	1,00	0,996	1,444	1,45	0,37	2,09E-04	
	1,50	1,522	2,854	1,87	1,49	8,15E-04	
	2,00	1,984	4,222	2,13	0,80	1,78E-03	
Fenoles	0,30	0,296	1,541	5,21	1,36	2,37E-04	173,20
	1,00	0,978	1,989	2,03	2,16	3,96E-04	
	2,00	2,012	4,161	2,07	0,58	1,73E-03	
	4,00	4,042	7,060	1,75	1,06	4,98E-03	
	6,00	5,972	3,152	0,53	0,47	9,93E-04	



**Fig 10:** Curvas de calibración para la determinación de: a) Nitratos, b) Fósforo total, c) fenoles.

Tomando estos resultados se evalúa la sensibilidad y la linealidad teniendo en cuenta los criterios establecidos para su aceptación, los resultados se consignan en la tabla 14.

**Tabla 14:** Evaluación de la sensibilidad y linealidad para los métodos de determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.

PARÁMETRO	RESULTADOS			CRITERIO DE ACEPTACIÓN
	Nitratos	Fósforo total	Fenoles	
Ecuación de la recta	$y = 0,1289x - 0,0042$	$y = 0,4471x + 0,0218$	$y = 0,1067x - 0,0134$	
Coefficiente de correlación	0,9999	0,9998	0,9999	
Coefficiente de determinación	0,9998	0,9996	0,9999	>0,997
Pendiente	0,1289	0,4471	0,1067	
Desviación estándar de la pendiente	0,0012	0,0011	0,0007	
Intercepto	-0,0042	0,0218	-0,0134	
Desviación estándar del intercepto	0,0033	0,0093	0,0014	
Rango de linealidad (mg/L)	0,23 a 3,39	0,1 a 2	0,3 a 6	
Evaluación coeficiente de correlación	$t_{exp}=122,46$	$t_{exp}=86,59$	$t_{exp}=173,20$	$t_{exp} > t(p:0,05; 5)$ $t = 2,571$

Se observa un coeficiente de determinación lineal de 0,9998, para nitratos, 0,9996 para fósforo total y 0,9998 para fenoles, dado que en todos los casos es mayor a 0,997 (criterio exigido por el IDEAM como requisito para que una curva sea apropiada para usar como una curva de calibración), se puede decir que la curva obtenida es una línea recta con un alto coeficiente de correlación y determinación, verificándose con la prueba estadística para r donde se plantea la hipótesis nula  $H_0 =$  no existe correlación entre X e Y, ya que el valor es mayor se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existe una relación directamente proporcional entre la concentración y la absorbancia lo que hace que se puede usar para determinar la cantidad de nitratos, fósforo total y fenoles, además, debido al rango de concentraciones tomadas y la pendiente de la curva se puede decir que permite una buena discriminación de resultados.

## 6.5 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS

Inicialmente es necesario realizar 10 mediciones a los blancos de muestras teniendo en cuenta los pretratamientos a los que son sometidos las muestras antes de llevar a cabo los análisis.

Para la determinación de los límites de detección y de cuantificación se aplican las ecuaciones 5 y 6 (sección 4.4.3), en la tabla 15 se muestran los resultados de la determinación de los límites de detección y cuantificación.

**Tabla 15:** Resultados LDD y LDC para los métodos de determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.

	Promedio	Desviación estándar	Varianza	t-tabulada	LDD (mg/L)	LDC (mg/L)
<b>Nitratos</b>	0,05	0,022	4,92E-04	1,6450	0,07	0,22
<b>Fósforo total</b>	0,04	0,009	7,75E-05	1,6450	0,03	0,09
<b>Fenoles</b>	0,13	0,012	1,44E-04	1,6450	0,04	0,12

Se obtuvieron buenos resultados para cada una de las metodologías; para nitratos es posible disminuir el límite de cuantificación al emplear un volumen mayor de muestra como se presenta en el anexo 2.

## 6.6 PRECISIÓN

La precisión fue evaluada en términos de repetibilidad y reproducibilidad teniendo en cuenta los criterios de aprobación que exige el IDEAM para su aceptación. <sup>[3]</sup>

### 6.6.1 REPETIBILIDAD

La repetibilidad se calcula realizando 5 curvas de calibración el mismo día para asegurar las mismas condiciones, en la tabla 16 se presentan los resultados de la evaluación de la repetibilidad.

**Tabla 16:** Evaluación de la repetibilidad para los métodos de determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.

