

**VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN
DE CROMO (Cr), HIERRO (Fe) Y ALUMINIO (Al) POR
ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS EN MUESTRAS DE AGUA RESIDUAL,
SUPERFICIAL Y POTABLE DESARROLLADA EN EL LABORATORIO
AMBILAB SAS DEL MUNICIPIO DE PITALITO- HUILA**



YULIETH CRISTINA CERÓN SOTELO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN - CAUCA
2018**

**VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN
DE HIERRO (Fe), ALUMINIO (Al) Y CROMO (Cr) POR
ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS EN MUESTRAS DE AGUA RESIDUAL,
SUPERFICIAL Y POTABLE DESARROLLADA EN EL LABORATORIO
AMBILAB SAS DEL MUNICIPIO DE PITALITO- HUILA**

**Trabajo de grado en Modalidad de Pasantía presentado como requisito para
obtener el título de Químico**

YULIETH CRISTINA CERÓN SOTELO

Director: Ph. D Edier Humberto Pérez

Director Grupo de Investigación Grupo de Agroquímica

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

2018

Nota de Aceptación

Director _____
Ph. D EDIER HUMBERTO PÉREZ

Jurado 1 _____

Jurado 2 _____

DEDICATORIA

A Dios y la Virgen de Miagros por darme la vida y la fortaleza, Por ser mi inspiración en cada uno de los pasos que Di en mi día a día; por ser mi luz y mi guía, por toda la sabiduría que me dieron para afrontar con tenacidad y coraje cada momento en los que sentí desvanecer, no todo es fácil en la vida pero con Fe y a Su lado todo es posible. El sacrificio fue grande pero tú siempre me diste la fuerza necesaria para continuar y lograrlo, porque todo lo puedo en Cristo que me fortalece.

A mis tías Nilsa y Aliria Sotelo, sé que desde el cielo siempre estuvieron a mi lado y fueron y serán mi ángel protector.

A mi hermosa familia, mi mayor bendición, en especial a mis dos madres Marianita Cerón y Luvy Yaneth Sotelo, por educarme en los mejores principios y valores, por todo su sacrificio para poder convertirme en la persona que hoy soy, por su entrega incondicional, por sus oraciones, por todo el amor que solo una madre puede dar, que el Dios todopoderoso nos de muchos años más de vida para poder disfrutar de cada momento. A mi padre Neiro Cerón por todo su cariño incondicional y desinteresado, por su apoyo y todas sus palabras sabias. A mis hermanos Eduar y Karen Cerón, simplemente por ser mis mejores amigos. A todos ellos, Gracias por enseñarme el milagro del amor.

A Tommy, mi más grande compañía desinteresada y fiel en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar a mi lado en cada tristeza y alegría, en cada fracaso y éxito, y por permitirme cumplir y culminar esta etapa de grandes sacrificios.

Como no dar gracias a toda mi familia que ha sido el mejor regalo del cielo, por su sacrificio, por su apoyo incondicional, por su entrega.

A mi director de grado, el profesor Edier Humberto Pérez, por depositar toda su confianza en mí, por su apoyo y ayuda constante.

A la universidad del Cauca y al Departamento de Química por permitir que me formara como persona y profesional. A todos mis profesores, en especial a Olga Hoyos, Liliana Montalvo, Isabel Bravo, Ricardo Benítez, Edier Humberto Pérez y todos aquellos que se quedan sin mencionar, mil gracias por su entrega de conocimientos, preocupación y orientación.

Al laboratorio AMBILAB S.A.S y a todo su equipo en cabeza del ingeniero Oscar Eduardo Valbuena y su esposa Lady Varón, Viviana Zúñiga, Angélica Ramos, Luis Miguel, Aldemar Calvache y Jorge Valbuena, por su apoyo económico e institucional y por brindarme la oportunidad de realizar mi práctica en sus instalaciones, espero haya sido de bastante utilidad para el servicio de la comunidad huilense y sus alrededores. Gracias por su cariño y colaboración.

A los LMG (Caterine, Ingrid, Viviana, Cenayda, Norma, Miguel, Misael, Edwin), por todas sus locuras, por su compañía, su cariño, por cada momento compartido, por ser mi familia en el tiempo de mi carrera.

A los jurados por su colaboración y tiempo dedicado a la revisión de este proyecto.

A todos y cada uno de los que fueron partícipes de esta etapa de una u otra manera, mil gracias, que Dios los colme de infinitas bendiciones.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo general.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	20
4.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA.....	20
4.2 CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS.....	20
4.2.1 Contaminación por cromo.....	21
4.2.2 Contaminación por hierro.....	22
4.2.3 Contaminación por aluminio.....	23
4.3 METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE Cr, Fe y Al.....	25
4.3.1 Método para la determinación de cromo.....	25
4.3.2 Método para la determinación de hierro.....	26
4.3.3 Método para la determinación de aluminio.....	27
4.4 PROCESO DE ESTANDARIZACIÓN.....	29
4.5 ACREDITACIÓN.....	29
4.5.1 Validación.....	29
4.5.2 Pruebas de desempeño.....	30
4.6 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO.....	30
4.6.1 Límite de detección (LOD).....	30
4.6.2 Límite de cuantificación (LOQ).....	30
4.6.3 Precisión.....	31
4.6.4 Exactitud.....	32

4.6.5 Linealidad	33
4.6.6 Sensibilidad	33
4.6.7 Recuperación (%R)	33
4.6.8 Incertidumbre	34
4.6.9 Cálculo de la incertidumbre teniendo en cuenta las fuentes globales de incertidumbre.....	35
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO SPSS	36
4.7.1 Pruebas de normalidad	36
4.7.2 Pruebas paramétricas	37
4.7.3 Pruebas no paramétricas	38
4.7.4 Análisis de regresión lineal simple	39
5. METODOLOGÍA	40
5.1 PRE-VALIDACIÓN	40
5.2 CALIBRACIÓN DEL MATERIAL VOLUMÉTRICO Y DE LOS EQUIPOS.....	40
5.3 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.....	40
5.3.1 Equipos	40
5.3.2 Materiales.....	41
5.3.3 Reactivos.....	41
5.3.4 Conservación y manipulación de las muestras	41
5.3.5 Diseño experimental para cada una de las determinaciones	42
5.4 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE CROMO	42
5.4.1 Lavado del material	42
5.4.2 Longitud de onda.....	42
5.4.3 Preparación de la curva de calibración.....	42
5.4.4 Determinación de cromo en muestras de agua (ver anexo 7).....	43
En este método no se hace evaluación de interferentes, simplemente se sigue el procedimiento de acuerdo a la norma.	43
5.5 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO	44

5.5.1 Lavado de material	44
5.5.2 Longitud de onda.....	44
5.5.3 Preparación de la curva de calibración.....	44
5.5.4 Determinación de Fe en muestras de agua (ver anexo 8).....	45
5.6 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE ALUMINIO	46
5.6.1 Lavado de material	46
5.6.2 Longitud de onda.....	46
5.6.3 Preparación de la curva de calibración.....	46
5.6.4 Determinación de Al en muestras de agua (ver anexo 9).....	47
5.7 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	48
5.8 MEDIDAS ANALÍTICAS PARA LA VALIDACIÓN DE Cr, Fe Y Al	49
5.8.1 Estandarización del sistema instrumental	49
5.8.2 Linealidad instrumental.....	49
5.8.3 Precisión instrumental	50
5.8.4 Límites críticos	50
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS	51
6.1 VALIDACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL	51
6.1.1 Linealidad instrumental.....	51
6.1.2 Precisión instrumental	60
6.1.3 Determinación de los límites de detección y cuantificación.....	63
6.2 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA	66
6.2.1 Linealidad de la metodología.....	66
6.2.2 Precisión y exactitud de la metodología en función del nivel de concentración	73
6.2.3 Precisión y exactitud con patrones para cromo, hierro y aluminio.....	75
6.2.4 Validación con muestras de agua residual, superficial y potable para cromo y aluminio, y agua potable para hierro (evaluación de la exactitud y la precisión).....	76

6.3 CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE DE LOS MÉTODOS TENIENDO EN CUENTA LAS FUENTES GLOBALES DE INCERTIDUMBRE.....	78
6.4 Resumen de las figuras de méritos de las metodologías empleadas.....	81
7. CONCLUSIONES	83
REFERENCIAS	84
ANEXOS.....	89

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Fenantrolina	26
Figura 2: Estructura Química de eriocromo de cianina R	27
Figura 3: Incertidumbre para Cromo, Hierro y Aluminio con la metodología de fuentes globales	81
Figura 4: Diagrama de flujo para la determinación de Cr en muestras de agua	95
Figura 5: Diagrama de flujo para la determinación de Fe en muestras de agua	96
Figura 6: Diagrama de flujo para la determinación de Al en muestras de agua	97
Figura 7: Curvas de calibración para evaluar la linealidad instrumental de Cr, Fe y Al	98
Figura 8: Curvas de calibración para evaluar la linealidad instrumental de la metodología para Cr, Fe y Al	99

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 : Curva de calibración para cromo	43
Tabla 2 : Curva de calibración para hierro	45
Tabla 3 : Curva de calibración para aluminio (III)	47
Tabla 4 : Grupo básico de muestras para cada ensayo	49
Tabla 5 : Rango lineal para Cr, Fe y Al	51
Tabla 6 : Resultados para evaluar la linealidad instrumental de Cr, Fe y Al	52
Tabla 7 : Valores calculados de la Q de Dixon para saber si hay datos atípicos	53
Tabla 8 : Evaluación de la normalidad para Cr, Fe y Al en función del día	53
Tabla 9 : Evaluación de la normalidad para Cr, Fe y Al en función del nivel de concentración	53
Tabla 10 : ANOVA de un factor para evaluar la absorbancia en función del nivel de concentración para Cr, Fe, y Al	54
Tabla 11 : ANOVA de un factor para evaluar la absorbancia en función del día para Cr, Fe, y Al	55
Tabla 12 : Prueba de Tukey ^a para evaluar la varianza entre las absorbancias y la concentración	56
Tabla 13 : Evaluación de la linealidad instrumental para cromo, hierro y aluminio	57
Tabla 14 : Evaluación de la correlación de Pearson	58
Tabla 15 : Evaluación estadística de la pendiente y el intercepto de las curvas de calibración	59
Tabla 16 : Análisis de varianza para evaluar la regresión lineal de las curvas	60
Tabla 17 : Curvas de calibración para evaluar la precisión instrumental en condiciones de repetibilidad	61
Tabla 18 : Curvas de calibración para evaluar la precisión instrumental en condiciones de precisión intermedia	62
Tabla 19 : Evaluación de la precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia	63
Tabla 20 : Límites críticos teóricos para cromo, hierro y aluminio	64

Tabla 21: Determinación del LOQ experimental para cromo, hierro y aluminio	65
Tabla 22: Determinación del LOD experimental para cromo, hierro y aluminio	66
Tabla 23: Resultados para evaluar la linealidad de la metodología	67
Tabla 24: Valores de la Q de Dixon para evaluar datos atípicos	68
Tabla 25: Evaluación de la normalidad para la metodología en función del día	68
Tabla 26: Evaluación de la normalidad para la metodología en función de la concentración	68
Tabla 27: ANOVA de un factor para evaluar la absorbancia en función del nivel de concentración para Cr, Fe, y Al	69
Tabla 28: ANOVA de un factor para evaluar la absorbancia en función del día	70
Tabla 29: Prueba de Tukey ^a para evaluar la varianza entre absorbancia y nivel de concentración	71
Tabla 30: Evaluación de la linealidad de la metodología para cromo, hierro y aluminio	72
Tabla 31: Evaluación de la correlación de Pearson	73
Tabla 32: Resultados para evaluar la exactitud y precisión de los métodos	74
Tabla 33: Evaluación de los porcentajes de recuperación mediante el estadístico de Levene	75
Tabla 34: Exactitud y precisión para la metodología de cromo, hierro y aluminio	75
Tabla 35: Resultados de la precisión y la exactitud en patrones fortificados	76
Tabla 36: Evaluación de la precisión y la exactitud para muestras reales fortificadas	77
Tabla 37: Fuentes para el cálculo de la incertidumbre	78
Tabla 38: Incertidumbres de los métodos	79
Tabla 39: Reporte de la incertidumbre para cromo, hierro y aluminio	80
Tabla 40: Resumen de las figuras de mérito para Cr, Fe y Al.	82
Tabla 41: Diseño experimental para la determinación de Cr	92
Tabla 42: Diseño experimental para la determinación de Fe	93
Tabla 43: Diseño experimental para la determinación de Al	94

ACRÓNIMOS

IDEAM	Instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales
PICCAP	Programa interlaboratorio de control de calidad de agua potable
ONAC	Organismo Nacional de Acreditación de Colombia
OMS	Organización Mundial de la Salud
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
ANOVA	Análisis de varianza
EDTA	Sal sódica de dihidrato del ácido etilendiaminotetraacético
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
INS	Instituto Nacional de Salud
CV	Coefficiente de variación
Sig.	Significancia
NA	No aplica
gl	Grados de libertad
H₀	Hipótesis nula
H_a	Hipótesis alternativa
μ	Incertidumbre
r	Coefficiente de correlación
m	Pendiente
b	Intercepto
n	Número de datos
R	Recuperación
S	Desviación estándar
%E	Porcentaje de error
DSR	Desviación estándar relativa
F	Estadístico F de la prueba de Fisher
Cr	Cromo
Fe	Hierro
Al	Aluminio
H₃PO₄	Ácido fosfórico
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HNO₃	Ácido nítrico
NaOH	Hidróxido de sodio
HCl	Ácido clorhídrico
ECR	Eriocromo cianina R
SA	Sin autor
SF	Sin fecha
Col.	Colaboradores

RESUMEN

En la actualidad la prestación de servicios analíticos de laboratorios, toma de forma ascendente más auge y utilidad. El efecto de un análisis de aguas es forjar resultados correctos y confiables, siendo la verificación de ensayos uno de los aspectos más importantes y factor clave para conseguir este propósito. Las metodologías analíticas para la determinación de hierro, cromo y aluminio mediante los métodos de fenantrolina, difenilcarbazida y cianina de eriocromo R, respectivamente, por espectrofotometría UV-Vis se implementaron en el laboratorio ambiental AMBILAB S.A.S ubicado en el municipio de Pitalito del departamento del Huila, bajo la normatividad NTC-ISO-IEC 17025 (Instituto Colombiano, 2005). Para su respectivo proceso se implementaron los procedimientos desarrollados en los Standar Methods del 2012 para la evaluación de aguas (Baker, y col., 2012); considerando los parámetros estadísticos establecidos por el IDEAM, tales como precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad, límite de detección y cuantificación (IDEAM, 2006). Para la evaluación de la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad se corrieron seis curvas de calibración en días diferentes obteniéndose una buena linealidad y sensibilidad en cada una de ellas y un coeficiente de correlación muy cercano a la unidad. Para la exactitud del método se obtienen buenos porcentajes de recuperación por lo que se consideran aceptables. Al analizar los resultados obtenidos desde el punto de vista estadístico, se puede llegar a la conclusión de que la desviación de los datos obtenidos a partir de la secuencia experimental es significativamente baja y que no se manifiestan diferencias significativas, lo cual se corrobora teniendo en cuenta que los valores de los porcentajes de error y coeficiente de variación están por debajo del 10%, cumpliendo así con los criterios de aceptabilidad. Los límites de detección, de cuantificación y rangos lineales fueron, para Cr 0,002, 0,007 y 0,01-0,70 mg Cr/L; para Fe 0,009, 0,027 y 0,05-0,60 mg Fe/L; y para Al 0,006, 0,02 y 0,02-0,30 mg Al/L, respectivamente.

Palabras Claves: determinación, implementación, Validación, aluminio, hierro, cromo, agua potable, residual y superficial.

1. INTRODUCCIÓN

Teniendo en cuenta que el agua es un componente imprescindible en la vida del planeta, se debe destacar que como tal, contribuye al mantenimiento y funcionamiento de los ecosistemas, a la salud, bienestar y seguridad alimentaria de las sociedades y al avance económico, social, industrial y cultural del país. Por lo tanto se debe propender de la conservación, uso y manejo adecuados de los elementos del sistema hídrico, pues, con el paso del tiempo, las actividades antropogénicas, el continuo crecimiento de la población, entre otros factores, han contribuido al deterioro de este recurso y han afectado negativamente su calidad y cantidad.

Hoy en día se deben plantear retos y abrir nuevas fronteras de investigación que vayan en pro de su mejoramiento, pues debido al impacto de las diversas actividades humanas se vierten hoy en ríos, lagos, acuíferos y demás fuentes hídricas grandes cantidades de contaminantes que afectan los ecosistemas y deterioran la calidad de vida del hombre (Molina, y col., 2010). La composición química natural de las aguas puede verse alterada por actividades humanas: agrícolas, ganaderas e industriales, principalmente. La consecuencia es la incorporación de sustancias de diferente naturaleza a través de vertidos de aguas residuales o debido al paso de las aguas por terrenos tratados con productos agroquímicos o contaminados que afectan los ecosistemas y deterioran la calidad de vida del hombre (S. A, Análisis de aguas, 2017).

Actualmente los laboratorios que se encargan de realizar los respectivos análisis para supervisar la calidad del agua requieren la implementación de métodos rápidos, precisos, confiables y económicos; además de la supervisión de las diferentes entidades gubernamentales de control como el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM), el Instituto de Salud Pública y el Programa Interlaboratorio de Control de Calidad de Agua Potable (PICCAP), que son los encargados de acreditar los laboratorios asegurando de esta manera resultados confiables (Molina, y col., 2010). Durante la implementación de la gestión de calidad, el laboratorio estandarizó varios métodos de análisis importantes para su evaluación; entre los químicos se encuentran metales pesados como cromo, hierro y aluminio, parámetros que se tratarán en este documento.

El presente estudio tiene como propósito la estandarización de metodologías analíticas para la determinación de cromo y aluminio en agua potable, superficial y residual, y hierro en agua potable, mediante espectrofotometría UV-Vis. El

desarrollo de estos métodos de análisis se basó en los Standar Methods para la evaluación de aguas (Baker, y col., 2012).

Los efectos de los metales que se encuentran en las aguas naturales, potables y residuales sobre la salud humana, pueden ir desde benéficos, causantes de problemas y hasta tóxicos, esto es dependiendo de su concentración por lo que su cuantificación en cuerpos de agua es importante. Algunos metales son esenciales, otros pueden afectar adversamente a sus consumidores, como también a los sistemas de tratamiento de aguas residuales y cuerpos receptores (Norma, 2016); es esta una de las principales razones por las que se implementaron metodologías analíticas para la determinación de hierro, cromo y aluminio en el laboratorio ambiental AMBILAB S.A.S del municipio de Pitalito-Huila.

El aluminio es un elemento muy abundante en la corteza terrestre y se encuentra en minerales, rocas y arcillas. El sulfato de aluminio y potasio (alumbre) se usa en los procesos de floculación en los sistemas de tratamiento de aguas por lo que este metal se puede encontrar en las aguas tratadas como un residuo y puede ser fácilmente absorbido por el cuerpo humano y causar enfermedades (Baker, y col., 2012).

El cromo se encuentra presente en agua y suelo principalmente en dos estados de oxidación: Cr (III) o Cr (VI), aunque también puede encontrarse como óxido de cromo, sulfato de cromo, trióxido de cromo, ácido crómico y dicromato. En presencia de la materia orgánica, el Cr (VI) presente en aguas y suelos es reducido a Cr (III); sin embargo, las altas concentraciones del ión en estado hexavalente pueden sobrepasar esta capacidad de reducción, lo que impediría su adecuada eliminación (Severiche, y col., 2013).

Debido a que el agua subterránea es a menudo anóxica, algo de hierro soluble en ella está en estado ferroso. Por la exposición al aire o por la adición de oxidantes, el hierro ferroso se oxida al estado férrico (Fe^{3+}) y se puede hidrolizar a una forma roja, como óxido férrico hidratado insoluble. En ausencia de la formación de iones acomplejados, el hierro férrico no es significativamente soluble a menos que el pH sea muy bajo (Baker, y col., 2012).

La validación de los métodos para determinar Cr, Fe y Al es importante en el laboratorio AMBILAB S.A.S, ya que así se cumple con los requerimientos para cada ensayo, creando un alto nivel de confianza y garantizando la seguridad del resultado del análisis, ya sea para investigación o para prestación de servicios.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El deterioro de los recursos hídricos y el estudio de su calidad es uno de los problemas ambientales más críticos a nivel mundial, pues es de gran importancia evaluar sus características físicas, químicas y biológicas que intervienen en la salud de la población, el desarrollo económico nacional y la calidad ambiental de los ecosistemas. La investigación científica desempeña un papel importante en la conservación y el empleo racional del agua a través de la generación de conocimiento sobre su calidad y su impacto sobre el medio ambiente.

El propósito fundamental de un laboratorio de análisis es brindar resultados de excelente confiabilidad, mediante un sistema de calidad bien definido, documentado y desarrollado. Por tal razón es fundamental la implementación de técnicas de análisis que determinen la trazabilidad de las metodologías y evalúen continuamente dicho sistema.

El laboratorio AMBILAB S.A.S no cuenta con metodologías analíticas validadas e implementadas, por lo que requiere su estandarización y validación para la medición de parámetros físico-químicos y biológicos que arrojen resultados confiables, precisos, exactos y queden documentados atendiendo siempre las políticas de calidad al interior del laboratorio para presentarlos a las diferentes instituciones que rigen los programas de vigilancia y control de calidad del agua, responsables de la acreditación y certificación.

Por esto el laboratorio solicitó la implementación y estandarización de métodos de análisis espectrofotométricos de hierro, cromo y aluminio; asegurando la calidad de las mediciones y, así, ofrecer un servicio de buena calidad con resultados altamente confiables.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Implementar y validar métodos de análisis para la determinación de cromo, hierro y aluminio a través de técnicas espectrofotométricas en muestras de agua residual, superficial y potable en el laboratorio AMBILAB SAS.