	<b>Estándar</b>	<b>Promedio</b>	<b>S</b>	<b>% CV</b>	<b>Error Relativo</b>	<b>Varianza</b>
<b>Nitratos</b>	<b>0,23</b>	0,236	0,014	5,88	4,34	1,92E-04
	<b>0,68</b>	0,678	0,041	6,02	0,04	2,23E-04
	<b>1,35</b>	1,356	0,053	3,93	0,17	1,02E-04
	<b>2,03</b>	2,006	0,055	2,76	1,32	2,33E-03
	<b>3,39</b>	3,402	0,025	0,75	0,43	6,50E-04
<b>Fósforo total</b>	<b>0,10</b>	0,09	0,009	9,67	8,30	7,86E-05
	<b>0,50</b>	0,51	0,013	2,64	1,10	1,79E-04
	<b>1,00</b>	1,00	0,014	1,45	0,37	2,09E-04
	<b>1,50</b>	1,52	0,028	1,87	1,49	8,15E-04
	<b>2,00</b>	1,98	0,042	2,13	0,80	1,78E-03
<b>Fenoles</b>	<b>0,30</b>	0,30	0,015	5,21	1,36	2,37E-04
	<b>1,00</b>	0,98	0,020	2,03	2,16	3,96E-04
	<b>2,00</b>	2,01	0,042	2,07	0,58	1,73E-03
	<b>4,00</b>	4,04	0,070	1,75	1,06	4,98E-03
	<b>6,00</b>	5,97	0,031	0,53	0,47	9,93E-04

Según los resultados experimentales obtenidos, se puede concluir que la desviación de los datos es significativamente baja. Esto se contrasta con el bajo coeficiente de variación porcentual, el cual, para un análisis con concentraciones de 0,1mg/L a 100mg/L debe ser menor al 10%. [3, 25]

Los valores obtenidos de %CV para nitratos, fósforo total y para fenoles son inferiores a los límites propuestos, por lo que se aceptan estos valores.

### 6.6.2 REPRODUCIBILIDAD

Se realizaron curvas de calibración durante siete días diferentes con el fin de determinar la precisión en términos de reproducibilidad, los resultados se presentan en la tabla 17.

**Tabla 17:** Evaluación de la reproducibilidad para los métodos para la determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.

	Nivel de concentración (mg/L)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)	Error relativo	Criterio de aceptabilidad
<b>Nitratos</b>	E1b(0,23)	0,018	8,26	2,9533	%cv<10%
	E2b(0,68)	0,026	3,91	0,7601	
	Em (1,35)	0,034	2,52	0,3115	
	E1a(2,03)	0,043	2,16	0,9974	
	E2a(3,39)	0,047	1,40	0,4379	
<b>Fósforo total</b>	E1b ( 0,10)	0,008	8,34	2,7383	%cv<10%
	E2b ( 0,50)	0,034	6,65	3,7416	
	Em (1,00)	0,029	2,93	0,7445	
	E1a (1,50)	0,091	5,95	1,4240	
	E2a (2,00)	0,037	1,86	0,7509	
<b>Fenoles</b>	E1b ( 0,30)	0,022	7,12	2,4233	%cv<10%
	E2b ( 1,00)	0,034	3,49	1,4594	
	Em (2,00)	0,038	1,90	0,2812	
	E1a (4,00)	0,065	1,63	0,0803	
	E2a (6,00)	0,063	1,05	0,1540	

Al analizar los resultados obtenidos para la reproducibilidad de nitratos, fósforo total y fenoles, desde el punto de vista estadístico, se puede llegar a la conclusión de que los datos obtenidos a partir de la secuencia experimental no manifiestan diferencias significativas, según el criterio de aceptación para reproducibilidad, para un rango de 0,1mg/L – 100mg/L debe tener un coeficiente de variación porcentual menor al 23% [3, 25], por lo que los resultados indican que estas técnicas tienen una buena precisión evaluada en repetibilidad y reproducibilidad.

## 6.7 EXACTITUD

Para evaluar la exactitud es necesario determinar la expectativa relativa de los resultados y el valor real (sesgo), además, se debe calcular la capacidad que tienen las metodologías para extraer el analito de la matriz en estudio (porcentaje de recuperación).

### 6.7.1 SESGO

Para la determinación del sesgo se determina con los valores obtenidos para la determinación de la reproducibilidad y haciendo uso de las ecuaciones 7 y 8 (sección 4.4.4), los resultados para la evaluación del sesgo se registran en la tabla 18.

**Tabla 18:** Resultados evaluación del sesgo en la determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.

<b>EVALUACIÓN DEL SESGO</b>				
	<b>Nivel de concentración (mg/L)</b>	<b>t(calculada)</b>	<b>t(tabulada)</b>	<b>Criterio de aceptabilidad</b>
<b>Nitratos</b>	E1b (0,23)	1,3785	2,1604	$t_{cal} < t_{tab}$
	E2b (0,68)	0,7331	2,1604	
	Em (1,35)	0,4615	2,1604	
	E1a (2,03)	1,7437	2,1604	
	E2a (3,39)	1,1715	2,1604	
<b>Fósforo total</b>	E1b (0,10)	1,2636	2,1604	$t_{cal} < t_{tab}$
	E2b (0,50)	0,8343	2,1604	
	Em (1,00)	0,9571	2,1604	
	E1a (1,50)	0,3537	2,1604	
	E2a (2,00)	1,5201	2,1604	
<b>Fenoles</b>	E1b (0,30)	1,243	2,1604	$t_{cal} < t_{tab}$
	E2b (1,00)	1,589	2,1604	
	Em (2,00)	0,552	2,1604	
	E1a (4,00)	0,470	2,1604	
	E2a (6,00)	0,552	2,1604	

Al comparar los sesgos obtenidos a partir de los resultados experimentales, se encuentra que no existe diferencia estadística significativa entre ellos, esto es corroborado por el criterio de aceptación donde el valor de la t-student tabulada es menor que la calculada, esto indica que la expectativa relativa de un ensayo no difiere considerablemente del valor real.

### 6.7.2 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

El porcentaje de recuperación es uno de los criterios de mayor interés al momento de evaluar una técnica, puesto que determina la efectividad en que puede extraer el analito de interés de la matriz en la que se encuentre; para la determinación se hace uso de las ecuaciones 9, 10 y 11 del apartado 4.4.4, los resultados para la evaluación del porcentaje de recuperación se presentan en la tabla 19.

**Tabla 19:** Resultados evaluación del porcentaje de recuperación en la determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.

<b>EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN</b>					
	<b>Muestra Fortificada</b>	<b>Porcentaje promedio</b>	<b>t(calculada)</b>	<b>t(tabulada)</b>	<b>Criterio de aceptabilidad</b>
<b>Nitratos</b>	E2bMR	98,93	1,8967	2,1604	$t_{cal} < t_{tab}$
	E1aMR	97,26	1,5604	2,1604	$t_{cal} < t_{tab}$
<b>Fósforo total</b>	E2bMR	102,37	1,8967	2,1604	$t_{cal} < t_{tab}$
	E1aMR	99,26	1,5604	2,1604	$t_{cal} < t_{tab}$
<b>Fenoles</b>	E2bMR	98,67	1,8967	2,1604	$t_{cal} < t_{tab}$
	E1aMR	98,98	1,5604	2,1604	$t_{cal} < t_{tab}$

Los resultados de los porcentajes de recuperación reportados de las técnicas analíticas estudiadas muestran una gran cercanía al 100% y dado que aprueban el criterio de aceptación es correcto decir que las metodologías implementadas pueden ser aplicadas en matrices de aguas residuales puesto que logran una buena determinación y cuantificación de los analitos de interés.

Los porcentajes de error relativo reportados en la tabla 17 son bajos por lo que se puede establecer que el error sistemático de las técnicas analíticas es aceptable, junto con esto y los buenos resultados en la evaluación del sesgo y porcentaje de recuperación se puede concluir que las técnicas implementadas presentan una buena exactitud.

## **6.8 ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LOS MÉTODOS**

Para las metodologías implementadas en el laboratorio de Construcsuelos suministros Ltda, se determinó la incertidumbre preparando estándares a partir de un patrón estándar certificado y usando dopajes en muestras residuales (los dopajes se realizan teniendo en cuenta el nivel bajo y alto de la curva de calibración de dicho método).

Los datos utilizados para el cálculo de la incertidumbre se registran en el anexo 3, el procedimiento se sigue como lo consignado en 4.4.7.