3.2 Objetivos específicos

- Implementar métodos analíticos para determinar el contenido de hierro en agua potable, aluminio y cromo en muestras de agua residual, superficial y potable, siguiendo los procedimientos prescritos en los Standar Methods SM 3500-Fe, SM 3500-Al y SM 3500-Cr, respectivamente.
- Demostrar que los resultados arrojados por espectrofotometría UV-Vis para la determinación y cuantificación de los metales son confiables y precisos.
- Establecer los parámetros de calidad para cada método tales como, exactitud, precisión (repetibilidad, precisión intermedia), sensibilidad, intervalo de linealidad y límites de detección y cuantificación.

4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

El agua como recurso ambiental, bien económico y bien social debería hacer parte de la agenda pública colombiana, no sólo en cuanto a su manejo y preservación, sino también en cuanto a las implicaciones sociales que se puedan generar en su tenencia y uso (Díaz, y col., 2009), es por eso que la evaluación constante de su calidad se ha convertido en una de las principales problemáticas a nivel mundial; motivo por el cual los laboratorios de ensayo y calibración implementan técnicas de análisis que determinen dichos contaminantes, y de esta manera lograr ser acreditados.

4.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA

La contaminación del agua se denomina a cualquier alteración de sus características organolépticas, físicas, químicas, radiactivas y microbiológicas; por tal motivo, es definida como la presencia de sustancias nocivas y molestas en los recursos naturales como el aire, el agua, el suelo, colocadas allí por la actividad humana o procesos naturales que ocasiona efectos adversos sobre el ambiente y los seres vivos. La contaminación hídrica se lleva a cabo por vertidos, derrames, desechos y depósitos directos e indirectos de toda clase de materiales. Entre las fuentes principales de contaminación del agua se destacan: las aguas residuales domésticas e industriales, el escurrimiento de agua en zonas de producción agrícola y ganadera, el arrastre de compuestos presentes en la atmósfera por las aguas lluvias y las aguas procedentes de los procesos de extracción minera (Segura, 2007).

4.2 CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS

La civilización humana y el medio ambiente (tanto terrestre como acuático) están siendo expuestos actualmente a los mayores niveles de metales. La descarga de estos en el medio natural, puede estar asociado con numerosas consecuencias ambientales resultantes de su no biodegradabilidad y persistencia (Asaduzzaman, y col., 2017).

Metales tan conocidos y utilizados como el plomo, mercurio, cromo, cobre, aluminio, o plata, etc., son sustancias tóxicas si están en concentraciones altas, especialmente sus iones y compuestos. Muchos de estos elementos son micronutrientes necesarios para la vida de los seres vivos y deben ser absorbidos por las raíces de las plantas o formar parte de la dieta de los animales. Pero cuando por motivos naturales o por la acción del hombre se acumulan en los suelos, las aguas o los seres vivos en concentraciones altas se convierten en tóxicos peligrosos. Algunos compuestos de estos metales pueden sufrir

acumulación en la cadena trófica, lo que origina que a pesar de encontrarse en dosis muy bajas en el ambiente, pueden llegar a concentrarse en plantas o animales, hasta provocar daños en la salud. Otros elementos, especialmente aluminio y hierro son muy abundantes en las rocas y en el suelo, y también pueden ser tóxicos, pero afortunadamente se encuentran en formas químicas no solubles y es muy difícil que los seres vivos los asimilen (Barba, 2002). En los vertederos se suele producir lixiviación cuando el agua de lluvia disuelve y arrastra las sustancias tóxicas y las transporta por los ríos. Al ser absorbidos por los seres vivos, estos tienen efectos adversos sobre la salud humana, pues cada metal y cada elemento químico contaminante tienen un mecanismo de acción y un lugar de acumulación preferido (Romero, 2009).

4.2.1 Contaminación por cromo

El Cr es un elemento que se encuentra normalmente en rocas, animales, plantas y el suelo. El Cr^0 , Cr^{+3} y Cr^{+6} son las formas más comunes en las que se encuentra este elemento. Es el segundo metal, después del plomo, más común presente en los acuíferos contaminados. Los niveles de toxicidad que presenta este metal en el recurso hídrico debe estar por debajo de 0,1 mg/L (Baker, y col., 2012).

Las principales actividades que involucran la contaminación por Cr son la minería y la industria. La contaminación de las aguas ocurre por la descarga de desechos derivados de la manufactura de colorantes y pigmentos; la mayor parte de las veces, el Cr se va al fondo y sólo una pequeña parte se diluye en el agua. El Cr^{+6} tiene un potencial de oxidación muy grande y se reduce rápidamente a Cr^{+3} en cuanto entra en solución con materia orgánica. Éste es menos soluble en agua, aunque también puede enlazarse con moléculas orgánicas lipofílicas, lo que lo vuelve biodisponible (Molina, y col., 2010).

La solubilidad del Cr^{+3} está limitada por la formación de diversos tipos de óxidos e hidróxidos. También presenta una fuerte tendencia a formar complejos estables con especies orgánicas e inorgánicas cargadas negativamente. Debido a esto, él no migra de manera significativa en el rango de pH cubierto por las aguas naturales, sino que precipita rápidamente y se adsorbe en partículas en suspensión y sedimentos del fondo. En solución, el Cr^{+6} existe en forma de hidrocromatos, cromatos y dicromatos, dependiendo del pH; los cromatos predominan a pH básico y neutro, los hidrocromatos a pH ligeramente ácido (6 a 6.2), mientras que a pH muy bajo predominan los dicromatos. El cambio de un estado de valencia a otro depende de factores como la materia orgánica, el pH y el potencial redox (Rivera, y col., 2003).

La toxicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad de Cr^{+6} hace que la contaminación del ambiente sea una grave amenaza para quienes lo habitan. Para evitar esto, los efluentes cargados de Cr deben ser tratados con una tecnología eficiente para conocer los requerimientos de descarga antes de que sean llevados al medio ambiente. El proceso típico de tratamiento de aguas residuales con carga de Cr (VI) es reducirlo a Cr (III) que es menos tóxico, seguido por la precipitación a valores de pH de 8-9,5. La reducción se realiza convencionalmente usando bisulfito o metabisulfito como agentes reductores (Moussavi, y *col.*, 2015).

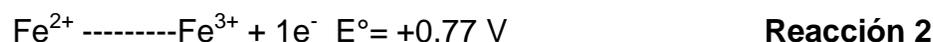
4.2.2 Contaminación por hierro

Es importante indicar que es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, representando un 5.6%. Frecuentemente se da en forma ferrosa Fe^{2+} y férrica Fe^{3+} siendo las sales ferrosas más solubles en agua que las sales férricas (Valencia, s. f.). Está presente en aguas dulces naturales en concentraciones de 0,5 a 50 mg/L. También puede haber algo de Fe en el agua potable debido a la utilización de coagulantes de Fe o a la corrosión de tuberías de acero o Fe colado durante la distribución del agua. El Fe es un elemento esencial en la nutrición humana, pues un número importante de proteínas lo contienen, por ejemplo la hemoglobina, los citocromos y numerosas enzimas de oxido-reducción (OMS, 2010). Los niveles de toxicidad de hierro en aguas superficiales no pueden superar los 5 mg/L en aguas superficiales y 0,3 mg/L en agua potable (Baker, y *col.*, 2012).

El hierro en el agua natural proviene de la disolución de las rocas y minerales donde se encuentra contenido. También puede incrementarse artificialmente, porque es muy utilizado en las industrias y existe la posibilidad de vertidos por medio de efluentes industriales y residuos domésticos. En aguas superficiales el Fe se encuentra en niveles muy bajos, ya que en estas el ión es prácticamente insoluble. Por otro lado el Fe^{2+} no se encuentra normalmente en este tipo de aguas debido a que se encuentra en condiciones anaeróbicas (Valencia, s. f.). Su deficiencia conduce a anemia y malestar. Sin embargo, su sobrecarga puede causar problemas como cáncer de hígado, diabetes, cirrosis, enfermedades del corazón e infertilidad, etc. (Kumar, y *col.*, 2017).

Por lo general, sus sales no son tóxicas en las cantidades comúnmente encontradas en aguas naturales. La presencia de Fe puede afectar el sabor del agua, formar depósitos molestos de óxido férrico en la red de distribución y causar obstrucciones, así como alteraciones en la turbiedad y el color del agua. El bicarbonato ferroso $\text{Fe}(\text{HCO}_3)_2$ es la especie más frecuente en el agua. La dinámica del Fe en agua se mueve en dos extremos típicos: si desciende la

oxigenación se puede producir el incremento de la concentración de Fe^{+2} (más soluble) a partir de la reducción química o biológica de las sales precipitadas de Fe^{+3} presentes en el fondo de la masa de agua, pudiendo alcanzarse más de 1 mg/L de Fe total. Los dos equilibrios de oxido-reducción en que interviene el metal responden a:



El hierro metálico y sus aleaciones son de interés porque el agua los corroe en presencia de oxígeno. El resultado de los productos de la corrosión es hierro en estado iónico el cual puede ser considerado como contaminante del agua.

Las tecnologías más aplicadas para la remoción de Fe son aquellas que combinan la oxidación, precipitación y filtración, siendo empleados diferentes oxidantes como el oxígeno, cloro, permanganato de potasio, dióxido de cloro, ozono, entre otros (Marin, 2011). El principal proceso de tratamiento para la remoción del hierro es la conversión de Fe^{+2} a Fe^{+3} y su precipitación bajo la forma de hidróxido férrico a un pH cercano a 7 donde la solubilidad de este es mínima (Valencia, s. f.).

4.2.3 Contaminación por aluminio

El Al es el tercer elemento más abundante de la tierra, constituye casi el 8% de su corteza. Se encuentra normalmente en forma de silicato de aluminio puro o mezclado con otros metales como sodio, potasio, hierro, calcio, y magnesio pero nunca en forma libre (Baker, y col., 2012). Es un elemento que aunque en la tabla periódica su peso específico no es superior a 5 g/L o que no tienen un número atómico por encima de 20 (no tiene la densidad para ser llamado “pesado”), por su toxicidad, es incluido como metal pesado en algunas listas de dichos tóxicos (Aldana, 2014). Concentraciones de aluminio superiores a 1,5 mg/L constituyen un riesgo de toxicidad en el medio marino; y niveles por debajo de 0,2 mg/L presentan un mínimo riesgo (Baker, y col., 2012).

Es liberado al medio por procesos naturales, procesos de erosión del suelo y erupciones volcánicas, y por acciones antropogénicas. La mayor parte de la ingesta humana de aluminio proviene de la alimentación, por su contenido natural y artificial (conservantes) en los alimentos y el agua. Otra ruta a través de la cual puede llegar al hombre es a través de la lluvia ácida, provocada por la alta contaminación en el medio ambiente, la cual a su vez disuelve el Al que se encuentra en el suelo y lo transporta hacia los mantos de agua dulce, incrementando su concentración y creando una vía de acceso potencial hacia el ser humano (Trejo, y col., 2004).

En la actualidad se han encontrado concentraciones elevadas de este metal en el cerebro de personas que padecen Alzheimer, así como de otros trastornos neurológicos, y se le ha vinculado por tanto con algunas enfermedades del sistema nervioso (S. A., Antecedentes). Es frecuente la utilización de sales de aluminio en el tratamiento del agua como coagulantes para reducir el color, la turbidez, y el contenido de materia orgánica y de microorganismos.

La dinámica de este elemento en aguas naturales se inicia con la meteorización de rocas silicatadas que genera en un principio aluminio coloidal, posteriormente convertido en Al disuelto. Dado que la solubilidad del hidróxido de aluminio presenta un mínimo a $\text{pH}=5,07$, en aguas con pH s más ácidos se encuentra el aluminio en forma iónica (Al^{3+}) o complejoado con cloruros o fluoruros, y a pH s básicos ($\text{pH}>9,0$) debido a su anfoterismo, está como ion aluminato de alta solubilidad (AlO_2^-) (Trejo, y col., 2004).

Existen métodos para reducir las concentraciones residuales de Al en aguas tratadas: realizar el proceso de coagulación a un pH óptimo, evitar el uso de dosis excesivas de aluminio, y filtrar de forma eficiente el floculo de aluminio (OMS, 2010). Para la remoción del Al y otros metales pesados se sugiere la fitoremediación, que es una tecnología basada en el uso de plantas verdes para eliminar, retener o disminuir la toxicidad de los contaminantes del agua. Estos procesos reúnen un gran número de ventajas, especialmente la limpieza y la economía; no utilizan reactivos químicos peligrosos y se pueden aplicar tanto a contaminantes orgánicos como inorgánicos, presentes en sustratos líquidos y sólidos (Aldana, 2014).

➤ NIVELES PERMISIBLES DE LOS METALES EN AGUAS

La reglamentación colombiana especifica los criterios y los valores respectivos para evaluar las condiciones físicas, químicas y bacteriológicas de las aguas destinadas para consumo humano a través de la resolución 2115 del 2007, y establece como valor máximo admisible 0,05 mg/L para Cromo Total (no considera las concentraciones de Cr^{6+}), 0,3 mg/L para hierro y 0,2 mg/L para aluminio (MINPROTECSOCIAL, 2007). La resolución 1594 considerada para agua superficial maneja como valor de concentración permisible 0,05 mg/L para Cr, 0,1 mg/L para Fe, para el aluminio no presenta valores de concentración (MINAGRICULTURA, 1984). Por su lado la norma 0631 para agua residual tiene como máximo permisible una concentración de 0,5 mg/L para Cr; para Fe y Al no indica valores admisibles (MINAMBIENTE, 2015).

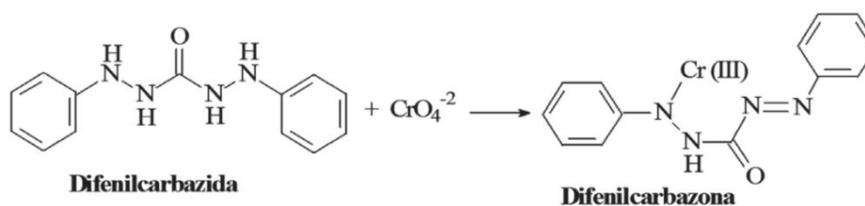
4.3 METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE Cr, Fe y Al

Los métodos de análisis para la determinación de cromo, hierro y aluminio son colorimétricos y se toman del libro Standar Methods del 2012.

4.3.1 Método para la determinación de cromo

Existen diversas técnicas analíticas utilizadas para la determinación de Cr (VI); entre ellas está el método colorimétrico, que aunque utiliza un equipo convencional se considera como un procedimiento sencillo y económico en comparación con otras técnicas como la espectrometría de absorción atómica o la cromatografía iónica. En el presente trabajo se llevó a cabo la verificación del método colorimétrico de la 1,5 difenilcarbazida para la determinación de Cr⁺⁶ en aguas al ser una de las metodologías analíticas más usadas por su alta selectividad (Severiche, y col., 2013).

En presencia de materia orgánica, el Cr⁺⁶ presente en aguas y suelos es reducido a Cr⁺³; sin embargo, las altas concentraciones de Cr⁺⁶ pueden sobrepasar esta capacidad de reducción, lo que impediría su adecuada eliminación. Dicho analito determinado por el método colorimétrico, se basa en la reacción del Cr⁺⁶ con 1,5-difenilcarbazida en medio ácido, lo que produce la formación de un compuesto desconocido de color rojo violeta. Éste puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm (Baker, y col., 2012). En primer lugar el Cr⁺⁶ oxida la difenilcarbazida a difenilcarbazona reduciéndose a su vez a Cr⁺³. Estos iones Cr⁺³ se combinan con la forma enol de la carbazona formando el complejo coloreado. Se ha reportado la aplicación y versatilidad de la 1,5-difenilcarbazida como agente acomplejante del ión metálico Cr⁺⁶, tal como se evidencia en la reacción 3 (Doria, y col., 2013).



Reacción 3

➤ Interferencias

En la medición de la absorción del complejo formado, puede interferir color y turbiedad del agua que se pueden disminuir con filtración o centrifugación previa (Severiche, y col., 2013). Las sales de molibdeno hexavalente y de mercurio reaccionan para formar el color con el reactivo pero sus intensidades son mucho más bajas que para el Cr en el pH especificado, y son toleradas concentraciones

hasta 200 mg/L. Solo las interferencias producidas por el Vanadio a concentraciones 10 veces más altas que las del Cr^{6+} resultarían en un error analítico significativo. El hierro en concentraciones superiores a 1 mg/L puede producir un color amarillo, pero el color del ión férrico (Fe^{3+}) no es fuerte por ende no hay dificultad, además si se lee a una longitud de onda adecuada (Baker, y col., 2012).

4.3.2 Método para la determinación de hierro

El proceso colorimétrico de fenantrolina descrito aquí; es adecuado para el análisis de aguas naturales o tratadas. Los reactivos complejantes utilizados son específicos para el Fe^{2+} , Sin embargo, debido a su inestabilidad, que se cambia fácilmente a Fe^{3+} en soluciones en contacto con el aire, la determinación del Fe^{2+} requiere precauciones especiales, y puede necesitar que se haga en campo en el momento del muestreo (Baker, y col., 2012).

El procedimiento para determinar Fe^{2+} usando 1,10-fenantrolina tiene una aplicabilidad algo limitada, por eso se debe evitar el largo tiempo de almacenamiento o exposición de las muestras a la luz. El método se basa en la reacción de la fenantrolina con el ion Fe^{2+} para formar un complejo de color naranja rojizo que presenta su absorbancia máxima de luz a una longitud de onda de 510 nm. La absorbancia de la solución colorida es proporcional a la concentración de Fe y la intensidad del color es independiente del pH en el rango de 3 a 9. Un pH entre 2.9 y 3.5 asegura un rápido desarrollo de color en presencia de un exceso de fenantrolina. La estructura (figura 1) de la o-fenantrolina tiene dos pares de electrones desapareados que se pueden usar en formar enlaces covalentes coordinados. Tres moléculas de fenantrolina quelatan cada átomo de hierro ferroso para formar dicho complejo (reacción 4) (Sanchez, 2011).

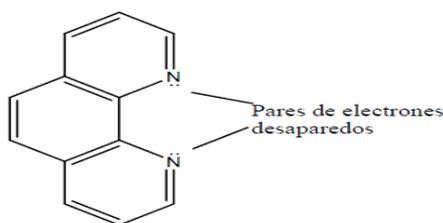
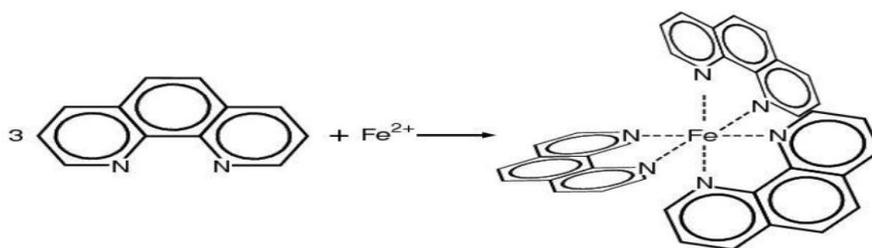


Figura 1: Fenantrolina



Reacción 4

Como el reactivo de fenantrolina es específico para medir Fe^{2+} se tiene que reducir todo el hierro Fe^{3+} a Fe^{2+} lo que se logra utilizando hidroxilamina como agente reductor (reacción 5). Es necesario adicionar una solución amortiguadora de acetato para asegurar el pH especificado (Laboratorio de Química Inorgánica, s. f.).



Reacción 5

➤ Interferencias

Interfieren los agentes oxidantes fuertes: Cianuros, Nitritos, Fosfatos, Cromo, Zinc. El Bismuto, Cadmio, Mercurio, Molibdato y Plata precipitan la fenantrolina. El calentamiento inicial con ácido convierte los polifosfatos a ortofosfatos y remueve el cianuro y el nitrito que de alguna manera podrían interferir. La adición de la hidroxilamina elimina errores causados por las excesivas concentraciones de agentes oxidantes fuertes. En presencia de iones de metales interferentes se debe añadir un exceso de fenantrolina (Laboratorio de Química Inorgánica, s. f.).

4.3.3 Método para la determinación de aluminio

Su ocurrencia en aguas es controlada por el pH: Al^{3+} predomina a $\text{pH} < 4$ mientras que en medio básico, la forma predominante es $\text{Al}(\text{OH})_3$. El método espectrofotométrico con eriocromo de cianina R (ECR) (figura 2) es muy utilizado ya que es uno de los más simples en cuanto a procedimiento e instrumentación (Colpas, y col., 2014).

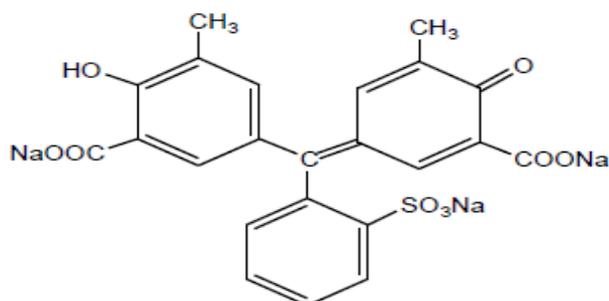


Figura 2: Estructura Química de eriocromo de cianina R

Las soluciones diluidas de Al tamponadas a pH 6 producen con ECR, un complejo de color rojo a rosado que presenta un máximo de absorción a 535 nm. La intensidad del color depende de la concentración de Al, el pH, el tiempo de reacción, la temperatura y la concentración de otros iones en la muestra (Baker, y col., 2012). Cuando el colorante se encuentra a pH 2,5 aproximadamente, es capaz de formar un complejo con Al, el cual es estable a pH cercano a 7 y para esto, se estabiliza con una solución reguladora de acetato de amonio, dando una laca de color rojo-violeta, que se utiliza para la detección del metal y presenta un máximo de absorbancia a 535 nm (Gonzales, y col., 1991).

La reacción (6) para la formación del complejo es:



La formación del complejo Al-CER, se da al reaccionar una molécula de aluminio con dos moléculas de eriocromo de cianina R. La intensidad del complejo coloreado depende de la concentración de aluminio presente en la muestra de agua.