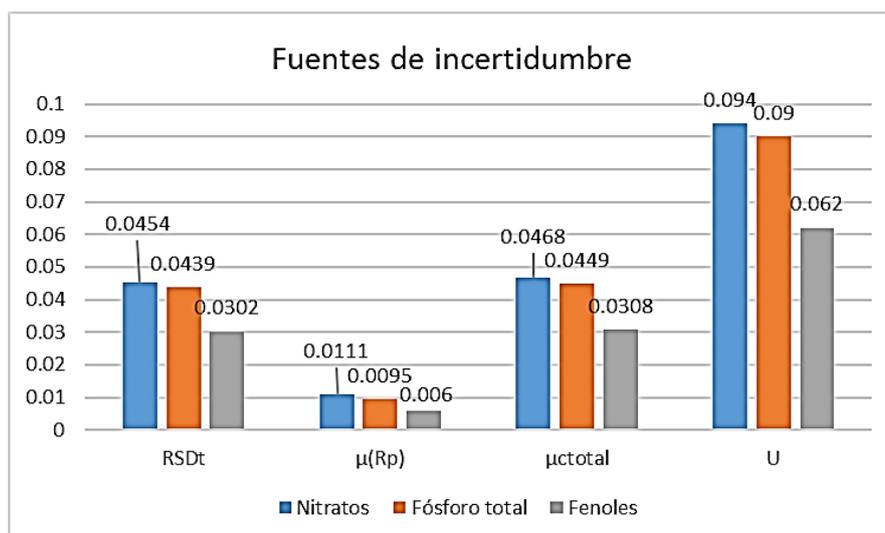
Empleando la prueba t, se evalúa si el factor de recobro no es significativamente diferente de 1 para un nivel de significancia del 5 % y un nivel de confianza del 95 % para **(n-1)** grados de libertad, con esto es posible

ver si hay diferencia estadísticamente significativa entre el valor obtenido de recuperación y 1 (100%). Como hipótesis nula,  $H_0$ , se plantea: “el factor de recuperación no es significativamente diferente de 1”, para esto se calcula el  $|t_{exp}|$  y se compara con el  $|t_{crit}|$ , siendo que, si  $|t_{exp}| > |t_{crit}|$  se debe rechazar  $H_0$ , pero si  $|t_{exp}| < |t_{crit}|$  se acepta, indicando diferencia estadísticamente significativa entre el valor obtenido de recuperación y el factor de recobro.

En el anexo 3 se registran los datos necesarios para el cálculo de las fuentes de incertidumbre. En la tabla 20 se muestran los resultados de acuerdo a los cuales se observa que el  $t$  experimental es menor que el  $t$  crítico, por lo tanto, se utiliza la fórmula de incertidumbre combinada total, con la que se calcula la incertidumbre expandida del método aceptando la hipótesis nula. La cuantificación de las incertidumbres se observa en la figura 11,

**Tabla 20:** Evaluación de la incertidumbre para los métodos de determinación de nitratos, fósforo total y fenoles.

	Nitratos	Fósforo Total	Fenoles
<b>Precisión (fuentes aleatorias) RSDt</b>	0,0454	0,0439	0,0302
<b>Sesgo (fuentes sistemáticas)</b>	0,0111	0,0095	0,0060
<b>Incertidumbre en la recuperación promedio <math>\mu(Rp)</math></b>			
<b>t exp (valor absoluto)</b>	1,715	0,858	1,940
<b>t critico (valor absoluto)</b>	2,160	2,160	2,160
<b>Incertidumbre combinada total (<math>\mu_{ctotal}</math>)</b>	0,0468	0,0449	0,0308
<b>Incertidumbre expandida del método (U):</b>	$\pm 0,094$	$\pm 0,090$	$\pm 0,062$



**Fig 11:** Gráfico de fuentes de incertidumbre.

Podemos ver que la fuente principal de incertidumbre en la medida para cada una de las metodologías es debido a fuentes aleatoria, estas incluyen

limitaciones en los instrumentos y otras variables que son inevitables y no pueden ser controladas, en cuanto a las fuentes sistemáticas relacionadas con el funcionamiento del equipo o el procedimiento realizado por el operario presentan el menor aporte en la incertidumbre de la medida.

## 7 CONCLUSIONES

- ❖ Se validaron los métodos analíticos para la determinación de fósforo total, nitratos y fenoles en aguas residuales estableciendo los parámetros de calidad como: exactitud, precisión (repetibilidad y reproducibilidad) límites de detección y de cuantificación, sensibilidad e intervalo lineal.
- ❖ Los resultados obtenidos evaluados en un intervalo de confianza del 95% nos indican que las metodologías implementadas dan resultados confiables para evaluar la concentración de nitrato, fósforo total y fenoles en muestras de aguas residuales.
- ❖ La validación es una parte integral de los sistemas de gestión de calidad de empresas de regulación ambiental, esto se debe a que proporciona gran confianza en los resultados que se reportan, el tener resultados confiables permite evaluar de forma efectiva el grado de afectación en el medio ambiente.
- ❖ Se implementó la metodología del salicilato de sodio para la determinación de nitratos con modificaciones que fueron validadas que proporciona:
  - Disminución de cantidad de muestra.
  - Menor tiempo de secado de muestras, (disminución en el tiempo de análisis).
  - Reducción de cantidad de reactivos.
  - Y registrándose una mayor sensibilidad.
- ❖ Se Implementó la metodología de la 4 amino antipirina para la determinación de fenoles SM 5530- B, C. con modificaciones que fueron validadas.
  - Disminuye el tiempo de destilación.
  - Mayor eficiencia de la cantidad de análisis en el laboratorio.
  - Uso de reactivos a menor concentración.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rice, E.W., et al., *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation: Washington, DC, 2012.
2. Rodier, J., *Análisis de las aguas: aguas naturales, aguas residuales, agua de mar; química, fisicoquímica, bacteriología, biología*. 1990: Omega.
3. Coy, G., *Protocolo estandarización de métodos analíticos*. Colombia: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM, 1999.
4. NTC-ISO, N.T.C., *17025: Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayo y calibración*. Icontec, Bogotá, 2002.
5. Renato, B; Simba,Ochoa; Betty, González, Ozorio, P, Calidad del agua destinada al consumo humano en un cantón de Ecuador en Revista Ciencia, UNEMI, 2016, p 109-117.
6. Hahn-Vonhessberg, C., Determinación de la calidad del agua mediante indicadores biológicos y fisicoquímicos, en la estación piscícola, Universidad de Caldas, Municipio de Palestina, Colombia. Boletín Científico Centro de Museos. Museo de Historia Natural, 2009. 13(2): p.89-105.
7. Imagen consultada online 02/02/17  
<http://ecologiaymedioambiente13.blogspot.com.co/2015/06/ciclo-del-nitrogeno.html>
8. Avila, J.P., R.P. Canul, and A.C. Sansores, *Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos*. 2000: Red Ingeniería Revista Académica.
9. Presidencia de la Republica, Norma de Calidad Ambiental y de descarga de efluentes: Recurso agua. Libro VI Anexo , última versión, Colombia 2002.
10. NOM127SSA11994, N.O.M. and S. Ambiental, *Agua Para Uso Y Consumo Humanolimites Permisibles De Calidad Y Tratamientos A Que Debe Someterse El Agua Para Su Potabilizacion*". NORMA, 2015. **24**: p. 3.
- 11 Imagen consultaada online:  
<http://biogeo.iespedrojimenezmontoya.es/BIOLOGIAJM/MICRO/microbio6inter.htm>
12. De Vicente, I. and L. Cruz-Pizarro, *Estudio de la carga externa e interna de fósforo y aplicación de modelos empíricos de eutrofización en las aguas de la Albufera de Adra*. Limnetica, 2003. **22**(1-2): p. 165-181.

13. Correll, D.L., *The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review*. Journal of Environmental Quality, 1998. **27**(2): p. 261-266.
14. Vargas, M.E.S., *Preconcentración selectiva de fenoles contaminantes prioritarios y determinación por espectrofotometría ultravioleta-visible, cromatografía líquida de alta eficacia y cromatografía de gases-espectrometría de masas*. 2003: Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
15. Ageitos Carvajal, A.E., S. Alvarez Artola, and E. Sánchez Pupo, *Nitratos en aguas subterráneas; causa de metahemoglobinemia en lactantes*. Revista cubana de higiene y epidemiología, 1980. **18**(3): p. 227-35.
16. Badii, M.H. and S. Varela, *Insecticidas Organofosforados: Efectos sobre la salud y el Ambiente*. CULCyT, 2015(28).
17. Guevara, SJM., Estandarización de métodos de análisis para la determinación de nitratos, nitritos, compuestos fenólicos y aceites y grasas, utilizados como indicadores de contaminación en aguas naturales y residuales industriales „en Escuela de Química 2’1’, Universidad Industrial Santander: Bucaramanga.
18. Islas, P., et al., *Intoxicación aguda por fenoles*. Revista chilena de pediatría, 1987. **58**(5): p. 402-404.
19. Ramalho, R.S., D.J. Beltrán, and F. de Lora, *Tratamiento de aguas residuales*. 1990: Reverté.
20. Vivar, L.E.V., Evaluación de un sistema a escala piloto de remoción de nitrógeno para aguas residuales procedentes de acuarios marinos, en Ingeniería Química. 2012, Universidad Simon Bolivar Sartenejas.
21. Muñoz, A., *Proceso Fenton y foto-Fenton para la remoción de fenoles de efluentes generados en una planta de celulosa kraft*. 2011, Tesis maestría]. Universidad Federal de Vicosa-Brasil.
22. Miller, J.N.M., et al., *Estadística y quimiometría para química analítica*. 2002: Pearson Educación.
23. Duffau, B., et al., *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición*. Aspectos generales sobre la validación de métodos. Santiago de Chile: Departamento de salud ambiental. Instituto de Salud Pública, 2010.
24. Scheiner, D., *A modified version of the sodium salicylate method for analysis of wastewater nitrates*. Water Research, 1974. **8**(10): p. 835-840.
25. Navarro Villoslada, F., Calibración multivariante para la determinación de clorofenoles contaminantes prioritarios mediante espectrofotometría de