➤ Interferencias

Para compensar color y turbidez en las muestras de agua, el Al es acomplejado con EDTA. En el momento de medir la absorción del complejo formado, pueden interferir color y turbiedad, esta última puede disminuirse con filtración. Para muestras con color, es necesario analizar un blanco de muestra y restarlo a cada lectura (Colpas, y col., 2014).

Fluoruros, polifosfatos y sulfatos pueden interferir negativamente cuando se hallan a niveles no habituales en muestras de agua; no obstante, los fluoruros no se encuentran en estas aguas a niveles tales que puedan interferir en la determinación del Al, además, cuando la concentración de fluoruro es constante, el porcentaje de error disminuye con cantidades crecientes de aluminio. Los ortofosfatos en concentraciones menores de 10 mg/L no interfieren; este es el caso ya que en las aguas analizadas la cantidad de ortofosfatos presente se encuentra por debajo de 5 mg/L. La interferencia causada por pequeñas cantidades de alcalinidad se elimina por acidificación de la muestra más allá del punto de neutralización del naranja de metilo. El sulfato no interfiere hasta una concentración de 2000 mg/L (Baker, y col., 2012). Las interferencias de hierro (III) y manganeso, dos elementos comúnmente encontrados en el agua, se eliminan por la adición de ácido ascórbico, en donde se da la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} debido a la presencia de este agente reductor, ver reacción 7.



Reacción 7

4.4 PROCESO DE ESTANDARIZACIÓN (Miller, y col., 2002).

La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso que permite ajustar el procedimiento a determinadas normas y formas. En el caso específico de los laboratorios de servicios analíticos, se aplica al desarrollo sistemático del método analítico con respecto, a su aplicación, especificaciones, materiales, equipos, patrones y con normas aprobadas internacionalmente, para determinar el grado de confianza de los resultados de acuerdo con las condiciones particulares del laboratorio. El procedimiento incluye las siguientes etapas: montaje (procedimiento de análisis, verificación de todo el material de trabajo), validación, cálculo de atributos (figuras analíticas de mérito) y cartas de control (procedimiento interno para verificar que el método cumple con los requisitos establecidos) (Villamizar, 2008).

4.5 ACREDITACIÓN

El intercambio comercial de bienes dentro de una economía global, demanda cada día más los servicios de laboratorios de ensayo que aseguren la calidad y confiabilidad de sus resultados y cuenten con reconocimiento internacional. Dentro de este marco la acreditación de métodos analíticos de ensayo constituye una herramienta indispensable ya que da la seguridad y avala que los laboratorios de calibración y ensayo, ejecutan las regulaciones, normas o estándares correspondientes (ONAC, 2007).

El IDEAM establece los requisitos y el procedimiento de acreditación de organismos de evaluación de la conformidad de matrices ambientales bajo la norma NTC-ISO/IEC 17025 (IDEAM, 2015). Se trata de una norma de calidad que introduce una serie de requisitos técnicos imprescindibles para lograr la acreditación de los laboratorios de ensayo y calibración y es aplicada por estos con el objetivo de demostrar que son técnicamente competentes, que sus resultados son veraces, que operan un sistema de calidad efectivo y son capaces de generar resultados técnicamente válidos (Instituto Colombiano, 2005).

4.5.1 Validación

Es el proceso experimental por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método son idóneas y cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas identificando si se cuenta con un sistema robusto que permita la continuidad en la prestación de

sus servicios de una manera confiable, y así tener una idea de las capacidades de desempeño y de las limitaciones del método que pueden ser experimentadas durante el uso rutinario, mientras el método esté bajo control (Instituto de Salud, 2010).

Para este caso se menciona verificación y no validación, pues se trabaja con métodos ya normalizados.

4.5.2 Pruebas de desempeño

Una de las exigencias de la norma NTC ISO/IEC 17025:2006 son las pruebas de desempeño, que consisten, en la realización de un “Conjunto de actividades analíticas llevadas a cabo a través de comparaciones entre laboratorios sobre un número determinado de muestras certificadas, por medio de las cuales se demuestra la idoneidad de los ensayos del laboratorio”, cuyos resultados son evaluados y calificados por el instituto para dar seguimiento a la trazabilidad a nivel nacional e internacional (MINAMBIENTE, 2002).

4.6 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

La determinación de las figuras analíticas de mérito como límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad y porcentaje de recuperación; servirán como criterio de confianza del método analítico.

4.6.1 Límite de detección (LOD)

El límite de detección (LOD) se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada pero no cuantificada, medida con una exactitud y una precisión aceptables (IDEAM, 2006). El LOD se calcula con las ecuaciones 1 y 2:

$$LOD = 3,29 * S \quad \text{Ecuación 1}$$

$$LOD = \frac{3S}{m_{promedio}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde, S : desviación estándar y $m_{promedio}$: promedio de las pendientes de las curvas de calibración realizadas.

4.6.2 Límite de cuantificación (LOQ)

Es la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas (Chica, y col. 2007). El LOQ se toma como 10 veces la desviación estándar, ver ecuaciones 3 y 4.

$$LOQ = 10 S \quad \text{Ecuación 3}$$

$$LOQ = \frac{10 S}{m_{promedio}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde, S : desviación estándar y $m_{promedio}$: promedio de las pendientes de las curvas de calibración realizadas.

Tanto el límite de detección como el de cuantificación se pueden hallar de diferentes formas:

1) Realizando la lectura como mínimo de cinco blancos para estimar la desviación estándar, y a partir de esta aplicar la ecuación 1 y 3 para hallar LOD y LOQ respectivamente.

2) Realizando como mínimo tres curvas de calibración, para ello el LOD y el LOQ se estiman a partir de la regresión lineal y se aplican las ecuaciones 2 y 4.

3) El límite de cuantificación se puede evaluar también de forma experimental. Se preparan soluciones de concentraciones cercanas al punto inferior de la curva de calibración. Dichas soluciones se analizan mínimo 3 veces. El límite de cuantificación es el valor en el cual el coeficiente de variación no excede el aceptado por el laboratorio para la metodología de análisis (MinSalud, 2014).

4.6.3 Precisión

La precisión es una medida de la reproducibilidad de un resultado. Si se mide una cantidad varias veces exactamente de la misma manera y los valores obtenidos se aproximan mucho entre sí, se dice que la medida es precisa. Si los valores varían mucho entre sí, se dice que la medida no es precisa. Indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones prefijadas (IDEAM, 2006).

Usualmente se expresa en términos de:

La desviación estándar (ecuación 5)

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X)^2}{n-1}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde, X_i : variable, X : media o promedio, n : número de variables y $n-1$: grados de libertad

Otra forma de expresar la precisión es mediante la desviación estándar relativa (DSR), ecuación 6

$$DSR = \frac{S}{\bar{X}}$$

Ecuación 6

O coeficiente de variación (CV), que se calcula con la ecuación 7

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Ecuación 7

La precisión se mide en términos de:

- **Repetibilidad:** Es una medida de la precisión de datos obtenidos por un solo operador trabajando siempre en las mismas condiciones (equipos, materiales y reactivos), durante una misma sesión de trabajo en un periodo corto.
- **precisión intermedia:** Es una medida de la precisión de los datos obtenidos en condiciones diferentes con el mismo método, el mismo analista y los mismos equipos en un intervalo largo de tiempo, ósea en días diferentes.

4.6.4 Exactitud

La exactitud de un método analítico, es el grado de concordancia de los resultados generados por el método, con el valor verdadero o valor de referencia aceptado, normalmente se expresa en términos de error. El valor verdadero para un cálculo de la exactitud, puede expresarse de tres maneras (Rada, y col., 2000):

1. Comparando los resultados de los métodos, con los de un método de referencia establecido (se supone que no hay errores sistemáticos en el método de referencia).
2. Añadiendo a la matriz de la muestra de interés, una concentración conocida del patrón.
3. Usando muestras de referencia o certificadas.

La exactitud expresada como el porcentaje de error, se calcula mediante la ecuación 8:

$$\% \text{ Error} = \frac{X_{\text{exp}} - X_{\text{real}}}{X_{\text{real}}} * 100$$

Ecuación 8

La exactitud también es expresada como el porcentaje de recuperación, ver ecuación 9.

$$\%R = \frac{\text{concentración real}}{\text{Concentración esperada}} * 100$$

Ecuación 9

Los límites aceptables de exactitud deben estar determinados por los requerimientos de los resultados y su aceptabilidad se da estadísticamente con la prueba t de Student, con un límite de confianza que normalmente es del 95% y n-1 grados de libertad, ver ecuación 10.

$$t_{cal} = \frac{|X - X_i|}{s\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde, t_{cal} : valor calculado de t para n-1 grados de libertad, n: número de determinaciones realizadas y s = desviación estándar de las n determinaciones.

Donde, $t_{cal} < t_{tab}$, si es así se acepta que el método es exacto bajo las condiciones de experimentación establecidas. Si dicho valor es mayor se rechaza, se evalúa y se corrige.

4.6.5 Linealidad

Se refiere a la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento. La linealidad es la capacidad del método para proporcionar datos que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un intervalo de trabajo, y se debe establecer a partir de al menos cinco niveles de concentración (IDEAM, 2006).

El principio de la linealidad se basa en la ecuación de la recta, ecuación 11

$$Y = mx + b \quad \text{Ecuación 11}$$

Rango lineal: rango de concentraciones de analito para las cuales el método brinda resultados proporcionales a la concentración.

4.6.6 Sensibilidad

Es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración. Normalmente se mide como la pendiente de la curva de calibración. Como valor se puede reportar el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar (IDEAM, 2006).

4.6.7 Recuperación (%R)

Es la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente una especie química que ha sido adicionada a una muestra. Se expresa como Porcentaje (IDEAM, 2006). Se calcula con la ecuación 12:

$$\%R = \frac{CF - CU}{CA} * 100 \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde, CF: concentración del analito en la muestra enriquecida, CU: concentración del analito en la muestra sin adicionar y CA: concentración del analito adicionado a la muestra enriquecida.

Se puede igualmente expresar en porcentaje de recuperación (ecuación 13)

$$\%R = R * 100 \quad \text{Ecuación 13}$$

4.6.8 Incertidumbre

Es un parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos a un mensurando (Williams, y col., 2000), (Bievre, y col., 2005), (Centro Español de Metrología, 2008).

a. Incertidumbre tipo A: Es un tipo de incertidumbre que es evaluada a partir de distribuciones estadísticas de una serie de observaciones (n). Se expresa en términos de la desviación estándar (ecuación 14), por ejemplo, realizar varias mediciones en condiciones de repetibilidad (Centro Español de Metrología, 2008).

$$\mu_i = \frac{S_i}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 14}$$

b. Incertidumbre tipo B: Es aquella que se obtiene mediante el uso de información externa u obtenida por experiencia. Estas fuentes de información pueden ser: certificados de calibración, manuales del instrumento de medición, especificaciones del instrumento, normas o literatura, valores de mediciones anteriores (Centro Español de Metrología, 2008). Algunos ejemplos de evaluación tipo B son:

Incertidumbre Estándar Combinada: Es la incertidumbre estándar del resultado de una medición, cuando el resultado se obtiene a partir de los valores de algunas otras magnitudes, es igual a la raíz cuadrada positiva de una suma de términos, siendo estos las varianzas o covarianzas de esas otras magnitudes ponderadas (Centro Español de Metrología, 2008)

Incertidumbre expandida: Magnitud que define un intervalo en torno al resultado de una medición, que puede esperarse para abarcar una fracción grande de la distribución de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando. La incertidumbre expandida se calcula multiplicando por un factor de cobertura (K= 2) la incertidumbre combinada. Con lo cual se obtiene un nivel de confianza de 95,0% aproximadamente.

Factor de cobertura (K): Factor numérico utilizado como multiplicador de la incertidumbre estándar combinada para obtener una incertidumbre expandida. Para un nivel de confianza aproximado al 95%, K es igual a 2.

4.6.9 Cálculo de la incertidumbre teniendo en cuenta las fuentes globales de incertidumbre

Esta es la metodología que se sigue para el cálculo de la incertidumbre. Para dicho cálculo se tienen en cuenta los resultados de evaluaciones de repetibilidad, reproducibilidad y exactitud: Inicialmente se calcula el promedio de los resultados obtenidos, tanto a concentraciones bajas y altas de analito, con la ecuación 15.

$$X_{prom} = \frac{\sum X_i}{n} \quad \text{Ecuación 15}$$

Ahora se calcula la desviación estándar de los datos, a partir de la ecuación 16.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{prom})^2}{(n-1)}} \quad \text{Ecuación 16}$$

Luego se procede a calcular la desviación estándar relativa de cada grupo de datos, de acuerdo a la ecuación 17.

$$RSD = \frac{S}{X_{prom}} \quad \text{Ecuación 17}$$

Finalmente, se hace el cálculo de la desviación estándar relativa del total de datos, mediante la ecuación 18.

$$RSDt = \sqrt{\frac{\left(\left(\frac{S_1}{X_{p1}}\right)^2 * (n-1)\right) + \left(\left(\frac{S_2}{X_{p2}}\right)^2 * (n-1)\right)}{(n-1)_1 + (n-1)_2}} \quad \text{Ecuación 18}$$

18

Además, se calcula la recuperación de los patrones, a partir de la ecuación 9. Luego se determina el promedio R_p y la desviación estándar SR_p de los recuperados, con base a la ecuación 19 y 20 respectivamente.

$$\bar{R}_p = \frac{\sum \%R_i}{n} \quad \text{Ecuación 19}$$

$$SRp = \sqrt{\frac{\sum(R_i - R_{prom})^2}{(n-1)}} \quad \text{Ecuación 20}$$

Es necesario, calcular también la incertidumbre en la recuperación promedio, con la ecuación 21.

$$U_{SRp} = \frac{SRp}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 21}$$

Se evalúa si el factor de recobro 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. Es decir, para ver si hay diferencia estadísticamente significativa entre el valor obtenido de recuperación y 1. Se calcula el $|t_{exp}|$, utilizando la ecuación 22 y se compara con el t crítico $|t_{crit}|$.

$$t_{exp} = \frac{|R-1| * \sqrt{n}}{s} \quad \text{Ecuación 22}$$

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.

Luego, con la ecuación 23 y 24 se calcula la incertidumbre combinada total ($\mu_{c\ total}$) y la incertidumbre expandida del método ($\mu_{exp\ met}$) (\pm), respectivamente.

$$\mu_{c\ total} = \sqrt{\left(\left(\frac{\mu_{RP}}{R_p}\right)^2 + RSDt^2\right)} \quad \text{Ecuación 23}$$

$$\mu_{exp\ met} = 2 + \mu_{c\ total} \quad \text{Ecuación 24}$$

Finalmente, la incertidumbre expandida en la medición de una muestra se expresa mediante la ecuación 25.

$$\mu = \text{concentración medida} \pm (\text{concentración medida} * \mu_{exp\ met}) \quad \text{Ecuación 25}$$

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO SPSS

El programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) permite efectuar análisis estadísticos muy complejos y facilita su ilustración gráfica. Entre las pruebas más utilizadas aplicadas para el análisis de datos están:

4.7.1 Pruebas de normalidad

Sirven como punto de referencia para describir cómo se distribuyen muchos de los datos muestrales recogidos. Se utiliza la prueba de Shapiro-Wilk para un tamaño

de muestra ≤ 50 ; y para valores > 50 , se utiliza la de Kolmogorov-Smirnof. Ambas pruebas permiten contrastar la hipótesis nula, H_0 : los datos muestrales proceden de poblaciones normales, en comparación con la hipótesis alternativa, H_a : los datos no provienen de una distribución normal. Se rechaza la hipótesis de normalidad cuando el nivel crítico (Sig.) es 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 pasa lo contrario, se aplican pruebas no paramétricas (Miller, y col., 2002).

4.7.2 Pruebas paramétricas

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 (Miller, y col., 2002).

- **Análisis de varianza (ANOVA) de un factor:** Sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. La variable categórica (nominal u ordinal) que define los grupos a comparar se llama independiente o factor. A la variable cuantitativa (de intervalo o razón) en la que se comparan los grupos se llama dependiente.

La hipótesis que se pone a prueba en el ANOVA de un factor es que las medias poblacionales son iguales. 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. Para su evaluación se tienen en cuenta las hipótesis H_0 = los grupos proceden de poblaciones con medias iguales y H_a = al menos uno de los grupos tiene una medida distinta del resto de los grupos.

- **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. Todos los test de comparaciones múltiples son test que tratan de especificar, una Hipótesis alternativa genérica como la de cualquiera de los Test ANOVA.

- **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. La realización de esta prueba permite contrastar dos muestras independientes o relacionadas según sea el caso.
- **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, las varianzas poblacionales son iguales; de lo contrario, se rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas y se supone que son distintas.
- **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.

4.7.3 Pruebas no paramétricas

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 en el caso de los métodos paramétricos.

Prueba de Kruskal Wallis: Es un método no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población. Para determinar las diferencias significativas se aplica la prueba U de Mann-Whitney.

- **Prueba U de 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 (Rho):** Es una prueba no paramétrica 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.

4.7.4 Análisis de regresión lineal simple

Es una técnica estadística utilizada para estudiar la relación entre una variable dependiente (VD) y una variable independiente (VI) con el doble propósito de: 1) Averiguar en qué medida la VD puede estar explicada por la VI. 2) Obtener predicciones en la VD a partir de la VI. El procedimiento implica, obtener la ecuación mínimo-cuadrática que mejor expresa la relación entre la VD y la VI.

4.7.5 Q de Dixon

Es una prueba estadística que verifica datos atípicos (valor que no corresponde con el resto de valores en el grupo de datos), dentro de una población y así verificar si se rechaza o no. Los valores obtenidos se comparan con un valor crítico ya tabulado en tablas, y se declara valor atípico si supera el crítico.

5. METODOLOGÍA

En el presente estudio se realiza la estandarización de los métodos analíticos para la determinación de: hierro en agua potable y cromo y aluminio en agua residual, superficial y potable.

5.1 PRE-VALIDACIÓN

- Se seleccionó el método para la determinación de Cr, Fe y Al en la matriz agua, teniendo en cuenta las condiciones del laboratorio (materiales, reactivos, equipos). También Se ejecutó un procedimiento que sirvió como guía para los análisis.
- Se determinaron los intervalos lineal y de trabajo de acuerdo con los criterios de aplicación, registrando el rango de concentraciones para realizar el estudio estadístico. Se optimizaron los parámetros instrumentales.
- Se creó un procedimiento para la preparación de patrones y soluciones necesarias para cada determinación espectrofotométrica, al igual, que para el lavado de material. Se diseñaron los formatos en donde quedaría consignado el registro de datos obtenidos en cada análisis.

5.2 CALIBRACIÓN DEL MATERIAL VOLUMÉTRICO Y DE LOS EQUIPOS

El material volumétrico se calibró de acuerdo al método de la reproducción de la definición de la magnitud; mediante pesada y utilización de la densidad. En este caso se va a medir una magnitud (volumen) a través de la medida de otra magnitud (masa) y de una relación entre las dos (densidad). (Jordi, *et al.*, s. f.). Para la calibración de los equipos como la balanza analítica, el espectrofotómetro, el pH-metro; se siguió el manual de instrucciones.

Es válido aclarar que la calibración del material volumétrico es realizada por otro analista, lo que se hizo fue verificar, mediante los respectivos certificados de calibración, que deben estar registrados y consignados en el laboratorio.

5.3 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

5.3.1 Equipos

Los equipos utilizados son: plancha de calentamiento y agitador magnético SCHOTT, multiparámetro Orion Star A329 medidor portátil de pH, , campana extractora ELECTRILAB, balanza analítica RADWAG, desionizador HIDROCHEM, desecador y espectrofotómetro Orion AguaMate-7000 (Thermo Scientific).

5.3.2 Materiales

Todo el material de vidrio está previamente calibrado. Balones aforados de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL, micropipetas transfer de 1 mL y 10 mL, erlenmeyer de 50 y 250 mL, beakers de 100, 250 y 600 mL, vidrio de reloj, espátula y probeta.

5.3.3 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico y se citan en el anexo 1, 2 y 3 para la determinación de cromo, hierro y aluminio respectivamente.

5.3.4 Conservación y manipulación de las muestras

La muestra de agua potable para la determinación de los metales es tomada del grifo del laboratorio. Antes de recogerla se dejó que corriera durante 2 minutos y se tomó en beakers de 1000 mL previamente lavados y purgados.

Las muestras de agua superficial y residual se toman en el río Guarapas ubicado en el sector de Tazajeras a las afueras de Pitalito, ambas son tomadas en el mismo río, pero la superficial se toma aguas arriba, es decir, antes de entrar al municipio, y la residual es tomada aguas abajo de los dos vertimientos autorizados.

Previo al muestreo se lavaron los frascos ámbar con jabón neutro, agua del grifo y abundante agua desionizada, luego se sumergen por varias horas en las mismas soluciones que se utilizan para el lavado de material que se especifica en la metodología para cada uno de los parámetros (sección 5.4.1-Cr, 5.5.1-Fe y 5.6.1-Al); transcurrido este tiempo se lavaron nuevamente con agua desionizada y finalmente se purgaron repetidas veces con muestra. Los envases deben estar previamente rotulados. Los equipos necesarios como el pH-metro se deben calibrar en campo, en el primer sitio de muestreo del día.

El Standard Methods para metales permite dos tipos de muestreo, simple y compuesto, sin embargo, como la corriente tenía un ancho de aproximadamente 3 metros se efectuó un muestreo simple, es decir en un solo punto de la corriente, para tal fin, se sumergió el muestreador o balde, se purgó con muestra (se enjuaga y se desecha la primera toma), y luego se procedió a la toma de la muestra.

Finalmente se transvasa la muestra, del balde a las botellas determinadas para cada parámetro, en forma cuidadosa, tratando de no airear el agua (el agua se desliza por las paredes del balde para evitar oxigenarla). Durante el llenado, se debe agitar la muestra, para garantizar la homogeneidad, y se deben llenar hasta el cuello tapándolas firmemente (IDEAM, 2010).