- diodos integrados y FIA, en Departamento de química analítica. 1997, Universidad Complutense de Madrid, Servicio de publicaciones: Madrid.
26. Arriola, L.L., *Validación de métodos analíticos, fisicoquímicos y microbiológicos*. 2012, Guatemala.
  27. ALIMENTARIUS, C., *Comisión del Codex Alimentarius. Manual de Procedimiento*. 2010: Decimoctava Edición.
  28. Ellison, S.L., M. Rosslein, A. Williams, Cuantificación de la incertidumbre en medidas analíticas, en Guía CG 4 EURACHEM/CITAC 2000, Eurachem.
  29. Skoog, D.A., F.J. Holler, and T.A. Nieman, *Principios de análisis instrumental*. Ed. McGraw Hill, 5ta Edición, 2001, ISBN, 1998. 217660172.
  30. Rojas, R., *Guía para la vigilancia y control de la calidad del agua para consumo humano*. Lima: CEPIS/OPS, 2002.
  31. Batista, E., et al., *Calibration of micropipettes: Test methods and uncertainty analysis*. Measurement, 2007. **40**(3): p. 338-342.
  32. S.R.L, G.L., *NITRATOS AQAssay*. 2013: Rosario – Santa Fe –Argentina. Guía disponible en Línea:  
[http://www.gtlab.com.ar/UserFiles/mediaManager/1/4d46fb3892f9f99a43c720e6a64def24ea18eccc\\_f791293b3fd29d365f6242da35a5bb2aac0a32c5.pdf](http://www.gtlab.com.ar/UserFiles/mediaManager/1/4d46fb3892f9f99a43c720e6a64def24ea18eccc_f791293b3fd29d365f6242da35a5bb2aac0a32c5.pdf), fecha de consulta 15/10/2016.
  33. Clonatest, glucose mr.2000, Guía de Laboratorio, Montgam, España. Disponible en línea:  
[http://www.linear.es/ficheros/archivos/156\\_CT10200.pdf](http://www.linear.es/ficheros/archivos/156_CT10200.pdf), fecha de consulta 15/10/2016.

## ANEXO 1

### PROCEDIMIENTOS USADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS, FÓSFORO TOTAL Y FENOLES

#### a) PROCEDIMIENTO MÉTODO DEL SALICILATO DE SODIO PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS

- Tomar 10mL de muestra y adicionar 1mL de salicilato de sodio 5%.
- Colocar a secar en incubadora a una temperatura no mayor a 80°C.
- Luego de secarse, sacarlas y agregar 2mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, dejar reaccionar 15 minutos.
- Adicionar 15mL de agua desionizada cuidadosamente.
- Adicionar 15mL de tartrato de sodio y potasio.
- Agitar, esperar 10 minutos.
- Realizar lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 415nm.<sup>[2]</sup>

#### b) PROCEDIMIENTO MÉTODO DE CLORURO ESTAÑOSO PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL

- En primera instancia se debe realizar una digestión que garantice el paso de las formas de fósforo a ortofosfatos, para ello se opta por una digestión con ácido nítrico y persulfato de amonio.
- Transferir 50mL de muestra o una alícuota diluida a 50mL en un erlenmeyer de 125mL y añada 1mL de la solución de ácido sulfúrico 11N, añada 0,4g de persulfato de amonio, mezcle y caliente la muestra suavemente hasta obtener un volumen de 10mL.
- Enfriar, agregar 40mL de agua destilada, adicionar 2 gotas de fenolftaleína, si no presenta coloración rosada adicionar NaOH 1N hasta obtener un ligero color rosado, filtrar por membrana de 0,45µm, aforar a 100mL.
- Agregar 4mL de la solución de Molibdato (5.2.3) mezclando después de cada adición y 0,5mL (o 10 gotas) de solución de cloruro estañoso. Tanto la velocidad del desarrollo del color como la intensidad del color dependen de la temperatura de la solución final, cada aumento de 1°C produce un aumento en el color alrededor del 1%. Por lo tanto, las muestras, patrones, blanco y reactivos se deben encontrar con una diferencia de temperatura de no mayor de 2°C y la temperatura de trabajo debe estar entre 20°C y 30°C.