Para Cr la muestra se pasó a través de un filtro de membrana de 0.45 μm . Se ajustó el pH entre 9,3 y 9,7 con solución tampón (sulfato de amonio) más 600 μL de NaOH 5N por 100 mL de muestra. Se llevó a este rango de pH dentro de las primeras 24 h. Se refrigeró a $< 6^\circ \text{C}$. Es recomendable almacenar las muestras para análisis de cromo solo por 28 días. Si el pH no está dentro del rango adecuado, analizar la muestra lo más pronto posible.

Para hierro y aluminio, la muestra se preservó con HNO_3 hasta alcanzar un $\text{pH} \leq 2$, y se refrigeró a menos de 6°C . Las muestras se pueden almacenar por lo menos durante seis meses.

5.3.5 Diseño experimental para cada una de las determinaciones

El diseño experimental llevado a cabo para la determinación de Cr, Fe y Al se encuentra en los anexos 4, 5 y 6, aquí se ilustra la forma como se lleva a cabo el análisis de cada uno de los parámetros indicando el material de referencia utilizado y las figuras de mérito analíticas tenidas en cuenta en el momento de la evaluación.

5.4 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE CROMO

5.4.1 Lavado del material

Se lavaron todos los elementos reutilizables (vidrio, plástico, etc.), incluidos los recipientes de muestra, con jabón neutro y se enjuagaron con agua desionizada. Luego se colocaron durante 4 h en una solución 1:2:9 de ácido nítrico (HNO_3), ácido clorhídrico (HCl) y agua desionizada. Finalmente se lavaron con bastante agua desionizada. NOTA: nunca utilizar ácido crómico como solución de limpieza.

5.4.2 Longitud de onda

La literatura reportada para la longitud de onda de cromo es de 540 nm, por lo tanto se realizaron diferentes medidas comprendidas entre 500 y 600 nm, obteniéndose que efectivamente tiene un máximo en 540nm.

5.4.3 Preparación de la curva de calibración

Se corrieron seis curvas en días diferentes para obtener una curva global del método a partir de su promedio, utilizando concentraciones de 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,35, 0,45 y 0,7 mg Cr/L. Se prepararon los patrones de 100 mL a partir de la solución estándar de cromo de 5,00 mg/L, midiendo volúmenes desde 0,2 a 14 mL. En la tabla 1 se muestra la curva de calibración en la que se grafica la absorbancia frente a la concentración. Se adicionó por lo menos 10 mL de agua desionizada a los balones antes de adicionar el patrón.

Este rango lineal es tomado hasta 0,70 mg/L; debido a que por encima de este valor se pierde la línea de tendencia de la curva.

Tabla 1 : Curva de calibración para cromo

Patrón	mL de solución patrón de Cr de 5,00 mg/L	Concentración (mg/L) de Cr
Blanco	0,00	0,00
P1	0,20	0,01
P2	1,00	0,05
P3	2,00	0,10
P4	5,00	0,25
P5	7,00	0,35
P6	9,00	0,45
P7	14,0	0,70

Se adicionó a cada estándar 1 mL de solución buffer + 0,6 mL de NaOH 5N, para ajustar el pH entre 9,3 y 9,7. Se añadió 0,25 mL de H₃PO₄ y se ajustó la solución a pH 2±0,5 con H₂SO₄ 0,2N. La solución se transfirió a un balón aforado de 100 mL y se aforó, luego se adicionó 2,0 mL de la solución de difenilcarbazida. Reposar durante 10 minutos para el desarrollo del color. Al completar los 10 minutos, se transfirió la solución a la celda de vidrio y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. **Nota:** después de la adición de cada reactivo se agitó.

- Se construyó una curva de calibración graficando absorbancia versus la concentración de cromo.

5.4.4 Determinación de cromo en muestras de agua (ver anexo 7)

En este método no se hace evaluación de interferentes, simplemente se sigue el procedimiento de acuerdo a la norma.

Se tomaron 90 mL de muestra previamente filtrada y ajustada en un rango de pH de 9,3 a 9,7 (la muestra de agua potable no se filtra). Se adicionó 0,25 mL de H₃PO₄. Se ajustó la solución a pH 2±0,5 con H₂SO₄ 0,2N y se transfirió a un balón aforado de 100 mL, se aforó con la misma muestra hasta 100 mL. Se adicionaron 2,0 mL de la solución de difenilcarbazida. Se esperó durante 10 minutos para el desarrollo del color, transcurridos estos, se transfirió la muestra a la celda de vidrio

y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. **Nota:** después de la adición de cada reactivo se agitó.

➤ Para el cálculo de la concentración de Cr^{6+} , se tuvo en cuenta la ecuación 26:

$$mg Cr^{6+}/L = C \times \frac{V_f}{V_m} \quad \text{Ecuación 26}$$

Donde, C: concentración de la muestra hallada por interpolación de la recta, V_f : volumen final al que se llevó la muestra (100 mL), V_m : volumen de muestra empleado, para este caso serían 100 mL.

5.5 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO

5.5.1 Lavado de material

Se lavó todo el material de vidrio incluido los recipientes de muestreo, con jabón neutro y agua desionizada. Posteriormente se sumergieron en una solución de HCl 1:1 durante 3 horas, finalmente enjuagaron con bastante agua desionizada.

5.5.2 Longitud de onda

La literatura reportada para la longitud de onda de hierro es de 510 nm, por lo tanto se realizaron diferentes medidas comprendidas entre 450 y 550 nm, obteniéndose que efectivamente tiene un máximo en 510 nm.

5.5.3 Preparación de la curva de calibración

Se corrieron seis curvas para obtener una curva global del método a partir de su promedio, preparando diferentes estándares de 100 mL a partir de la solución patrón de 10 mg/L, en los que se adicionó volúmenes comprendidos entre 0,5-6 mL en un rango de concentración de 0,05 a 0,6 mgFe/L, de la forma como se muestra en la tabla 2. Se adicionaron por lo menos 10 mL de agua desionizada previo a la solución patrón.

El rango lineal de la curva de calibración es llevado hasta 0,60 mg/L, porque por encima de este valor ya no se conserva la línea de tendencia.

Tabla 2: Curva de calibración para hierro

Patrón	mL de solución patrón de Fe de 10,0 mg/L	Concentración (mg/L) de Fe
Blanco	0,00	0,00
P1	0,50	0,05
P2	1,00	0,10
P3	2,00	0,20
P4	3,00	0,30
P5	4,00	0,40
P6	5,00	0,50
P7	6,00	0,60

- A cada patrón se adicionó 2 mL de HCl conc. + 1 mL de la solución de hidroxilamina. Se agregó 10 mL de la solución buffer + 4 mL de la solución de fenantrolina, luego se aforó con agua desionizada a 100 mL y se reposó 10 minutos, transcurrido este tiempo se hizo la lectura en el espectrofotómetro a 510 nm. La curva de calibración se realizó graficando la concentración de hierro frente a la absorbancia obtenida.

5.5.4 Determinación de Fe en muestras de agua (ver anexo 8)

- Se adicionaron 50 mL de muestra en un Erlenmeyer de 125 mL + 2 mL de HCl conc. y 1 mL de la solución de hidroxilamina. Se calentó a ebullición hasta que el volumen se redujo de 15 a 20 mL. Se llevó a temperatura ambiente y se transfirió a un balón aforado de 100 mL. Se adicionó 10 mL de solución tampón y 4 mL de fenantrolina, se aforó con agua desionizada y se dejó durante 10 minutos.
- Finalmente se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm y con el blanco se estableció el equipo a cero de absorbancia.
- Se calculó la concentración de Fe presente en la muestra, con la ecuación 27.

$$mg\ Fe/L = C \times \frac{V_f}{V_m}$$

Ecuación 27

Donde, C: concentración de Fe hallada por la ecuación de la recta, V_f : volumen al que finalmente se aforó (100 mL), V_m : volumen de muestra empleado (50 mL).

5.6 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE ALUMINIO

5.6.1 Lavado de material

Se lavó todo el material de vidrio necesario para el análisis, incluido los recipientes de muestreo, con jabón neutro y abundante agua desionizada. Luego fueron sumergidos por seis horas en una solución 1:1 de HCl caliente. Transcurrido este periodo de tiempo se lavaron nuevamente con bastante agua desionizada. Los frascos utilizados para el muestreo también se deben lavar con HNO_3 .

5.6.2 Longitud de onda

Para la determinación colorimétrica de aluminio se reporta una longitud de onda de 535 nm, por lo tanto, se hicieron diferentes ensayos entre 500 y 600 nm, comprobando efectivamente que es en 535 nm en donde tiene su máximo.

5.6.3 Preparación de la curva de calibración

Se corrieron seis curvas en condiciones diferentes para obtener una curva global del método a partir de su promedio, utilizando concentraciones de 0,02, 0,06, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 y 0,30 mg Al/L. Se prepararon patrones de 50 mL a partir de la solución estándar de 5,00 mg/L, de la que se miden volúmenes desde 0,20 hasta 3 mL. Ver tabla 3. Los balones deberán tener por lo menos 25 mL de agua desionizada antes de adicionar la solución patrón.

El rango lineal tomado para la determinación de aluminio se toma hasta un valor de concentración de 0,30 mg/L, puesto que por encima de este valor la línea de tendencia de la curva de calibración se pierde.

Tabla 3: Curva de calibración para aluminio (III)

Patrón	mL de solución patrón de Al de 5,00 mg/L	Concentración (mg/L) de Al
Blanco	0,00	0,00
P1	0,20	0,02
P2	0,60	0,06
P3	1,00	0,10
P4	1,50	0,15
P5	2,00	0,20
P6	2,50	0,25
P7	3,00	0,30

- Se añadió a cada solución preparada anteriormente 1 mL de H_2SO_4 0,02N + 1 mL de ácido ascórbico. Luego se agregó 10 mL de solución tampón + 5 mL de la solución de trabajo coloreada. Inmediatamente, se aforó hasta 50 mL con agua desionizada y se esperó durante 10 minutos. Se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 535 nm, ajustando el equipo a cero de absorbancia con el blanco de reactivo.
- Se elaboró la curva de calibración graficando la absorbancia obtenida frente a la concentración de Al.

5.6.4 Determinación de Al en muestras de agua (ver anexo 9)

- Eliminación de interferencias de fosfato (solo para muestras de agua residual): a 100 mL de muestra se añadió 1,7 mL de H_2SO_4 6N. Se calentó durante 90 minutos, manteniendo la temperatura de la solución justo por debajo del punto de ebullición. Al finalizar el periodo de calentamiento el volumen de la solución estuvo aproximadamente en 25 mL. Se enfrió y se neutralizó a pH 4,3-4,5 con NaOH 1N. se transfirió a un balón aforado de 100 mL y se llevó hasta la marca con agua desionizada. Se tomó una porción de 25 mL para la determinación de Al como sigue a continuación.
- Se tomaron 25 mL de agua libre de fosfatos a temperatura ambiente y se adicionó 1 gota de indicador naranja de metilo. Se tituló con H_2SO_4 0,02N hasta un color rosa pálido, se registró el volumen consumido y se desechó. Se tomaron 2 muestras similares de 25 mL cada una en balones aforados de 50 mL, se añadió la misma cantidad de H_2SO_4 0,02N utilizado en la titulación más

1 mL en exceso. A una de las dos muestras se adicionó 1 mL de solución de EDTA; este sería el blanco que servirá para ajustar el instrumento a cero de absorbancia. A ambas muestras se agregó 1 mL de ácido ascórbico, 10 mL de s/n buffer y 5 mL de la s/n de trabajo coloreada, se aforó con agua desionizada. Se esperó durante 10 min. Transcurrido este tiempo se leyó en el espectrofotómetro a 535 nm.

- La concentración de Al en las muestras se calculó haciendo uso de la ecuación 28.

Nota: el blanco con EDTA solo será para muestras de agua que presenten turbiedad. Homogenizar después de la adición de cada reactivo.

$$mg\ Al^{3+}/L = C \times \frac{V_f}{V_m} \qquad \text{Ecuación 28}$$

Donde, C: es la concentración de aluminio encontrada por la ecuación de la recta, V_f: volumen final al que se aforó la muestra (50 mL), V_m: volumen de muestra empleado (25 mL).

5.7 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

La preparación de las diferentes soluciones y estándares para cada metodología analítica se presentan en los anexos 1, 2 y 3 para cromo, hierro y aluminio, respectivamente. Para cada ensayo se debe correr un grupo básico de muestras (ver tabla 4), en un mismo día.

- Un blanco (Bk), que consiste en una muestra de agua desionizada.
- Solución estándar de rango bajo (PRB): Esta concentración fue elegida tomando como punto de referencia el producto de 2 veces el límite de cuantificación. Solución estándar de rango medio (PRM): Esta concentración fue elegida tomando como punto de referencia el 50% del valor máximo del rango de linealidad. Solución estándar de rango alto (PRA): Esta concentración fue elegida tomando como punto de referencia el 90% del valor máximo del rango de trabajo.
- Una muestra natural para ver efectos de la matriz real (MR) de tipo residual. Una muestra natural para ver efectos de la matriz real (MS) de tipo superficial. Una muestra natural para ver efectos de la matriz real (MP) de tipo potable.

- Una muestra natural de tipo residual enriquecida con la concentración de rango bajo (MRRB). Una muestra natural de tipo superficial enriquecida con la concentración de rango bajo (MSRB). Una muestra natural de tipo potable enriquecida con la concentración de rango bajo (MPRB).
- Una muestra natural de tipo residual enriquecida con la concentración de rango alto (MRRA). Una muestra natural de tipo superficial enriquecida con la concentración de rango alto (MSRA). Una muestra natural de tipo potable enriquecida con la concentración de rango alto (MPRA).

Tabla 4: Grupo básico de muestras para cada ensayo

MUESTRA	CÓDIGO	CONCENTRACIÓN mg/L		
		Cr	Fe	Al
Blanco	B	0,00	0,00	0,00
Estándar Rango Bajo	PRB	0,02	0,20	0,10
Estándar Rango Medio	PRM	0,35	0,50	0,30
Estándar rango Alto	PRA	0,63	0,90	0,54
Muestra de agua	MP-MR-MS	-	-	-
Muestra de agua + Estándar Rango Bajo	M + PRB	M+0,02	M+0,20	M+0,10
Muestra de agua + Estándar Rango Alto	M + PRA	M+0,63	M+0,90	M+0,54

5.8 MEDIDAS ANALÍTICAS PARA LA VALIDACIÓN DE Cr, Fe Y Al

5.8.1 Estandarización del sistema instrumental

Para cada metodología aplicada se definieron los parámetros analíticos que se tendrán en cuenta para evaluar la eficiencia del método: precisión, linealidad, exactitud, límites, sensibilidad. Se corrieron seis curvas de calibración en el espectrofotómetro del laboratorio con 7 niveles de concentración cada una, comprendidos entre 0,01-0,70 mg/L para Cr; 0,05-0,6 mg/L para Fe y 0,02-0,30 mg/L para Al. Finalmente, se aplicó un tratamiento estadístico mediante el software SPSS.

5.8.2 Linealidad instrumental

Se evaluaron los 7 niveles de concentración para cada método, durante 6 días diferentes, preparando una curva de calibración por día.

5.8.3 Precisión instrumental

Se evaluó bajo condiciones de repetibilidad corriendo cinco curvas de calibración el mismo día; y bajo condiciones de reproducibilidad o precisión intermedia, preparando 5 curvas de calibración en días diferentes (una por día).

5.8.4 Límites críticos

Para el cálculo de los límites críticos se corrieron 10 blancos, y a partir de ellos se procede a calcular los límites de detección y cuantificación mediante el uso de las ecuaciones 1 y 3, respectivamente.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Dentro del proceso de validación y verificación de las metodologías analíticas para la determinación de cromo, hierro y aluminio, se establecieron los siguientes parámetros: desviación estándar, coeficiente de variación y límites de detección y cuantificación para determinar la tendencia y el comportamiento en el tiempo de dichos parámetros. Una vez establecidas las condiciones necesarias para llevar a cabo la implementación de los métodos, se estipularon las pruebas necesarias con su respectivo análisis estadístico, para evidenciar sus características de repetibilidad y precisión intermedia.

6.1 VALIDACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL

El sistema instrumental para la estandarización de las metodologías analíticas consistió en un espectrofotómetro Orion AguaMate-7000 Thermo Scientific.

Empleando las metodologías ya descritas se determinó el rango lineal (ver tabla 5) para cromo, hierro y aluminio mediante las curvas de calibración preparadas.

Tabla 5: Rango lineal para Cr, Fe y Al

MÉTODO	RANGO LINEAL (mg/L)
Cromo	0,010-0,700
Hierro	0,050-0,600
Aluminio	0,020-0,300

6.1.1 Linealidad instrumental

Para la linealidad instrumental, se evaluaron 7 niveles de concentración en 6 días diferentes. Para tal fin se preparó una curva de calibración por día, los datos recopilados se registran en la tabla 6.

Tabla 6: Resultados para evaluar la linealidad instrumental de Cr, Fe y Al

	Concentración	Absorbancias					
	(mg/L)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
CROMO ($\lambda = 540$ nm)	0,01	0,073	0,072	0,075	0,071	0,070	0,069
	0,05	0,205	0,209	0,208	0,211	0,207	0,209
	0,10	0,402	0,402	0,397	0,405	0,404	0,399
	0,25	1,006	1,012	1,009	1,006	1,007	1,005
	0,35	1,391	1,389	1,385	1,387	1,389	1,386
	0,45	1,777	1,775	1,774	1,772	1,774	1,771
	0,70	2,682	2,681	2,679	2,683	2,685	2,683
HIERRO ($\lambda = 510$ nm)	0,05	0,192	0,189	0,187	0,188	0,190	0,188
	0,10	0,236	0,234	0,231	0,230	0,236	0,232
	0,20	0,330	0,331	0,324	0,327	0,326	0,330
	0,30	0,417	0,415	0,419	0,415	0,414	0,416
	0,40	0,508	0,508	0,507	0,506	0,509	0,510
	0,50	0,606	0,604	0,604	0,603	0,608	0,602
	0,60	0,696	0,701	0,695	0,699	1,696	0,698
ALUMINIO ($\lambda = 535$ nm)	0,02	0,039	0,042	0,041	0,044	0,043	0,041
	0,06	0,138	0,135	0,136	0,141	0,138	0,135
	0,10	0,240	0,242	0,242	0,244	0,245	0,239
	0,15	0,363	0,363	0,362	0,364	0,365	0,362
	0,20	0,483	0,478	0,479	0,484	0,482	0,483
	0,25	0,607	0,606	0,604	0,606	0,602	0,605
	0,30	0,725	0,724	0,726	0,727	0,728	0,728

Al obtener todos los datos se realiza una prueba estadística Q de Dixon para encontrar si dentro de los valores hay datos atípicos. El valor crítico o tabulado para la Q de Dixon para un tamaño de muestra seis con un nivel de confianza del 95% es 0,625.

En la tabla 7 se puede verificar que todos los valores calculados son menores que el valor crítico 0,625, con lo que se garantiza que dentro de todas las absorbancias obtenidas en las curvas de calibración no hay datos anómalos que puedan ser rechazados o que puedan afectar el análisis.

Tabla 7: Valores calculados de la Q de Dixon para saber si hay datos atípicos

Cromo		Hierro		Aluminio	
Qmin	Qmax	Qmin	Qmax	Qmin	Qmax
0,167	0,333	0,200	0,400	0,400	0,200
0,200	0,200	0,167	0,333	0,167	0,500
0,250	0,125	0,285	0,142	0,167	0,167
0,143	0,429	0,200	0,400	0,333	0,333
0,167	0,333	0,250	0,250	0,167	0,167
0,167	0,333	0,167	0,333	0,400	0,200
0,333	0,333	0,167	0,333	0,250	0,250

Para verificar la normalidad de los datos y como el tamaño de muestra es menor a 50, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, en función del día (tabla 8) y del nivel de concentración (tabla 9) para verificar si se aplican pruebas paramétricas cuando $p > 0,05$ o no paramétricas cuando $p < 0,05$.

Tabla 8: Evaluación de la normalidad para Cr, Fe y Al en función del día

Día	gl	Cromo		Hierro		Aluminio	
		Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.
1	5	0,932	0,565	0,960	0,817	0,972	0,910
2	5	0,932	0,569	0,961	0,828	0,971	0,907
3	5	0,931	0,559	0,961	0,825	0,972	0,915
4	5	0,932	0,572	0,960	0,816	0,972	0,914
5	5	0,932	0,571	0,959	0,807	0,973	0,922
6	5	0,932	0,568	0,961	0,831	0,971	0,904

gl: Grados de libertad

Tabla 9: Evaluación de la normalidad para Cr, Fe y Al en función del nivel de concentración

Día	Gl	Cromo		Hierro		Aluminio	
		Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.
1	6	0,983	0,964	0,933	0,607	0,974	0,918
2	6	0,975	0,926	0,901	0,378	0,886	0,223
3	6	0,942	0,677	0,912	0,453	0,954	0,773
4	6	0,881	0,272	0,933	0,607	0,908	0,421
5	6	0,958	0,801	0,982	0,960	0,925	0,540
6	6	0,967	0,875	0,940	0,659	0,933	0,607
7	6	0,975	0,926	0,933	0,600	0,920	0,505

Teniendo en cuenta los resultados consignados en las tablas 8 y 9 se cumple con la H_0 , lo que indica que los datos provienen de una población con distribución normal, ya que el grado de significancia $p > 0,05$, por lo tanto se aplican pruebas paramétricas para su correspondiente análisis estadístico. De acuerdo a lo anterior se procede a aplicar una prueba de análisis de varianza ANOVA (tabla 10) a los diferentes valores reportados en la tabla 6, teniendo en cuenta el día y el nivel de concentración; y de esta manera ver si existen o no diferencias significativas entre ellos.

En la tabla 10, se puede contemplar el análisis de varianza que se realizó a los valores de absorbancia, en función del nivel de concentración, en donde, la F del análisis es significativa, con lo que se puede decir que, por lo menos, dos niveles del factor (concentración) producen distintos efectos en la dependiente (absorbancia). Como era de esperarse, el grado de significancia $p < 0,05$, por consiguiente los valores de absorbancia en cuanto al nivel de concentración se refiere, presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí, y se rechaza la hipótesis nula.

Tabla 10: ANOVA de un factor para evaluar la absorbancia en función del nivel de concentración para Cr, Fe, y Al

	Grupos	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Cromo	Inter-grupos	32,313	6	5,385	983429,146	0,000
	Intra-grupos	0,000	35	0,000		
	Total	32,313	41			
Hierro	Inter-grupos	1,292	6	0,215	46574,439	0,000
	Intra-grupos	0,000	35	0,000		
	Total	1,292	41			
Aluminio	Inter-grupos	2,238	6	0,373	97564,707	0,000
	Intra-grupos	0,000	35	0,000		
	Total	2,235	41			

Como se observa en la tabla 11, el grado de significancia para el análisis de varianza es $p > 0,05$, con lo que se confirma que los valores no presentan diferencias significativas, además el F crítico de Fisher-Snedecor ($F = 2,45$)

reportado en tablas es mayor que el calculado, con lo que se puede aceptar la H_0 (los grupos proceden de poblaciones con medias iguales), por lo tanto el factor (día) no influye en la variable dependiente (absorbancia), es decir, los distintos niveles del factor se comportan de igual forma en lo que la variable dependiente se refiere. Con todo esto, se concluye que la absorbancia de cada nivel de concentración no presenta varianza con respecto al tiempo, por lo tanto, las metodologías aplicadas para cada análisis son reproducibles.

Tabla 11: ANOVA de un factor para evaluar la absorbancia en función del día para Cr, Fe, y Al

	Grupos	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Cromo	Inter-grupos	0,000	5	0,000	0,000	1,000
	Intra-grupos	32,313	36	0,898		
	Total	32,313	41			
Hierro	Inter-grupos	0,001	5	0,000	0,006	1,000
	Intra-grupos	1,265	36	0,035		
	Total	1,266	41			
Aluminio	Inter-grupos	0,000	5	0,000	0,000	1,000
	Intra-grupos	2,235	36	0,062		
	Total	2,235	41			

Ahora se estudia entre que niveles se están dando dichas diferencias, y para esto se aplica una prueba de Tukey, para saber qué medida difiere de la otra.

El análisis que se hizo teniendo en cuenta la prueba de Tukey (ver tabla 12), muestra que cada absorbancia es significativamente diferente para cada nivel de concentración, en donde, un aumento en la absorbancia, produce un aumento en la concentración, por lo que es posible graficarlas una en contra de la otra.

La tendencia de todos los datos registrados en la tabla 6 se evaluó a través de un gráfico, en donde se presenta la relación existente entre los valores de absorbancia arrojados por el equipo y cada nivel de concentración tanto para cromo, hierro y aluminio.

En el anexo 10 se presentan las diferentes gráficas para cada uno de los parámetros, en donde se comprueba la tendencia lineal de los resultados,

aplicando el método de mínimos cuadrados, para poder obtener una ecuación lineal que demuestre dicha relación.

Tabla 12: Prueba de Tukey^a para evaluar la varianza entre las absorbancias y la concentración

		Subconjunto para alfa = 0,05							
	Concentración	N	1	2	3	4	5	6	7
CROMO	0,01	6	0,0717						
	0,05	6		0,2082					
	0,10	6			0,4015				
	0,25	6				1,0075			
	0,35	6					1,3878		
	0,45	6						1,7738	
	0,70	6							2,6822
	Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
HIERRO	0,05	6	0,1890						
	0,10	6		0,2332					
	0,20	6			0,3280				
	0,30	6				0,4160			
	0,40	6					0,5080		
	0,50	6						0,6045	
	0,60	6							0,6975
	Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
ALUMINIO	0,02	6	0,0417						
	0,06	6		0,1372					
	0,10	6			0,2420				
	0,15	6				0,3632			
	0,20	6					0,4815		
	0,25	6						0,6050	
	0,30	6							0,7263
	Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

a. Usa el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000

Una vez obtenidas las curvas de calibración se procede a evaluar para cada una de ellas la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación con sus respectivas desviaciones estándar (ver tabla 13).

Tabla 13: Evaluación de la linealidad instrumental para cromo, hierro y aluminio

Parámetro	Símbolo	Cromo	Hierro	Aluminio
Intercepto	b	0,034	0,141	-0,015
Pendiente	m	3,820	0,924	2,348
Coeficiente de correlación	r	1,000	0,999	0,998
Coeficiente de determinación	r ²	1,000	1,000	0,999
Desviación estándar-Intercepto	sb	0,004	0,001	0,001
Desviación estándar-Pendiente	sm	0,012	0,002	0,005
t experimental	t _{exp}	110,2	205,68	43,65
t teórico	t _{teo}	2,201	2,201	2,201

Para la evaluación del coeficiente de correlación se plantea una hipótesis nula H_0 : “no existe correlación entre X e Y”, sin embargo, el criterio de aceptación exigido por el IDEAM para dicho coeficiente es que sea $\geq 0,995$; entonces, teniendo en cuenta los valores registrados en la tabla 13 se tienen valores de 1,000, 0,999 y 0,998 para cromo, hierro y aluminio, respectivamente, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que la curva obtenida es una línea recta con un coeficiente de correlación y de determinación altamente significativos y con una pendiente hacia arriba, entonces al obtener datos mayores a 0,995 se garantiza el ajuste lineal entre las concentraciones y las respuestas obtenidas.

Por otro lado, está el valor de t, que para que sea significativo y se acepte la relación directa entre la variable dependiente con la independiente, el experimental debe ser mayor al teórico ($t_{exp} > t_{teo}$), lo que se puede corroborar observando la tabla 13, concluyendo a partir de esta, que el ajuste lineal es válido.

Dicha relación también se puede establecer a partir de la prueba de la correlación de Pearson que arroja una significancia de 0,000 y un coeficiente de 1,000 (ver tabla 14) para cada uno de los parámetros a determinar, correspondiente a una relación lineal, confirmando, de esta manera que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración, por lo tanto existe una correlación altamente significativa entre ambos, y la hipótesis nula se rechaza.

Para la evaluación estadística (ver tabla 15) tanto de la pendiente como del intercepto obtenidos a partir de las curvas de calibración para cromo, hierro y aluminio se plantean las siguientes dos hipótesis: $H_0 =$ “m no es significativamente diferente de cero”, que se rechaza cuando la prueba estadística es significativa, es decir cuando $p = 0,05$ es menor. $H_a =$ “b no es significativamente diferente de cero”, que se rechaza cuando la prueba es significativa, es decir, cuando $p = 0,05$ es menor.

La significancia tanto para el intercepto como para la pendiente (tabla 15) en cada uno de los parámetros es menor a 0,05 ($p= 0,000$), ósea que es significativa, por lo tanto, se rechazan las dos hipótesis nulas, concluyendo que el valor para el intercepto y la pendiente son significativamente diferentes de cero.

Tabla 14: Evaluación de la correlación de Pearson

		Correlaciones	Nivel Conc.	Absorbancia
Cromo	Nivel Conc.	Correlación de Pearson	1	1,000(**)
		Sig. (bilateral)	.	0,000
		N	42	42
	Absorbancia	Correlación de Pearson	1,000(**)	1
	Sig. (bilateral)	0,000	.	
	N	42	42	
Hierro	Nivel Conc.	Correlación de Pearson	1	1,000(**)
		Sig. (bilateral)		0,000
		N	42	42
	Absorbancia	Correlación de Pearson	1,000(**)	1
	Sig. (bilateral)	0,000		
	N	42	42	
Aluminio	Nivel Conc.	Correlación de Pearson	1	1,000(**)
		Sig. (bilateral)		0,000
		N	42	42
	Absorbancia	Correlación de Pearson	1,000(**)	1
	Sig. (bilateral)	0,000		
	N	42	42	

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral)

Tabla 15: Evaluación estadística de la pendiente y el intercepto de las curvas de calibración

Variable	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	95% intervalo de confianza para B		
	B	Error	Beta			Límite inferior	Límite superior	
Cr	B	0,034	0,004		7,680	0,000	0,025	0,043
	M	3,820	0,012	1,000	309,186	0,000	3,795	3,845
Fe	B	0,141	0,001		8,699	0,000	0,140	0,143
	M	0,924	0,002	1,000	405,340	0,000	0,920	0,929
Al	B	0,015	0,001		-7,296	0,000	-0,008	-0,005
	M	2,348	0,005	1,000	508,933	0,000	2,436	2,455

Luego se hace un análisis de varianza (tabla 16) para evaluar la regresión lineal de las curvas de calibración, en donde se establecen las siguientes hipótesis: H_0 = la regresión de la curva de calibración no es significativa ($r^2 = 0$) y H_a = la regresión de la curva de calibración es significativa ($r^2 \neq 0$).

El grado de significancia registrado en la tabla 16 es menor al grado de significancia $p= 0,05$, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, es decir, la regresión de la curva de calibración es significativa, ósea que el r^2 es diferente de cero.

En cuanto a la linealidad instrumental, teniendo en cuenta todos los análisis y estimaciones estadísticas se puede decir que el rango en el que se trabajó cada uno de los parámetros a determinar es bueno, pues todos los métodos instrumentales son lineales, con un coeficiente de correlación altamente significativo, de 1,000, 0,999 y 0,998 para cromo, hierro y aluminio respectivamente, asegurando de esta manera la viabilidad de los resultados de cada uno de los análisis, ya que se cumple con los criterios de aceptación y se estima que cualquier resultado obtenido en estos rangos de linealidad evaluados cumplen con lo requerido por el método.

Tabla 16: Análisis de varianza para evaluar la regresión lineal de las curvas

	Variable	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	f	Sig.
Cr	Regresión	32,299	1	32,299	95595,950	0,000
	Residuo	0,014	40	0,000		
	Total	32,313	41			
Fe	Regresión	1,292	1	1,292	164300,756	0,000
	Residuo	0,000	40	0,000		
	Total	1,292	41			
Al	Regresión	2,238	1	2,238	259013,046	0,000
	Residuo	0,000	40	0,000		
	Total	2,239	41			

6.1.2 Precisión instrumental

La precisión instrumental para la determinación de cromo, hierro y aluminio se evaluó bajo condiciones de repetibilidad, en donde se prepararon 5 curvas de calibración bajo las mismas condiciones (el mismo día) y bajo condiciones de precisión intermedia (reproducibilidad), en donde se prepararon 5 curvas de calibración en días diferentes, es decir, una curva por día. Los datos obtenidos de cada una de ellas se registran en las tablas 17 y 18.

Para la estimación de la precisión instrumental se calcula la desviación estándar (S), y el coeficiente de variación (CV), el valor de aceptación para la desviación estándar puede ser variable y está definido por los objetivos analíticos y la naturaleza del método de ensayo (MinSalud, 2014), en cuanto al coeficiente de variación deben ser menores o iguales al 10 %; de lo contrario se cuestiona su precisión (Chica, y col., 2007), criterio de aceptación establecido por el IDEAM. Dichos valores de aceptación para la aplicabilidad de los diferentes métodos en la determinación de los tres parámetros, cromo, hierro y aluminio se deben definir en cada laboratorio dependiendo de sus fines y las condiciones que este presente para la realización de cada análisis.

Tabla 17: Curvas de calibración para evaluar la precisión instrumental en condiciones de repetibilidad

	Concentración (mg/L)	Absorbancias				
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5
CROMO	0,01	0,071	0,072	0,069	0,072	0,071
	0,05	0,210	0,208	0,209	0,209	0,210
	0,10	0,400	0,401	0,399	0,401	0,402
	0,25	1,008	1,007	1,008	1,006	1,007
	0,35	1,388	1,389	1,390	1,388	1,389
	0,45	1,774	1,777	1,776	1,774	1,775
	0,70	2,684	2,684	2,681	2,683	2,680
HIERRO	0,05	0,186	0,185	0,186	0,189	0,189
	0,10	0,235	0,233	0,235	0,231	0,233
	0,20	0,329	0,329	0,327	0,326	0,330
	0,30	0,415	0,416	0,417	0,419	0,415
	0,40	0,510	0,508	0,508	0,509	0,507
	0,50	0,606	0,606	0,605	0,607	0,608
	0,60	0,698	0,695	0,699	0,696	0,699
ALUMINIO	0,02	0,042	0,044	0,042	0,041	0,043
	0,06	0,140	0,141	0,138	0,136	0,141
	0,10	0,243	0,245	0,243	0,244	0,242
	0,15	0,362	0,365	0,363	0,364	0,364
	0,20	0,481	0,480	0,478	0,479	0,480
	0,25	0,605	0,603	0,605	0,606	0,604
	0,30	0,729	0,728	0,728	0,726	0,727

Tabla 18: Curvas de calibración para evaluar la precisión instrumental en condiciones de precisión intermedia

	Concentración (mg/L)	Absorbancias				
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5
CROMO	0,01	0,071	0,068	0,070	0,071	0,068
	0,05	0,207	0,210	0,208	0,209	0,209
	0,10	0,398	0,396	0,400	0,397	0,401
	0,25	1,006	1,005	1,007	1,008	1,006
	0,35	1,390	1,387	1,391	1,389	1,390
	0,45	1,776	1,777	1,775	1,777	1,774
	0,70	2,682	2,680	2,683	2,682	2,682
HIERRO	0,05	0,188	0,187	0,189	0,188	0,190
	0,10	0,232	0,234	0,233	0,234	0,235
	0,20	0,326	0,325	0,326	0,330	0,326
	0,30	0,418	0,414	0,415	0,415	0,416
	0,40	0,505	0,510	0,506	0,507	0,506
	0,50	0,609	0,609	0,606	0,606	0,605
	0,60	0,700	0,698	0,696	0,698	0,697
ALUMINIO	0,02	0,043	0,044	0,042	0,042	0,041
	0,06	0,141	0,138	0,140	0,138	0,139
	0,10	0,238	0,244	0,245	0,239	0,243
	0,15	0,364	0,363	0,363	0,362	0,365
	0,20	0,482	0,479	0,479	0,479	0,482
	0,25	0,604	0,605	0,607	0,605	0,603
	0,30	0,727	0,726	0,727	0,728	0,727

En la tabla 19 se plasman los diferentes valores tanto para repetibilidad como para precisión intermedia, de la desviación estándar (ecuación 5), el CV (ecuación 7) y %E (ecuación 8), estando estos dos últimos por debajo del 10%, lo que indica su baja variabilidad y su alta reproducibilidad y precisión para la determinación de cada uno de los parámetros a analizar.

Tabla 19: Evaluación de la precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia

	Conc (mg/L)	Repetibilidad				Precisión Intermedia			
		X	S	%CV	%E	X	S	%CV	%E
CROMO	0,01	0,071	0,0012	1,725	2,34	0,070	0,0015	2,179	2,91
	0,05	0,209	0,0008	0,400	8,13	0,209	0,0011	0,547	7,87
	0,10	0,401	0,0011	0,285	3,979	0,398	0,0021	0,520	4,294
	0,25	1,007	0,0008	0,083	1,906	1,006	0,0011	0,113	1,891
	0,35	1,389	0,0008	0,060	1,322	1,389	0,0015	0,109	1,400
	0,45	1,775	0,0013	0,073	1,277	1,776	0,0013	0,073	1,325
	0,70	2,682	0,0018	0,068	0,978	2,682	0,0011	0,041	1,011
HIERRO	0,05	0,187	0,002	1,000	0,330	0,188	0,001	0,605	3,45
	0,10	0,233	0,002	0,717	0,200	0,234	0,001	0,488	0,50
	0,20	0,328	0,002	0,501	1,214	0,327	0,002	0,597	0,42
	0,30	0,416	0,002	0,402	0,820	0,416	0,002	0,365	1,04
	0,40	0,508	0,001	0,224	0,813	0,507	0,002	0,380	1,18
	0,50	0,606	0,001	0,188	0,485	0,607	0,002	0,308	0,68
	0,60	0,697	0,002	0,260	0,093	0,698	0,001	0,213	0,23
ALUMINIO	0,02	0,042	0,001	2,689	6,508	0,042	0,001	2,689	2,065
	0,06	0,139	0,002	1,557	2,982	0,139	0,001	0,937	1,273
	0,10	0,243	0,001	0,468	0,919	0,242	0,003	1,288	1,262
	0,15	0,364	0,001	0,314	0,124	0,363	0,001	0,314	0,713
	0,20	0,480	0,001	0,238	1,134	0,480	0,002	0,342	0,545
	0,25	0,605	0,001	0,189	0,414	0,605	0,001	0,245	0,021
	0,30	0,728	0,001	0,157	0,207	0,727	0,001	0,097	0,000

X: Promedio, S: Desviación estándar, CV: Coeficiente de Variación, %E: Porcentaje de error.

6.1.3 Determinación de los límites de detección y cuantificación

La determinación de los límites de cuantificación y detección se realizó mediante la lectura de diez (10) réplicas de blanco sometidos al mismo pretratamiento que los patrones, posterior a ello se estimó la desviación estándar de estos y

finalmente se calcularon los límites de detección y cuantificación a partir de las ecuaciones 1 y 3 (sección 4.6); datos que se indican en la tabla 20.

Tabla 20: Límites críticos teóricos para cromo, hierro y aluminio

	Promedio	Desviación estándar	Varianza	LOD	LOQ
Cr	0,006	0,0006	1,2E-03	0,002	0,006
Fe	0,097	0,0027	5.4E-3	0,009	0,027
Al	0,001	0,0002	1,56E-3	0,0007	0,002

LOD: límite de detección, LOQ: límite de cuantificación

Los valores del límite de cuantificación para cada uno de los parámetros es inferior al primer nivel de concentración de los rangos de linealidad definidos para las curvas de calibración, sin embargo, se puede observar que los límites encontrados teóricamente para aluminio son muy bajos dando resultados erróneos, como porcentajes de recuperación menores al 20%, ósea que no hay certeza que se pueda determinar una concentración tan baja que este por debajo del primer valor del rango lineal (0,02 mgAl/L), produciendo un tipo de incertidumbre en la medida, dada la inestabilidad del complejo en el tiempo; por lo que se estableció este como el límite de cuantificación y un LOD de 0,006, que fue evaluado pasando 3 réplicas, las cuales dieron una lectura de absorbancia adecuada.

Estos límites fueron evaluados experimentalmente bajo los términos de exactitud y precisión, preparando 5 soluciones al nivel de concentración que se halló teóricamente. Las absorbancias encontradas se promediaron e interpolaron en una curva de calibración, con esto se halló la exactitud y precisión del LOQ para cada uno de ellos. Los porcentajes de recuperación comprendidos entre 80 y 120, y los coeficientes de variación menores al 10% registrados en las tablas 21 y 22, indican que el sistema instrumental brinda una adecuada precisión y exactitud al límite de cuantificación, y es sensible al LOD ya que brinda respuesta a esta concentración, generando las absorbancias consignadas en la tabla 22.

Tabla 21: Determinación del LOQ experimental para cromo, hierro y aluminio

	Absorbancia	LOQ_{Experimental} (mg/L)	S	LOQ_{Teórico} (mg/L)	%CV	%R
Cromo	0,0072					
	0,0069					
	0,0069	0,0070	0,0001	0,0060	2,3410	100,00
	0,0072					
	0,0069					
Hierro	0,0266					
	0,0277					
	0,0266	0,0268	0,0004	0,0270	1,7960	99,375
	0,0266					
	0,0266					
Aluminio	0,0201					
	0,0205					
	0,0197	0,0201	0,0003	0,0200	1,4070	100,05
	0,0201					
	0,0201					

Tabla 22: Determinación del LOD experimental para cromo, hierro y aluminio

	Absorbancia	LOD _{Exp} (mg/L)	S	LOD _{Teórico} (mg/L)	%CV
CROMO	0,0020	0,0020	0,0001	0,0020	5,3450
	0,0020				
	0,0020				
	0,0020				
	0,0022				
HIERRO	0,009	0,0088	0,0004	0,0090	5,0820
	0,008				
	0,009				
	0,009				
	0,009				
ALUMINIO	0,0062	0,0059	0,0002	0,0060	3,6760
	0,0058				
	0,0062				
	0,0058				
	0,0058				

6.2 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA

Para la validación de la metodología se evaluó la linealidad, la precisión y la exactitud.

6.2.1 Linealidad de la metodología

De la misma manera en la que se estimó la linealidad instrumental, se evaluó la linealidad de la metodología corriendo 5 curvas de calibración en días diferentes, teniendo en cuenta los mismos rangos de linealidad definidos para cada método. En la tabla 23 se indican los resultados. Mediante la prueba de la Q de Dixon se encontrará si hay datos atípicos o no, dentro de las lecturas arrojadas por el equipo. Para un tamaño de muestra igual a cinco con un nivel de confianza del 95%, se tiene que Q tabulada es 0,710; en la tabla 24 se especifica que todos los valores para Q calculada son menores, concluyendo que no hay datos anómalos que estén fuera de la población. Valor de aceptación $Q_{tab} > Q_{calc}$

Tabla 23: Resultados para evaluar la linealidad de la metodología

	Concentración	Absorbancias				
	(mg/L)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5
CROMO	0,01	0,074	0,072	0,072	0,073	0,071
	0,05	0,211	0,209	0,212	0,211	0,208
	0,10	0,404	0,402	0,401	0,404	0,404
	0,25	1,005	1,004	1,002	1,005	1,004
	0,35	1,381	1,380	1,377	1,379	1,384
	0,45	1,771	1,769	1,768	1,769	1,773
	0,70	2,680	2,690	2,692	2,693	2,689
HIERRO	0,05	0,187	0,186	0,185	0,187	0,184
	0,10	0,233	0,234	0,231	0,230	0,234
	0,20	0,326	0,327	0,327	0,325	0,325
	0,30	0,418	0,417	0,419	0,416	0,418
	0,40	0,511	0,509	0,508	0,510	0,505
	0,50	0,603	0,605	0,607	0,603	0,605
	0,60	0,696	0,697	0,696	0,695	0,698
ALUMINIO	0,02	0,043	0,041	0,042	0,040	0,043
	0,06	0,138	0,136	0,138	0,138	0,141
	0,10	0,240	0,239	0,242	0,241	0,242
	0,15	0,363	0,362	0,364	0,363	0,363
	0,20	0,479	0,482	0,481	0,482	0,483
	0,25	0,604	0,605	0,602	0,603	0,605
	0,30	0,725	0,726	0,728	0,726	0,727

A los datos recogidos en la tabla 23 se les aplica una prueba de normalidad Shapiro-Wilk en función del día (tabla 25) y del nivel de concentración (tabla 26). Las hipótesis que se tienen en cuenta son: H_0 : los datos provienen de una población normal y H_a : los datos no provienen de una población normal, si $p=0,05$, entonces se acepta la hipótesis nula de lo contrario se rechaza.