- Después de 10 minutos, pero antes de 12 minutos, empleando el mismo intervalo específico para todas las determinaciones, medir fotométricamente el color a 690nm y comparar con una curva de calibración, usando un blanco de agua destilada, que ha pasado por todo el procedimiento. Tomando en cuenta que el color se desarrolla inicialmente en forma progresiva y posteriormente se desvanece, es esencial que el tiempo sea el mismo para las muestras como para los patrones.
- Se debe tener en cuenta que todo el material debe ser lavado con jabón libre de fósforo, la manipulación de los recipientes debe ser con extremo cuidado ya que se pueden producir interferencias que son muy considerables para contenidos bajos en fósforo.
- La digestión con persulfato y ácido sulfúrico se debe realizar en campana de extracción, si el volumen de una muestra llega a sequedad, se producirá un gas irritante.<sup>[1]</sup>

#### **c) PROCEDIMIENTO MÉTODO DE 4-AAP PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES**

- a) Medir 500mL de muestra en un erlenmeyer de 750mL con boca esmerilada, ajustar el pH con NaOH 2,5N si ha sido preservada o con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> si no está preservada, hasta llegar a un pH de 4.0 +/- 0,2. O viración de color con naranja de metilo.
  - b) Destilar la muestra 450mL y luego adicionar 50mL de agua caliente con un embudo de caña larga y continuar con la destilación hasta obtener un volumen cercano de 500mL.
  - c) Con una destilación se puede obtener una buena purificación de la muestra, sin embargo, de obtenerse una solución turbia se debe acidular con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> usando indicador naranja de metilo hasta viración o usando un pH-metro hasta pH=4,0 y destilar nuevamente.
- *TRATAMIENTO CUANDO EL SEGUNDO DESTILADO ES TURBIO:*
    - Extraer una porción de 500 mL de la muestra original de la siguiente forma:
    - Adicione 4 gotas de indicador anaranjado de metilo y acidifique con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N.
    - Transfiera a un embudo de separación y adicione 150 g de NaCl.
    - Extraiga con 5 porciones sucesivas de CHCl<sub>3</sub>, utilizando 40 mL en la primera extracción y 25 mL en cada porción sucesiva.

- Transfiera la capa de  $\text{CHCl}_3$  a un segundo embudo de separación y extraiga con 3 porciones sucesivas de solución de  $\text{NaOH}$  2,5 N, usando 4,0 mL en la primera porción y 3,0 mL en las 2 porciones siguientes.
  - Combine los extractos alcalinos, caliente en un baño de agua hasta remover todo el  $\text{CHCl}_3$ , cuando este frío, se diluye a 500 mL con agua destilada.
  - Proceda con el procedimiento como se describe en 9.1, 9.2 y 9.3
- d) Se toman 100mL del destilado.
- e) Adicionar 2,5 mL de solución  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,5 N e inmediatamente ajustar el pH a  $7,9 \pm 0,1$  con la solución tampón de fosfato. Adicionar 1 mL de solución de 4-aminoantipirina, mezclar bien, adicionar 1 mL de solución de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , y mezclar bien.
- f) Después de 10 minutos, transferir a las celdas y lea la absorbancia de las muestras y el blanco a 500nm.

Se debe asegurar que los reactivos son frescos ya que de lo contrario causan tonos diferentes y por consiguiente errores en las mediciones. <sup>[1]</sup>

### **CONTROL DE CALIDAD**

Antes de analizar las muestras en la jornada de trabajo se debe realizar una verificación de un blanco y una solución estándar (1,35mg de  $\text{N-NO}_3/\text{L}$ , 1mg  $\text{P-PO}_4/\text{L}$  y 2 mg Fenol/L) se realizará una muestra por duplicado cada 20 muestras.

**Carta control:** se debe analizar patrones junto con muestras dopadas en rango bajo y alto una vez a la semana con el fin de evaluar la recuperación y el sesgo, si el error es mayor al 10% se deben tomar medidas para la corrección.

## ANEXO 2

### Evaluación de las condiciones propuestas para determinación de nitratos usando mayor cantidad de muestra.

Ensayo preparando soluciones con un contenido de 45mg de NO<sub>3</sub>, en las tablas 1 y 2 se registran los resultados.