Tabla 24: Valores de la Q de Dixon para evaluar datos atípicos

Cromo		Hierro		Aluminio	
Qmin	Qmax	Qmin	Qmax	Qmin	Qmax
0,333	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333
0,250	0,250	0,250	0,250	0,400	0,600
0,333	0,00	0,500	0,500	0,333	0,333
0,500	0,500	0,333	0,333	0,500	0,500
0,286	0,428	0,600	0,200	0,500	0,250
0,200	0,400	0,500	0,500	0,333	0,333
0,250	0,250	0,333	0,333	0,333	0,333

Tabla 25: Evaluación de la normalidad para la metodología en función del día

Día	gl	Cromo		Hierro		Aluminio	
		Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.
1	7	0,932	0,570	0,961	0,824	0,972	0,910
2	7	0,931	0,563	0,962	0,833	0,971	0,906
3	7	0,931	0,563	0,960	0,821	0,973	0,920
4	7	0,931	0,563	0,959	0,809	0,973	0,918
5	7	0,932	0,567	0,963	0,841	0,972	0,915

El valor de la significancia de los datos en función del día y de la concentración es mayor a $p=0,05$, es decir que se ajustan a la normalidad por lo tanto se acepta la hipótesis nula. Por tal razón se aplican pruebas paramétricas (ANOVA) para mirar si hay o no diferencias significativas entre los datos.

Tabla 26: Evaluación de la normalidad para la metodología en función de la concentración

Día	gl	Cromo		Hierro		Aluminio	
		Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.	Estadístico	Sig.
1	5	0,961	0,814	0,902	0,421	0,902	0,421
2	5	0,914	0,490	0,867	0,254	0,863	0,238
3	5	0,767	0,342	0,821	0,119	0,902	0,421
4	5	0,881	0,314	0,961	0,814	0,883	0,325
5	5	0,984	0,955	0,943	0,685	0,914	0,492
6	5	0,905	0,440	0,881	0,314	0,902	0,421
7	5	0,867	0,254	0,961	0,814	0,961	0,814

El grado de significancia $p= 0,05$ de los datos registrados en la tabla 27, es menor, por consiguiente los valores de absorbancia en cuanto al nivel de concentración se refiere, presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí, lo que era de esperarse, pues a medida que cambia una variable la otra también lo hace, indicando que son directamente proporcionales.

Tabla 27: ANOVA de un factor para evaluar la absorbancia en función del nivel de concentración para Cr, Fe, y Al

	Grupos	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Cromo	Inter-grupos	26,980	6	4,497	1520591,56	0,000
	Intra-grupos	0,000	28	0,000		
	Total	26,980	34			
Hierro	Inter-grupos	1,084	6	0,181	75752,208	0,000
	Intra-grupos	0,000	28	0,000		
	Total	1,084	34			
Aluminio	Inter-grupos	1,861	6	0,310	175130,457	0,000
	Intra-grupos	0,000	28	0,000		
	Total	1,861	34			

El grado de significancia para el análisis de varianza es superior a $p=0,05$, por lo tanto los niveles de absorbancia, tanto para cromo, hierro y aluminio no presentan diferencias significativas, además el F crítico de Fisher-Snedecor (($F = 2,45$)) reportado en tablas es menor que el calculado para cada uno de ellos (tabla 28), entonces el factor (día) no influye en la variable dependiente (absorbancia), es decir, los distintos niveles del factor se comportan de igual forma en lo que la variable dependiente se refiere. Con todo esto, se concluye que la absorbancia de cada nivel de concentración no presenta varianza con respecto al tiempo, por lo tanto, las metodologías aplicadas para cada análisis son reproducibles.

Tabla 28: ANOVA de un factor para evaluar la absorbancia en función del día

	Grupos	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Cromo	Inter-grupos	0,000	4	0,000	0,000	1,000
	Intra-grupos	26,980	30	0,899		
	Total	26,980	34			
Hierro	Inter-grupos	0,000	4	0,000	0,000	1,000
	Intra-grupos	1,086	30	0,036		
	Total	1,086	44			
Aluminio	Inter-grupos	0,000	4	0,000	0,000	1,000
	Intra-grupos	1,862	30	0,062		
	Total	1,862	34			

A continuación se aplica una prueba Tukey para saber entre que datos se encuentran las diferencias que se están dando. En la tabla 29 se registran los resultados que reflejan dichas diferencias.

La prueba de Tukey comprueba la relación que existe entre la absorbancia y el nivel de concentración, pues un aumento en la variable dependiente indica un aumento en la variable independiente, además, como se puede apreciar y como era de esperarse cada lectura arrojada por el equipo es bastante diferente para cada nivel de concentración.

Una vez más la prueba de Tukey demuestra la proporcionalidad que existe entre las dos variables, pues cada vez que una de las dos presenta un cambio, la otra también lo hace.

La relación proporcional que existe entre cada una de las variables hace posible que se puedan graficar una en contra de la otra. Las gráficas para la linealidad de la metodología, para cada una de las curvas de calibración en las determinaciones para cromo, hierro y aluminio se presentan en el anexo 11, en donde se ve claramente la tendencia lineal de cada una de ellas.

Tabla 29: Prueba de Tukey^a para evaluar la varianza entre absorbancia y nivel de concentración

			Subconjunto para alfa = 0,05						
Concentración		N	1	2	3	4	5	6	7
CROMO	0,01	5	0,0724						
	0,05	5		0,2102					
	0,10	5			0,4030				
	0,25	5				1,0048			
	0,35	5					1,3802		
	0,45	5						1,7700	
	0,70	5							2,6906
	Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
HIERRO	0,05	5	0,1858						
	0,10	5		0,2324					
	0,20	5			0,3260				
	0,30	5				0,4176			
	0,40	5					0,5074		
	0,50	5						0,6046	
	0,60	5							0,6964
	Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
ALUMINIO	0,02	5	0,0418						
	0,06	5		0,1382					
	0,10	5			0,2408				
	0,15	5				0,3630			
	0,20	5					0,4814		
	0,25	5						0,6038	
	0,30	5							0,7264
	Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

a. usa el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000

.Las ecuaciones para cada gráfica se obtienen a partir del método de mínimos cuadrados, demostrando la relación lineal que existe entre cada una de las variables. En la tabla 30 se muestra para cada una de ellas la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación que se toman de la ecuación lineal arrojada por cada una de ellas. Aquí también se presentan sus respectivas desviaciones estándar.

El coeficiente de correlación para cada una de las curvas de calibración llevadas a cabo para cada determinación es altamente significativo, ya que está por encima

de 0,995, ósea cercano a la unidad, por lo que se garantiza el ajuste lineal entre las concentraciones y las absorbancias.

Al observar cada uno de los datos reportados en la tabla 13 y la tabla 30, los valores tanto de las pendientes como de los interceptos, son bastante similares, con lo que se puede probar que las metodologías utilizadas para la determinación de cromo, hierro y aluminio son adecuadas.

Tabla 30: Evaluación de la linealidad de la metodología para cromo, hierro y aluminio

Parámetro	Símbolo	Cromo	Hierro	Aluminio
Intercepto	b	0,033	0,139	-0,008
Pendiente	m	3,824	0,927	2,443
Coefficiente de correlación	r	1,000	0,999	1,000
Coefficiente de determinación	r ²	1,000	1,000	1,000
Desviación estándar-Intercepto	sb	0,004	0,001	0,001
Desviación estándar-Pendiente	sm	0,010	0,002	0,004
t experimental	t _{exp}	145,06	435,9	285,14
t teórico	t _{teo}	2,570	2,570	2,570

A continuación se evalúa el coeficiente de correlación (tabla 31) a partir de la prueba de la correlación de Pearson, el cual es altamente significativo para cada uno de los análisis en las diferentes determinaciones, presentando una significancia igual a 0,000, confirmando, una vez más la relación lineal existente entre la variable dependiente correspondiente a la absorbancia y la variable independiente respectiva a la concentración.

Tabla 31: Evaluación de la correlación de Pearson

		Correlaciones	Nivel Conc.	Absorbancia
CROMO	Nivel Conc.	Correlación de Pearson	1	1,000(**)
		Sig. (bilateral)	.	0,000
		N	35	35
	Absorbancia	Correlación de Pearson	1,000(**)	1
		Sig. (bilateral)	0,000	.
		N	35	35
HIERRO	Nivel Conc.	Correlación de Pearson	1	1,000(**)
		Sig. (bilateral)	.	0,000
		N	35	35
	Absorbancia	Correlación de Pearson	1,000(**)	1
		Sig. (bilateral)	0,000	.
		N	35	35
ALUMINIO	Nivel Conc.	Correlación de Pearson	1	1,000(**)
		Sig. (bilateral)	.	0,000
		N	35	35
	Absorbancia	Correlación de Pearson	1,000(**)	1
		Sig. (bilateral)	0,000	.
		N	35	35

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral)

6.2.2 Precisión y exactitud de la metodología en función del nivel de concentración

La precisión y la exactitud se evaluaron bajo los términos del coeficiente de variación y los porcentajes de recuperación (tabla 32) calculados mediante la ecuación 7 y 12, respectivamente.

Teniendo en cuenta el coeficiente de variación para todos los resultados, se ve claramente que están por debajo del nivel de aceptación (10%), indicando la alta reproducibilidad de los métodos, por otro lado, los porcentajes de recuperación son adecuados ya que están comprendidos entre el 80% y el 120%.

Para evaluar la variabilidad de los porcentajes de recuperación encontrados para cada uno de los metales se aplicó una prueba de homogeneidad de varianzas o

estadístico de Levene (tabla 33), teniendo en cuenta como hipótesis nula H_0 : “el nivel de concentración no afecta la variabilidad de los porcentajes de recuperación”; entonces, si el nivel crítico (sig.) es menor o igual a 0,05, se rechaza la hipótesis nula de lo contrario se acepta.

Para cromo, hierro y aluminio, la significancia es mayor a 0,05, por lo tanto la hipótesis nula se acepta al no ser significativa, indicando que el nivel de concentración no afecta los porcentajes de recuperación.

Tabla 32: Resultados para evaluar la exactitud y precisión de los métodos

	Conc. Teórica (mg/L)	Conc. Real (mg/L)	Precisión intermedia		
			S	%CV	%R
CROMO	0,01	0,010	0,0002	1,737	100,45
	0,05	0,049	0,0003	0,607	97,328
	0,10	0,097	0,0003	0,354	96,826
	0,25	0,249	0,0003	0,132	99,504
	0,35	0,352	0,0006	0,179	100,67
	0,45	0,451	0,0005	0,103	100,11
	0,70	0,695	0,0004	0,0576	99,295
HIERRO	0,05	0,050	0,0012	2,558	100,08
	0,10	0,100	0,0014	1,427	100,03
	0,20	0,198	0,0014	0,707	98,610
	0,30	0,300	0,0009	0,305	99,930
	0,40	0,398	0,0024	0,593	99,460
	0,50	0,501	0,0011	0,226	100,05
	0,60	0,600	0,0009	0,164	100,03
ALUMINIO	0,02	0,020	0,0003	1,802	98,270
	0,06	0,059	0,0002	1,059	98,380
	0,10	0,098	0,0003	0,400	99,930
	0,15	0,151	0,0003	2,151	100,74
	0,20	0,200	0,0004	2,565	100,02
	0,25	0,249	0,0006	0,222	99,870
	0,30	0,300	0,0004	0,121	99,951

Tabla 33: Evaluación de los porcentajes de recuperación mediante el estadístico de Levene

		Estadístico de Levene	gl 1	gl 2	Sig.
Cr	Basándose en la media	2,668	6	28	0,116
	Basándose en la mediana	0,749	6	28	0,325
Fe	Basándose en la media	3,098	6	28	0,095
	Basándose en la mediana	1,564	6	28	0,254
Al	Basándose en la media	1,332	6	28	0,333
	Basándose en la mediana	0,857	6	28	0,436

En la tabla 34 se presentan los valores de los porcentajes de recuperación promedio a partir de los porcentajes de recuperación para cada nivel de concentración, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada uno de ellos.

Tabla 34: Exactitud y precisión para la metodología de cromo, hierro y aluminio

	Porcentaje de recuperación							%R _{Prom}	S	%CV
	1	2	3	4	5	6	7			
Cr	100,44	96,78	96,84	99,62	100,71	100,02	99,29	99,102	1,633	1,64
Fe	99,09	99,75	98,77	99,90	99,42	100,15	100,02	99,58	0,513	0,52
Al	97,91	98,29	100,00	100,82	99,96	99,92	99,93	99,55	1,044	1,05

Los bajos coeficientes de variación demuestran una vez más la precisión de los métodos utilizados, y a su vez, los porcentajes de recuperación dentro del rango apropiado indican su exactitud.

6.2.3 Precisión y exactitud con patrones para cromo, hierro y aluminio

Para la precisión y exactitud de los métodos con patrones, se preparan soluciones estándar enriquecidas con concentraciones de rango bajo (**PRB**) 0,012 mg Cr/L, 0,054 mg Fe/L y 0,004 mg Al/L; rango medio (**PRM**) 0,035 mg Cr/L, 0,3 mg Fe/L y 0,15 mg Al/L, y rango alto (**PRA**) 0,63mgCr/L, 0,54 mg Fe/L y 0,27 mg Al/L; las

cuales son sometidas a la metodología trabajada para todas las determinaciones, preparando un patrón por día con su respectivo duplicado durante seis días. Su evaluación se hace teniendo en cuenta el sesgo, el porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación, como se representa en la tabla 35.

Teniendo en cuenta los datos de la tabla 35, se concluye que los métodos producen resultados exactos y precisos, pues el error relativo y el coeficiente de variación son bajos, menores al 10%. Además los porcentajes de recuperación para los tres métodos se encuentran entre el 80 y 120%, indicando la efectividad en la que se puede recuperar el analito de interés, para este caso cromo, hierro y aluminio.

Por otro lado está la t de distribución que indica que los resultados esperados en cada ensayo no difieren significativamente del valor real, ya que cumplen con el criterio de aceptación, $t_{exp} < t_{tab}$, el valor para la t tabulada con 11 grados de libertad y a un 95% de confianza es 2,2.

Tabla 35: Resultados de la precisión y la exactitud en patrones fortificados

	Muestra	Conc. Teórica (mg/L)	Conc. Real (mg/L)	S	%CV	%R	%E	t_{exp}
Cr	PRB	0,012	0,011	0,000	1,25	99,03	0,97	0,057
	PRM	0,350	0,349	0,001	0,25	99,89	0,11	0,138
	PARA	0,630	0,630	0,001	0,14	99,93	0,07	0,246
Fe	PRB	0,054	0,054	0,001	1,52	99,38	0,62	0,404
	PRM	0,30	0,298	0,002	0,79	99,48	0,52	0,118
	PARA	0,54	0,539	0,002	0,40	99,80	0,20	0,086
Al	PRB	0,04	0,040	0,001	1,75	99,43	0,57	0,584
	PRM	0,15	0,149	0,001	0,67	99,35	0,65	0,181
	PARA	0,27	0,270	0,001	0,36	99,82	0,18	0,336

t_{exp} : t experimental, %E: porcentaje de error relativo.

6.2.4 Validación con muestras de agua residual, superficial y potable para cromo y aluminio, y agua potable para hierro (evaluación de la exactitud y la precisión)

Se utilizaron muestras de agua superficial (**MS**) y residual (**MR**) provenientes del río Guarapas para la determinación de cromo y aluminio; y muestras de agua potable (**MP**) obtenidas del grifo del laboratorio para la determinación de estos dos metales y la de hierro. Se analizaron diariamente por duplicado durante seis días consecutivos. Para la validación se corrieron tres tipos de soluciones: una muestra real sin adicionado y dos muestras enriquecidas, una con concentración de rango

bajo (**RB**) y la otra con concentración de rango alto (**RA**) ; todas ellas sometidas a la metodología explicada en la sección 5.5, 5.6 y 5.7.

La evaluación de la precisión y la exactitud se hace bajo los términos de coeficiente de variación y porcentajes de recuperación; también se tiene en cuenta la t de distribución cuyo nivel debe ser $t_{exp} < t_{tab}$. Los resultados para dicha estimación se registran en la tabla 36.

Los coeficientes de variación y los porcentajes de error menores al 10% indican que hay reproducibilidad y precisión, siendo el método apropiado para la determinación de los metales. Además, Los porcentajes de recuperación obtenidos muy cercanos al 100%, representan su exactitud con lo que se puede afirmar que las metodologías implementadas se pueden aplicar a muestras de agua residual, superficial (cromo y aluminio) y potable (hierro) ya que con ellas se logra una buena cuantificación del analito de interés. Los valores de la t de distribución obtenidos, cumplen con el criterio de aceptación corroborando una vez más la exactitud y precisión de los métodos.

Tabla 36: Evaluación de la precisión y la exactitud para muestras reales fortificadas

	Muestra	%R	S	%CV	%E	t_{tab}	t_{exp}
Cr	MP RB	99,89	2,00	2,031	0,111	2,20	0,173
	MP RA	99,92	0,10	0,114	0,084	2,20	0,032
	MS RB	99,06	2,20	2,173	0,935	2,20	0,254
	MS RA	99,00	0,50	0,515	0,998	2,20	0,592
	MR RB	98,97	3,00	3,036	1,027	2,20	0,136
	MR RA	98,84	0,10	0,069	1,160	2,20	0,099
Fe	MP RB	99,09	1,80	1,769	0,915	2,20	0,147
	MP RA	99,68	1,00	1,018	0,316	2,20	0,146
Al	MP RB	99,28	0,800	0,804	0,719	2,20	0,054
	MP RA	99,73	0,300	0,274	0,269	2,20	0,013
	MS RB	97,69	1,500	1,513	2,305	2,20	0,170
	MS RA	99,10	0,700	0,736	0,901	2,20	0,102
	MR RB	98,86	0,900	0,946	1,138	2,20	0,076
	MR RA	99,45	0,400	0,940	0,554	2,20	0,061

6.3 CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE DE LOS MÉTODOS TENIENDO EN CUENTA LAS FUENTES GLOBALES DE INCERTIDUMBRE

Para las metodologías validadas, se determinó la incertidumbre a partir de estándares preparados internamente y con muestras de agua superficial, potable y residual enriquecidas con concentraciones cercanas al nivel bajo y alto de la curva de calibración, y se calcula con base a los resultados de evaluación de la precisión y la exactitud, teniendo en cuenta los porcentajes de recuperación obtenidos. Primero se debe hallar la desviación estándar (**S**) y el promedio (X_{prom}) de las concentraciones obtenidas para los dos rangos de trabajo y luego se procede a calcular la desviación estándar relativa (**RSD**) y la desviación estándar relativa total (**RSDt**), mediante las ecuaciones 17 y 18 respectivamente, estos datos se reportan en la tabla 37.

Adicionalmente, se calcula la recuperación de los patrones y las muestras enriquecidas, mediante la ecuación 12; posterior a ello se determina el promedio R_p y la desviación estándar SR_p a los recuperados. Finalmente se estima la incertidumbre en la recuperación promedio, teniendo en cuenta la ecuación 21.

Tabla 37: Fuentes para el cálculo de la incertidumbre

	Patrón	Concentración	X_{prom}	S	RSD	RSDt
CROMO	PRB	0,012	0,012	0,000	0,000	0,022
	PRA	0,630	0,630	0,001	0,002	
	MSRB	0,012	0,012	0,0002	0,021	0,015
	MSRA	0,630	0,624	0,0031	0,005	
	MRRB	0,012	0,012	0,003	0,029	0,021
	MRRB	0,063	0,623	0,004	0,001	
	MPRB	0,012	0,012	0,0002	0,020	0,014
	MPRA	0,630	0,629	0,0007	0,001	
HIERRO	PRB	0,054	0,054	0,001	0,015	0,010
	PRA	0,540	0,539	0,002	0,008	
	MPRB	0,054	0,053	0,0009	0,018	0,014
	MPRA	0,540	0,536	0,018	0,010	
ALUMINIO	PRB	0,040	0,040	0,001	0,017	0,014
	PRA	0,270	0,270	0,001	0,007	
	MSRB	0,040	0,039	0,0014	0,009	0,017
	MSRA	0,270	0,268	0,002	0,004	
	MRRB	0,040	0,039	0,001	0,015	0,012
	MRRB	0,270	0,267	0,002	0,007	
	MPRB	0,040	0,038	0,001	0,008	0,016
	MPRA	0,270	0,269	0,001	0,003	

Su respectiva evaluación se hace mediante la estimación del estadístico t , estableciendo una hipótesis nula, H_0 : “el factor de recobro es significativamente diferente de 1”. El t_{exp} se calcula con la ecuación 22, y se compara con el t_{tab} , entonces, si $t_{exp} > t_{tab}$ se rechaza la H_0 ; pero si $t_{exp} < t_{tab}$ se acepta la H_0 . En la tabla 38 se presentan los resultados obtenidos, luego de aplicar las ecuaciones 23 y 24, para hallar las incertidumbres combinada y expandida respectivamente.

En la tabla 39 se indica como se hace el reporte de la incertidumbre para cada uno de los parámetros a determinar.