**Tabla 1:** Resultados para soluciones de contenido neto de 45mg de NO<sub>3</sub>.

Concentración (mg/L)	V (mL)	Concentración promedio	Concentración en curva	Concentración con factor	Tiempo secado
15	3	0,4395	15,24	15,24	3 ½
10	4,5	0,4430	15,37	10,25	4 ½
9	5	0,4310	14,96	8,98	5
5	9	0,4465	15,35	5,12	8

**Tabla 2:** Resultado estadístico para soluciones de contenido neto de 45mg de NO<sub>3</sub>.

Estándar	Concentración promedio	S	% CV	Error relativo	Varianza	t-calculada
15,00	15,23	0,189	1,24	1,533	3,57E-02	2,7232

Para este ensayo es importante ver el porcentaje de coeficiente de variación, se observa que no es muy alto, junto con la desviación estándar, por lo que se puede decir que no hay una diferencia significativa, además para 3 grados de libertad la t tabulada con un 95% de confianza es de 3,1824 por lo que se aceptan estos valores.

Esto indica que un aumento en el volumen de la muestra conlleva con un aumento en la sensibilidad de la técnica demostrado hasta un volumen de 9mL, La fórmula quedaría de la siguiente manera:

$$A * \frac{3}{B}$$

Donde A= concentración obtenida por la curva.

B= volumen utilizado para el análisis.

El 3 es debido al volumen utilizado para hacer la curva, de esta manera, si se determina 1mg/L de nitrato en una muestra usando 9mL la concentración obtenida sería de 0,333 mg/L por lo que es posible hacer a esta técnica más sensible aumentando la cantidad de muestra, teniendo en cuenta que el procedimiento conllevará un aumento en el tiempo requerido para llevar a sequedad la muestra.

### ANEXO 3

#### Datos necesarios para el cálculo de la incertidumbre en las metodologías validadas.

**Tabla 1:** Datos para el cálculo de la incertidumbre en la metodología para la determinación de nitratos.

DOPAJE	NIVEL BAJO	CONCENTRACIÓN REAL	%R
<b>RB</b>	0,23	0,2265	99,26
		0,2227	102,68
		0,2304	94,12
		0,1994	96,40
		0,2304	95,26
		0,2420	103,82
		0,2110	100,97
<b>NIVEL ALTO</b>			
<b>RA</b>	3,39	3,4034	104,33
		3,3918	96,50
		3,4383	102,80
		3,3258	96,88
		3,3530	91,91
		3,3918	94,78
		3,3220	93,63

**Tabla 2:** Datos para el cálculo de la incertidumbre en la metodología para la determinación de fósforo total.

DOPAJE	NIVEL BAJO	CONCENTRACIÓN REAL	%R
<b>RB</b>	0,10	0,1022	103,33
		0,1056	106,24
		0,0888	104,90
		0,1011	103,56
		0,0944	94,83
		0,0955	101,77
		0,0933	101,99
<b>NIVEL ALTO</b>			
<b>RA</b>	2,00	1,9553	98,71
		2,0235	95,73
		1,9810	95,73
		1,9653	98,64
		1,9978	102,21
		1,9541	100,80
		2,0179	103,03

**Tabla 3:** Datos para el cálculo de la incertidumbre en la metodología para la determinación de fenol.

<b>DOPAJE</b>	<b>NIVEL BAJO</b>	<b>CONCENTRACIÓN REAL</b>	<b>%R</b>
<b>RB</b>	0,30	0,3177	99,81
		0,2990	97,94
		0,2943	99,81
		0,3102	102,62
		0,3224	96,06
		0,2896	97,00
		0,3177	97,47
<b>RA</b>	6,00	<b>NIVEL ALTO</b>	
		6,0112	103,21
		5,9878	95,24
		5,9035	100,05
		5,9991	97,70
		6,0487	99,81
		5,9831	98,99
6,0019	97,82		

**Tabla 4:** Parámetros estadísticos para la determinación de la incertidumbre de nitratos, fósforo total y fenoles.

	<b>Nitratos</b>		<b>Fósforo total</b>		<b>Fenoles</b>	
	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>
<b>X<sub>promedio</sub></b>	0,2232	3,3752	0,0973	1,9850	0,3073	5,9908
<b>S</b>	0,0141	0,0430	0,0059	0,0288	0,0129	0,0441
<b>%CV</b>	6,3002	1,2741	6,0427	1,4491	4,2132	0,7359