Tabla 38: Incertidumbres de los métodos

	Parámetro	Patrón	M. Superficial	M. Residual	M. Potable
Cromo	Precisión (fuentes aleatorias) RSDt	0,022	0,015	0,021	0,014
	Sesgo (fuentes sistemáticas) μ_{Rp}	0,007	0,007	0,006	0,009
	Incertidumbre combinada total ($\mu_{C\ total}$)	0,022	0,015	0,020	0,014
	Incertidumbre expandida método (μ)	$\pm 0,044$	$\pm 0,030$	$\pm 0,041$	$\pm 0,029$
	t_{exp}	0,250	0,245	0,136	0,061
Hierro	Precisión (fuentes aleatorias) RSDt	0,010	NA	NA	0,014
	Sesgo (fuentes sistemáticas) μ_{Rp}	0,005			0,006
	Incertidumbre combinada total ($\mu_{C\ total}$)	0,010			0,015
	Incertidumbre expandida método (μ)	$\pm 0,020$			$\pm 0,029$
	t_{exp}	0,381			0,146
	t_{tab}	2,200			2,200
Aluminio	Precisión (fuentes aleatorias) RSDt	0,014	0,017	0,012	0,016
	Sesgo (fuentes sistemáticas) μ_{Rp}	0,005	0,007	0,005	0,007
	Incertidumbre combinada total ($\mu_{C\ total}$)	0,011	0,007	0,012	0,006
	Incertidumbre expandida método (μ)	$\pm 0,022$	$\pm 0,015$	$\pm 0,024$	$\pm 0,012$
	t_{exp}	0,153	0,061	0,102	0,014
	t_{tab}	2,200	2,200	2,200	2,200

NA: No aplica

Tabla 39: Reporte de la incertidumbre para cromo, hierro y aluminio

	Parámetro	Incertidumbre
Cromo	Patrón	Valor medido ± (valor medido * 0,044)
	Agua superficial	Valor medido ± (valor medido * 0,030)
	Agua potable	Valor medido ± (valor medido * 0,029)
	Agua residual	Valor medido ± (valor medido * 0,041)
Hierro	Patrón	Valor medido ± (valor medido * 0,020)
	Agua potable	Valor medido ± (valor medido * 0,029)
Aluminio	Patrón	Valor medido ± (valor medido * 0,022)
	Agua superficial	Valor medido ± (valor medido * 0,015)
	Agua potable	Valor medido ± (valor medido * 0,012)
	Agua residual	Valor medido ± (valor medido * 0,024)

La incertidumbre calculada se puede representar por medio de barras (figura 3), en donde se ve claramente que proviene principalmente de fuentes aleatorias que se producen por eventos únicos imposibles de controlar durante el momento de la medición, y que son difíciles de identificar y de corregir por lo tanto pueden afectar la determinación por espectroscopia visible, no obstante, las fuentes aleatorias que se dan por el equipo o el operario presentan un efecto mayor en la medida.





Figura 3: Incertidumbre para Cromo, Hierro y Aluminio con la metodología de fuentes globales

6.4 Resumen de las figuras de méritos de las metodologías empleadas

En la tabla 40 se resumen las figuras de mérito analíticas para cada una de las determinaciones de los parámetros analíticos que cumplen con los parámetros requeridos para su respectiva validación.

Tabla 40: Resumen de las figuras de mérito para Cr, Fe y Al.

	Método	λ (nm)	Rango lineal (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Linealidad	Sensibilidad	%R	%CV
Cr	Difenilcarb azida	540	0,01- 0,70	0,002	0,006	1,000	3,824	99,89	1,737
Fe	Fenantrolin a	510	0,05- 0,60	0,009	0,027	0,999	0,927	99,80	2,558
Al	Cianina de eriocromo R	535	0,02- 0,30	0,006	0,020	1,000	2,443	99,92	2,151

7. CONCLUSIONES

- 1.** Se implementó y estandarizó la metodología analítica del Estándar Métodos 2012 3500-Cr-B para la determinación de cromo en muestras de agua superficial, residual y potable por espectrometría visible con una longitud de onda de máxima absorción de 540 nm, siendo lineal en el rango de concentración de 0,01 – 0,70 mg/L con un coeficiente de correlación de 1,000 y una pendiente de 3,824.
- 2.** Se implementó y estandarizó la metodología analítica del Estándar Métodos 3500-Fe-B para la determinación de hierro total en muestras de agua potable por espectrometría visible con una longitud de onda de máxima absorción de 510 nm, siendo lineal en el rango de concentración de 0,05 – 0,6 mg/L con un coeficiente de correlación de 0,999 y una pendiente de 0,927.
- 3** Se implementó y estandarizó la metodología analítica del Estándar Métodos 3500-Al-B para la determinación de aluminio en muestras de agua superficial, residual y potable por espectrometría visible con una longitud de onda de máxima absorción de 535 nm, siendo lineal en el rango de concentración de 0,02 – 0,30 mg/L con un coeficiente de correlación de 1,000 y una pendiente de 2,443.
- 4.** Las tres metodologías validadas para la determinación de cromo, hierro y aluminio arrojan resultados evaluados en un nivel de confianza del 95%, indicando de esta manera que son lineales, exactas y precisas, ya que en todos los casos cumplen con los criterios de aceptación establecidos por el laboratorio.
- 5.** La validación o implementación es una parte esencial dentro de los sistemas de gestión de calidad manejados en empresas de regulación ambiental, ya que es de esta manera que se obtienen resultados confiables, satisfaciendo a los clientes.
- 6.** Los límites de detección y cuantificación para las tres metodologías están por debajo del primer nivel de las curvas de calibración, permitiendo una buena cuantificación a bajas concentraciones.

REFERENCIAS

- Aldana, E. J. (2014). *Remoción de aluminio en aguas residuales industriales usando especies macrófitas: una aplicación para el pasto vetiver. "Tecnologías avanzadas de saneamiento ambiental"*. Universidad católica de Manizales, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Ingeniería ambiental, Manizales.
- Asaduzzaman, K., Uddin, M., Binti, N., & et al. (2017). Heavy metals in human teeth dentine: a bio-indicator of metals exposure and environmental pollution. *Chemosphere, ELSEVIER, Science Direct*, 221-230. Obtenido de <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.114>
- Baker, M., & Delaney, M. (2012). Standar methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association. American Water Works Association. Water Environment Federation.*
- Barba, L. E. (2002). *Conceptos básicos de la contaminación del agua y parámetros de medición*. Universidad del Valle, Facultad de Ingenierías, Escuela de ingeniería de recursos naturales y del ambiente, Santiago de Cali.
- Bievre, P., Bottger, D., & et al. (2005). *Métodos analíticos adecuados a su proposito, guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. CENAM- Centro Nacional de Metrología; Eurachem, México.
- Centro Español de Metrología-CEM. (2008). *Evaluación de datos de medición. Guía para la expresión de la incertidumbre de medida*. España.
- Chica, O. Y., Galvis, N., & Madrid Acevedo, J. (2007). *Validación de métodos analíticos (uDQO, hierro, peróxido de hidrógeno, COT) en aguas*. Universidad de Medellín, Facultad de ingeniería, Progrma de ingeniería ambiental, Medellín.
- Colpas, F., Morales , J., & Severiche, C. A. (2014). Analytical assessment by colorimetric method of aluminium determination dissolved in water. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 42-46.
- Diaz Pulido, A., Chingaté Hernandez, N., Muñoz Moreno, D., & et al. (2009). Desarrollo sostenible y el agua como derecho en Colombia. *Estud.Socio-Jurid*, 86-116. Obtenido de http://www.urosario_files/bc/bc24d4f0.pdf

- Doria Herrera, G., Paz Ordoñez, P., & Hormaza, A. (2013). Estandarización de la difenilcarbazida como indicador y acomplejante en la identificación de cromo hexavalente-Cr(VI). *Producción más limpia*, 8(2), 9-20.
- Gonzales, M. E., & Hernandez, C. (1991). Determinación de aluminio en el agua potable de valencia y localidades cercanas. *Organo de divulgación científica y tecnológica*.
- IDEAM- Instituto de Hidrología, Meteorología y estudios Ambientales. (2006). *estandarización de métodos analíticos*. Subdirección de Hidrología- Programa de fisicoquímica ambiental, Bogotá D.C.
- IDEAM-Instituto de Hidrología, Meteorología y estudios Ambientales, Ministerio de Ambiente y desarrollo Territorial. (2010). *Tom de muestras de aguas superficiales*. Grupo laboratorio de calidad ambiental. Bogotá D.C.
- IDEAM-Instituto de Hidrología, Meteorología y estudios Ambientales. (2015). *Resolución 0268, por la cual se establecen los requisitos y el procedimiento de acreditación de organismos de evaluación de la conformidad en matrices ambientales bajo la Norma 17025*. Bogotá D.C.
- Instituto Colombiano de normas técnicas y certificación. (2005). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración, ISO/IEC 17025. Bogotá D. C.
- Instituto de Salud Pública Chile. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". (B. Duffau, F. Rojas, & et al., Edits.)
- Jordi, R., Boqué, R., Moroto, A., & et al. (s. f.). *Trazabilidad en medidas físicas mediante calibración directa: calibración de materia volumétrico*. Universitat Rovira i Virgili, Departamento de química analítica y química orgánica, Instituto de estudios avanzados, Tarragona.
- Kumar, V., Kumar, P., Talwar, M., & et al. (2017). Studies on high iron content in water resources of Moradabad district (UP), India. *Water science, Science Direct*, 44-51. Recuperado el 13 de Marzo de 30, de <http://doi.org/10.1016/j.wsj.2017.02.003>
- Laboratorio de Química Inorgánica. (s. f.). *Determinación colorimétrica del hierro*. Recuperado el 14 de Agosto de 2017, de http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uam/jpn/file/quimica_inorganica/1_determinacion_colorimetrica_del_hierro.pdf

- Marin, L. M. (2011). *Remoción de hierro y manganeso por oxidación con cloro y filtración en grava*. Universidad del Valle, Facultad de ingeniería, Escuela de ingeniería de recursos naturales y del ambiente, Santiago de Cali.
- Maroto, A., Boqué, R., & et al. (s. f.). *Cálculo de incertidumbre en medidas físicas: medida de una masa*. Universitat Rovira i Virgili, Departamento de química analítica y química orgánica, Tarragona.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). *Estadística y quimiometría para Química Analítica* (Cuarta ed.). Madrid, España: Prentice Hall.
- MINAGRICULTURA, Ministerio de agricultura, (1984). *Resolución N° 1594, "por la cual se reglamentan los usos del agua y residuos líquidos"*. Bogotá D.C.
- MINAMBIENTE, Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial, IDEAM. (2002). *Resolución N° 0176, "por la cual se establece el nuevo procedimiento de acreditación de laboratorios ambientales en Colombia"*. Bogotá D.C.
- MINAMBIENTE, Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo sostenible. (2015). *Resolución N° 0631, "por la cual se establecen los parámetros y valores máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público"*. Bogotá D.C.
- MINPROTECSOCIAL, Ministerio de protección social, Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. (2007). *Resolución N° 2115, "por medio de la cual se señalan características y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano"*. Bogotá D.C.
- MinSalud- Ministerio de salud y protección social. (2014). *Lineamientos técnicos para la estandarización y validación de métodos de ensayo*. Subdirección de gestión de calidad de los laboratorios de salud pública, Bogotá D.C.
- Molina, N. P., Aguilar Casa, P., & Cordovez Wandurraga, C. (2010). Plomo, cromo III y cromo VI y sus efectos sobre la salud humana. *Ciencia y tecnología para la salud visual y ocular*, 8(1), 77-88.
- Molina Guevara, S. (2010). Estandarización de métodos de análisis para la determinación de nitratos, nitritos, compuestos fenólicos como indicadores de contaminación en aguas naturales y residuales industriales. *Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química*.
- Moussavi, G., Jiani, F., & Shekoohiyan, S. (2015). Advanced reduction Cr(VI) in real chrome-plating wastewater using a VUV photoreactor: batch and continuous-flow experiments. *Separation and Purification Technology*,

- ELSEVIER, *Science Direct*, 218-224. Recuperado el 20 de Julio de 2017, de <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.07.047>
- Norma Mexicana. (2016). *NMX-AA-051-SCFI. Análisis de agua-Medición de metales por absorción atómica en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-método de prueba*. Mexico D.F.
- OMS-Organización Mundial de la Salud. (2010). *Guías para la calidad del agua potable* (Vol. 1).
- ONAC-Organismo nacional de Acreditación en Colombia. (2007). *La acreditación en Colombia*. Ministerio de industria y comercio, Bogotá D.C.
- Rada Mendoza, M. d., & Pérez, E. H. (2000). *Instrumentación analítica, cuaderno 2 (CG)*. Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Departamento de Química, Unidad de Química Analítica Ambiental, Popayán.
- Rivera, M., Arauzo, M., & et al. (2003). Contaminación por cromo en el agua intersticial, en el agua del cauce y en los sedimentos del rio Jarama. 85-98. Recuperado el 17 de Julio de 2007, de <http://www.limnetica.com/documentos/linmetica-22-2.pdf>
- Romero, K. P. (2009). Contaminación por metale pesados. *Revista Científica Ciencia Médica*, 12(Nº 1:2009).
- S. A. (09 de Julio de 2017). *Análisis de aguas*. Obtenido de https://www.upct.es/minaeeez/analisis_aguas.pdf
- S. A. (s.f.). *Tema: Análisis de Aguas*. Recuperado el 22 de Mayo de 2017, de Retrieved: http://www.4.ujaen.es/-mjayora/docencia_archivos/Quimicaanaliticaambiental/tema10.pdf
- S. A. (s.f.). *Antecedentes*. Recuperado el 16 de Julio de 2017, de <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/21668/capitulo2.pdf>
- Sanchez, A. F. (2011). *Validación de las técnicas hierro total y fosfatos en agua en el laboratorio Alissca LTDA*. Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de tecnología, Química Industrial, Pereira.
- Segura , L. e. (2007). *Estudio de antecedentes sobre la contaminación hídrica en Colombia*. Escuela superior de administración pública, facultad de pregrado, programa en ciencias políticas y administrativas, Bogotá D.C.
- Severiche , C. A., & Gónzales Garcia , H. (2013). Verificación analítica para las determinaciones de cromo hexavalente en aguas por espectrofotometría. *USBMed*, 4(1).

- Trejo Vazquez, R., & Hernandez Montoya, V. (2004). Riesgos a la salud por presencia del aluminio en el agua potable. *Redalyc.org*(25,2004).
- Valencia, C. e. (s. f.). *Química del hierro y manganeso en el agua, métodos de remoción*. Universidad de Cuenca, facultad de ingeniería, escuela de ingeniería civil, Cuenca-Ecuador.
- Villamizar, M. P. (2008). *Estandarización de métodos analíticos usados para el análisis de agua, en el laboratorio del centro de estudios e investigaciones ambientales (CEIAM)*. Universidad Industrial de Santander, Facultad de ciencias, Escuela de química, Bucaramanga.
- Williams, A., Halleux, B., & et al. (2000). *Cuantificación de la Incertidumbre en mediciones analíticas* (Primera ed.). México: Eurachem.

ANEXOS

ANEXO 1

Reactivos para la determinación de Cr

- **Solución madre de cromo (500 mg/L de Cr):** Disolver 141,4 mg de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en agua y diluir a 100 mL; 1,00 mL = 500 μ g Cr.

Precaución: El cromo hexavalente es tóxico y cancerígeno. Manipularlo con cuidado.

- **Solución estándar de cromo (5,00 mg/L de Cr):** Adicionar 10 mL de solución madre de cromo de 500 mg/L en un balón aforado de 1000 mL y aforar con agua desionizada; 1,00 mL = 5,00 μ g Cr.

- **Difenilcarbazida:** Disolver 250 mg de 1,5-difenilcarbazida en 50 mL de acetona.

Nota: Guardar la solución en un frasco de color marrón. Preparar semanalmente y desechar si la solución se decolora.

- **Solución buffer:** disolver 33 g de sulfato de amonio en 75 mL de agua. Añadir 6,5 mL de hidróxido de amonio y diluir a 100 mL con agua.
- Ácido nítrico concentrado (HNO_3)
- **Hidróxido de sodio (NaOH), 5N:** Disolver 20 g de NaOH en 100 mL de agua desionizada. Almacenar en botella plástica.
- Hidróxido de sodio 1N
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, a partir de este preparar soluciones 0,2N, 6N y 18N.
- Ácido fosfórico concentrado (H_3PO_4)

ANEXO 2

Reactivos para la determinación de Hierro

- **Solución de hidroxilamina:** Disolver 10 g de clorhidrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) en 100 mL de agua.
- **Solución tampón de acetato de amonio:** Disolver 250 g de acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) en 150 mL de agua. Añadir 700 mL de ácido acético concentrado (glacial).
- **Solución de fenantrolina:** Disolver 0,100 g de 1,10-fenantrolina monohidratada, ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$), en 100 mL de agua desionizada por agitación y calentamiento a 80°C . No dejar que hierva. Desechar la solución si se oscurece.
- **Permanganato de potasio (KMnO_4), 0,02 M:** Disolver 0,316 g KMnO_4 en agua desionizada y diluir a 100 mL.
- **Solución madre de hierro (200 mgFe/L):** añadir lentamente 20 mL de H_2SO_4 conc a 50 mL de agua desionizada y en esta solución disolver 1,404 g de sulfato amónico ferroso hexahidratado ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Agregar lentamente el KMnO_4 0,02M hasta que persista un color rosa pálido. Transferir a un balón de 1000 mL y aforar con agua desionizada; 1,00 mL = 200 μg Fe.
- **Soluciones patrón de hierro (10 mgFe/L):** Preparar a diario para su uso. Pipetear 50 mL de la solución madre en un balón aforado de 1000 mL y diluir hasta la marca con agua desionizada.

Nota: Almacenar los reactivos en botellas de vidrio. Las soluciones de acetato de amonio son estables indefinidamente si son bien tapados. Las soluciones de hidroxilamina, fenantrolina, y la solución madre de hierro son estables por varios meses. Las soluciones estándar de hierro no son estables; preparar diariamente según sea necesario por dilución de la solución madre.

ANEXO 3

Reactivos para la determinación de aluminio

- **Solución madre de aluminio (500 mg/L):** Disolver 8,791 g de sulfato doble de aluminio y potasio (también llamado alumbre de potasio) dodecahidratado, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, en agua y diluir hasta 1 000 mL con agua desionizada. 1,00 mL = 500 μg Al.
- **Solución patrón de aluminio (5 mg/L):** Adicionar 5,0 mL de solución madre de aluminio en un balón aforado de 500 mL y llevar hasta la marca con agua desionizada. 1,00 mL = 5,00 μg Al. Esta solución se debe preparar diariamente.
- **Solución de ácido ascórbico:** Disolver 0,1 g de ácido ascórbico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ en agua y llevar a 100 mL en un balón aforado. Preparar una nueva diariamente.
- **Solución Buffer:** Disolver 136 g de acetato de sodio, $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, en agua, añadir 40 mL de ácido acético 1 N, transferir a un balón aforado de 1000 mL y aforar.
- **Solución madre coloreada, Cianina de eriocromo R:** Disolver 0,3 g de CER en aproximadamente 50 mL de agua. Ajustar el pH a aproximadamente 2,9 con ácido acético 1:1. Aforar a 100 mL con agua desionizada. Esta solución es estable durante un año.
- **Solución de trabajo coloreada:** tomar 50 mL de la solución madre coloreada y llevar hasta la marca con agua desionizada en un balón aforado de 500 mL. Las soluciones de trabajo son estables durante 6 meses.
- **Solución indicadora naranja de metilo:** Disolver 0,1 g de naranja de metilo y aforar a 100 mL con agua desionizada.
- **EDTA** (sal sódica de ácido etilendiaminotetraacético dihidratado), 0,01 M: Disolver 0,37 g en agua y aforar a 100 mL con agua desionizada.
- NaOH, 1 N y 0,1 N.
- H_2SO_4 0,02 y 6 N.

ANEXO 4

Tabla 41: Diseño experimental para la determinación de Cr

Matriz de las muestras	Acuosa			
Testigos reactivos	Solución de rango bajo 0,012 mg Cr/L Solución de rango medio 0,35 mg Cr/L Solución de rango alto 0,63 mg Cr/L			
Blanco matriz	Agua desionizada			
Material de referencia certificado	Nombre	Marca	Código Interno	
	Dicromato de Potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)	PANREAC	R-22	
Muestras adicionadas	Muestra sin adicionar			
	Muestra adicionada con concentración baja (0,012 mgCr/L)			
	Muestra adicionada con concentración alta (0,63 mg Cr/L)			
Pruebas y parámetros de validación a evaluar	Selectividad			
	Linealidad			
	Sensibilidad			
	Limites	Límite de detección		
		Límite de cuantificación		
		Intervalo de linealidad		
	Exactitud	Porcentaje de recuperación		
	Precisión	Desviación estándar		
		Varianza		
		Error relativo		
Coeficiente de variación				
Incertidumbre				
Criterios de aceptabilidad para cada parámetro de validación	PARÁMETRO	CRITERIO		
	Linealidad	$R^2 > 0.995$		
	Sensibilidad	Calculo de la pendiente obtenida por regresión lineal		
	Límite de detección	Producto de 3,29 por la S del blanco		
	Límite de cuantificación	de	10 veces la S del blanco	
	Intervalo de linealidad	de	0.01 a 0,70 mg Cr/L	
	Exactitud	$t_{cal} < t_{tab}$ en la evaluación del %R		
	Precisión	repetitividad	%E ≤ 10%, CV ≤ 10%	
		reproducibilidad	%E ≤ 10%, CV ≤ 10%	
	Incertidumbre	Identificación de fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición		

ANEXO 5

Tabla 42: Diseño experimental para la determinación de Fe

Matriz de las muestras	Acuosa			
Testigos reactivos	Solución de rango bajo 0,054 mg Fe/L Solución de rango medio 0,30 mg Fe/L Solución de rango alto 0,54 mg Fe/L			
Blanco matriz	Agua desionizada			
Material de referencia certificado	Nombre	Marca	Código Interno	
	Sulfato de amonio ferroso (Fe(NH ₄ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O)	Panreac	R-32	
Muestras adicionadas	Muestra sin adicionar			
	Muestra adicionada con concentración baja (0,054 mg Fe/L)			
	Muestra adicionada con concentración alta (0,54 mg Fe/L)			
Pruebas y parámetros de validación a evaluar	Selectividad			
	Linealidad			
	Sensibilidad			
	Limites	Límite de detección		
		Límite de cuantificación		
		Intervalo de linealidad		
	Exactitud	Porcentaje de recuperación		
	Precisión	Desviación estándar		
		Varianza		
		Error relativo		
Coeficiente de variación				
Incertidumbre				
Criterios de aceptabilidad para cada parámetro de validación	PARÁMETRO	CRITERIO		
	Linealidad	$R^2 > 0.995$		
	Sensibilidad	Calculo de la pendiente obtenida por regresión lineal		
	Límite de detección	Producto de 3,29 por la S del blanco		
	Límite de cuantificación	10 veces la S del blanco		
	Intervalo de linealidad	0.05 a 0,6 mg Fe/L		
	Exactitud	$t_{cal} < t_{tab}$ en la evaluación del %R		
	Precisión	repetitividad	ERROR ≤ 10%, CV ≤ 10%	
		reproducibilidad	ERROR ≤ 10%, CV ≤ 10%	
	Incertidumbre	Identificación de fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición		

ANEXO 6

Tabla 43: Diseño experimental para la determinación de Al

Matriz de las muestras	Acuosa			
Testigos reactivos	Solución de rango bajo 0,04 mg Al/L Solución de rango medio 0,15 mg Al/L Solución de rango alto 0,27 mg Al/L			
Blanco matriz	Agua desionizada			
Material de referencia certificado	Nombre	Marca	Código Interno	
	Sulfato de aluminio potasio (AlK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O)	SIGMA ALDRICH	R-104	
Muestras adicionadas	Muestra sin adicionar			
	Muestra adicionada con concentración baja (0,04 mg Al/L)			
	Muestra adicionada con concentración alta (0,27 mg Al/L)			
Pruebas y parámetros de validación a evaluar	Selectividad			
	Linealidad			
	Sensibilidad			
	Limites	Límite de detección		
		Límite de cuantificación		
		Intervalo de linealidad		
	Exactitud	Porcentaje de recuperación		
	Precisión	Desviación estándar		
		Varianza		
		Error relativo		
		Coeficiente de variación		
Aplicabilidad				
Incertidumbre				
Criterios de aceptabilidad para cada parámetro de validación	PARÁMETRO	CRITERIO		
	Linealidad	$R^2 > 0.995$		
	Sensibilidad	Calculo de la pendiente obtenida por regresión lineal		
	Límite de detección	Producto de 3,29 por la S del blanco		
	Límite de cuantificación	10 veces la S del blanco		
	Intervalo de linealidad	0.02 a 0,3 mg Al/L		
	Exactitud	$t_{cal} < t_{tab}$ en la evaluación del %R		
	Precisión	repetitividad	$\%E \leq 10\%$	
			$CV \leq 10\%$	
		reproducibilidad	$\%E \leq 10\%$	
			$CV \leq 10\%$	
Incertidumbre	Identificación de fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición			

ANEXO 7

Esquema para la determinación de Cromo en muestras de agua residual, superficial y potable.

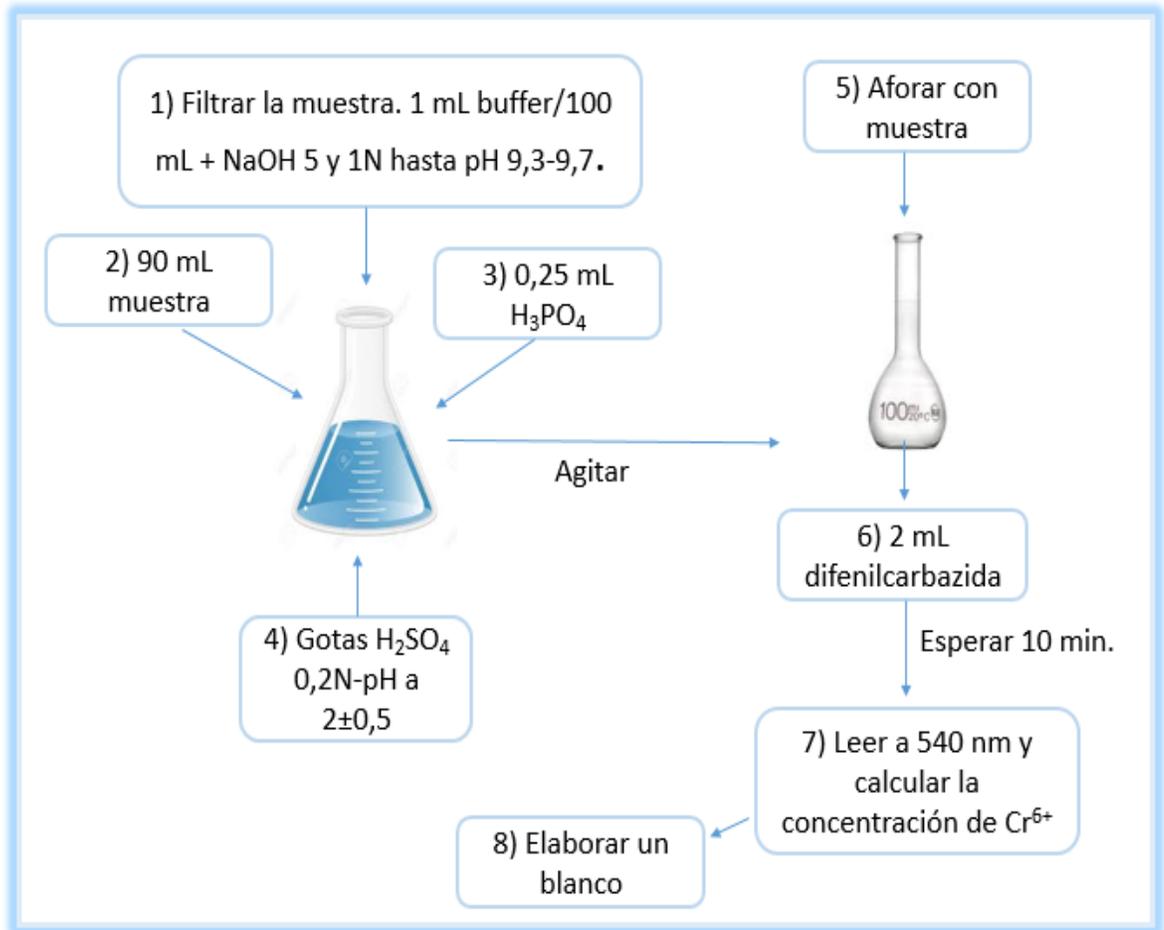


Figura 4: Diagrama de flujo para la determinación de Cr en muestras de agua

ANEXO 8

Esquema para la determinación de aluminio en muestras de agua potable.

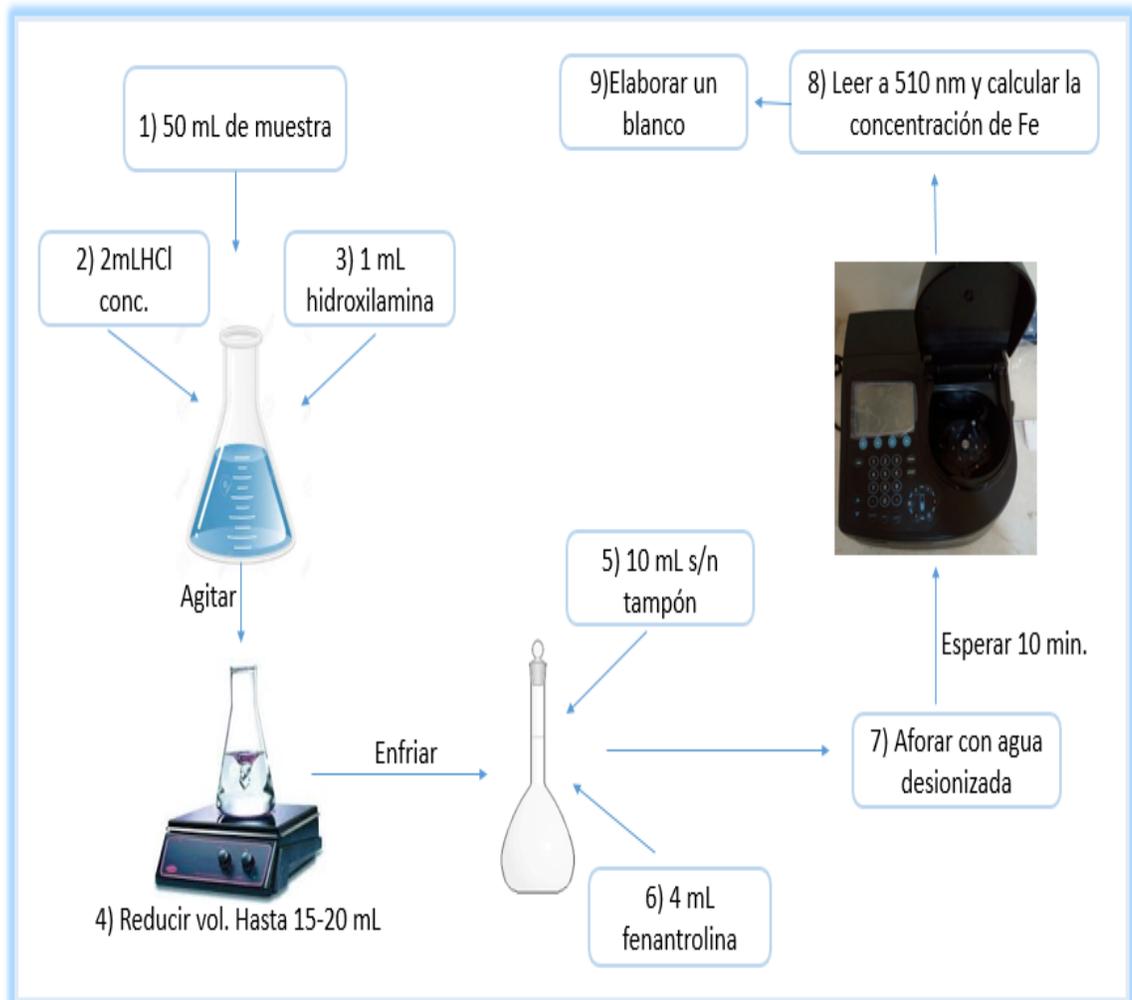


Figura 5: Diagrama de flujo para la determinación de Fe en muestras de agua

ANEXO 9

Esquema para la determinación de aluminio en muestras de agua residual, superficial y potable.

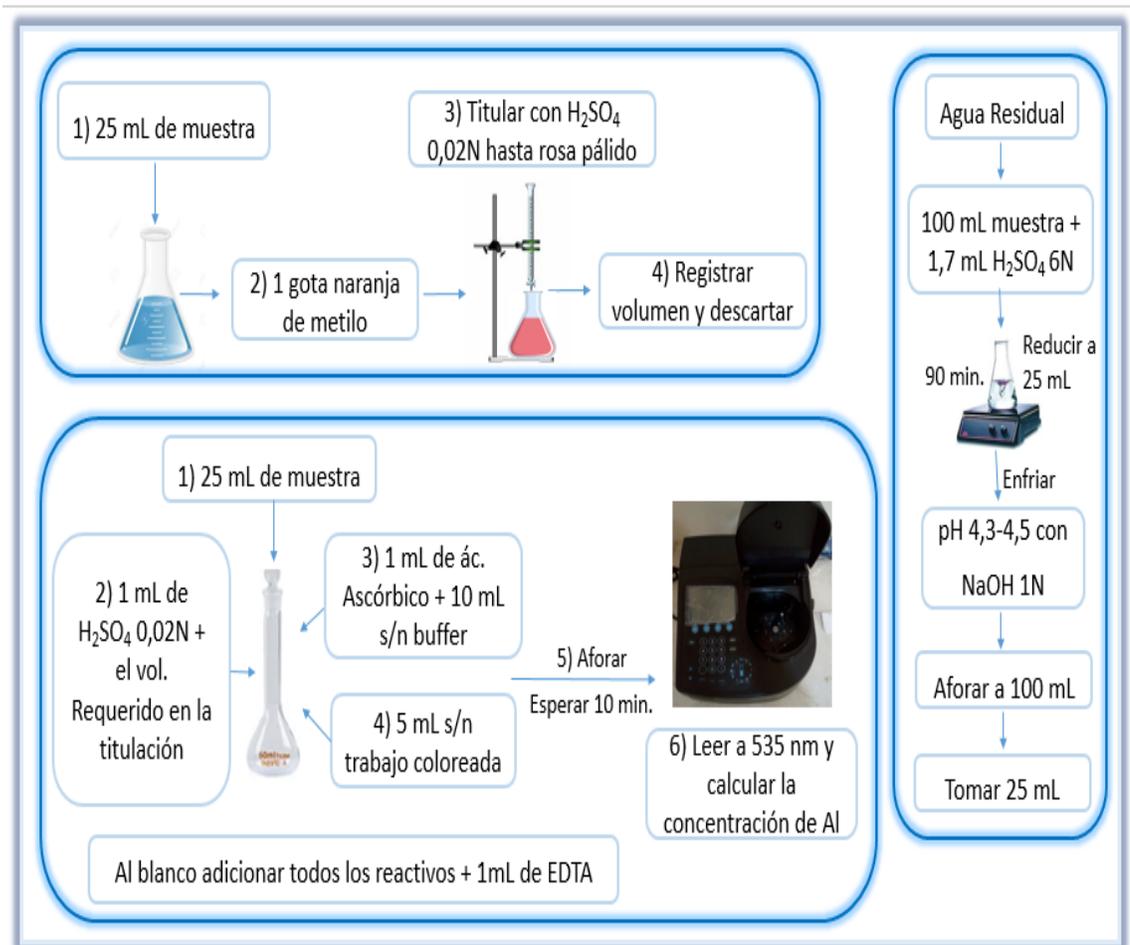


Figura 6: Diagrama de flujo para la determinación de Al en muestras de agua

ANEXO 10

Gráficas representativas de las curvas de calibración para evaluar la linealidad instrumental de los métodos

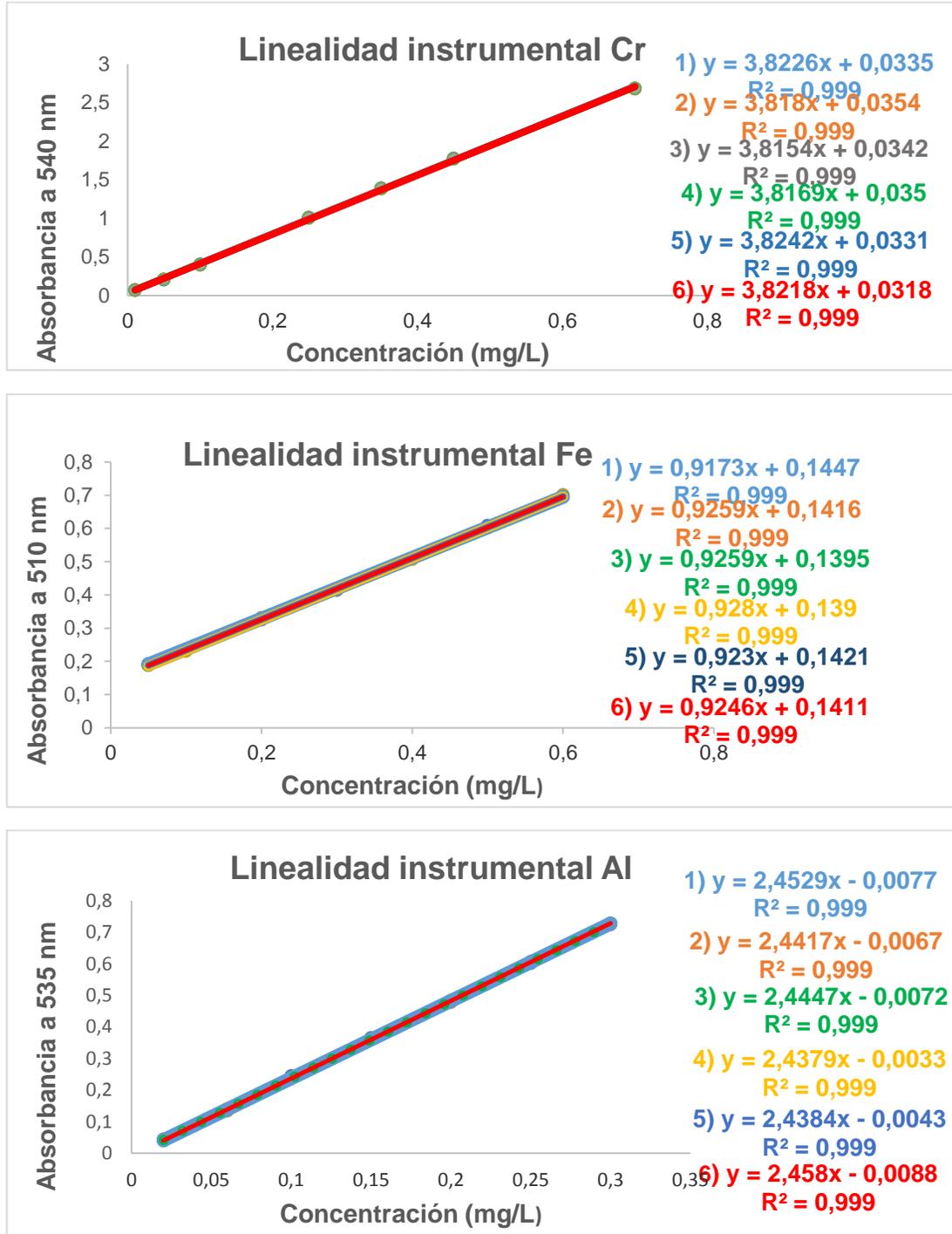


Figura 7: Curvas de calibración para evaluar la linealidad instrumental de Cr, Fe y Al

ANEXO 11

Gráficas representativas de las curvas de calibración para la evaluación de la linealidad de la metodología en las determinaciones de Cr, Fe y Al.

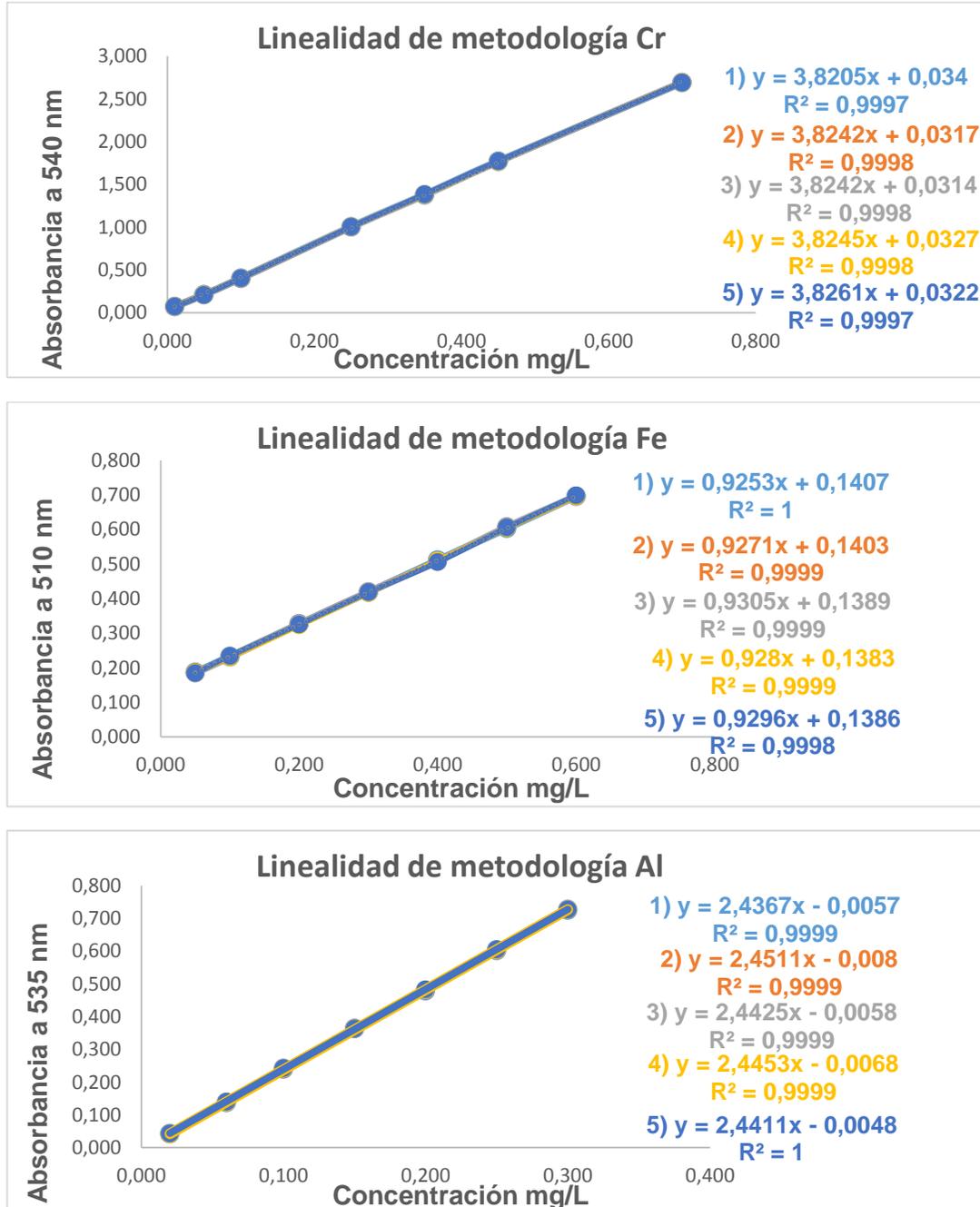


Figura 8: Curvas de calibración para evaluar la linealidad instrumental de la metodología para Cr, Fe y Al