

**IMPLEMENTACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA  
LA DETERMINACIÓN DE ORTOFOSFATOS, SULFATOS Y DBO<sub>5</sub> EN MUESTRAS  
DE AGUA SUPERFICIAL Y RESIDUAL PARA EL LABORATORIO DE ANÁLISIS  
DE AGUAS AMBILAB S.A.S DE LA CIUDAD DE PITALITO-HUILA**

**JUAN PABLO MOLINA ESCALANTE**



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

**2018**

**IMPLEMENTACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA  
LA DETERMINACIÓN DE ORTOFOSFATOS, SULFATOS Y DBO<sub>5</sub> EN MUESTRAS  
DE AGUA SUPERFICIAL Y RESIDUAL PARA EL LABORATORIO DE ANÁLISIS  
DE AGUAS AMBIENTALES S.A.S DE LA CIUDAD DE PITALITO-HUILA**

**JUAN PABLO MOLINA ESCALANTE**

**Trabajo de grado, requisito Académico para optar el título Químico**



**Director:**

**Dr. GERMÁN CUERVO OCHOA**

**PROFESOR TITULAR**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

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

**POPAYÁN, CAUCA**

**2018**

Nota de aceptación

---

---

---

---

---

Director \_\_\_\_\_

Ph.D. German Cuervo Ochoa

Jurado \_\_\_\_\_

Ph.D. Fernando José Hernández Vélez

Jurado \_\_\_\_\_

Ph.D. Rodrigo Andrés Sarria Villa

Popayán, 22 de febrero de 2019

## Dedicatoria

Dedicado a mi familia y amigos que han apoyado todo este proceso de aprendizaje, a Samuel por ser el motor que mueve mi vida.

## **Agradecimientos**

Ha sido un largo camino, en donde he conocido y compartido con innumerables personas que han colaborado en este proceso de formación excepcional.

Inicialmente agradezco a mi familia, por siempre estar presente y apoyar este objetivo de vida que no termina, es solo un escalón en el largo sendero del aprendizaje y de la comprensión de los fenómenos naturales y de las leyes que rigen el comportamiento del universo.

Agradezco profundamente a mi alma mater por ser el epicentro de todas estas vivencias y a todos los maestros del departamento de química por formarme e instruirme en el maravilloso mundo de la ciencia, además de apoyarme y confiar en la exitosa culminación de esta etapa.

Un especial sentimiento de alegría invade el ser al recordar a todos los compañeros que han compartido anécdotas durante estos últimos años, los cuales no serán enlistados pero que saben que las acciones son más importantes que las palabras y que siempre tendrán un lugar en mi mente.

Agradezco al laboratorio Ambilab S.A.S y al Ing. Oscar y flia por haber apoyado este proyecto y abrir las puertas de su casa y de su empresa para dar vía libre a los objetivos desarrollados.

Por ultimo cito al gran Carl Sagan para expresar parte de las emociones encontradas: “La ciencia es más que solo conocimiento. Es una manera de pensar, una manera de interrogar escépticamente el universo”.

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos para estandarización de métodos.....	15
Tabla 2. Equipos para estandarización de métodos.....	17
Tabla 3. Actividades para estandarización de método SM 4500 P, D y SM 4500 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , E.....	19
Tabla 4. Actividades para estandarización del método SM 5210 B.....	19
Tabla 5. Patrones para la curva de calibración del método SM 4500 P, D.....	23
Tabla 6. Definición de patrones de control para estandarización de método SM 4500 P, D.....	24
Tabla 7. Preparación de muestras adicionadas con analito para estandarización de método SM 4500 P, D.....	25
Tabla 8. Patrones para la curva de calibración del método SM 4500 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , E.....	26
Tabla 9. Patrones de control para el método SM 4500 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , E.....	27
Tabla 10. Volúmenes de patrón para fortificar las muestras superficiales y residuales.....	28
Tabla 11. Rango de volúmenes de muestra a sembrar de acuerdo con el tipo de muestras, para el método SM 5210 B.....	30
Tabla 12. Resultados para la curva de calibración del método SM 4500 P, D.....	33
Tabla 13. Parámetros estadísticos para la curva de calibración del método SM 4500 P, D.....	34
Tabla 14. Resultados en mg P-PO <sub>4</sub> /L para blancos y patrones con concentración equivalente al límite de cuantificación del método SM 4500 P, D.....	35
Tabla 15. Resultados de G para el contraste de Grubbs de datos sospechosos en blancos y LCM para el método SM 4500 P, D.....	36
Tabla 16. Magnitudes estadísticas obtenidas para los blancos y los límites de cuantificación del método SM 4500 P, D.....	37

Tabla 17. Resultados en mg P-PO <sub>4</sub> /L para patrones, muestras y muestras adicionadas del método SM 4500 P, D.....	37
Tabla 18. Resultados de G para el contraste de Grubbs de datos sospechosos, para un nivel de confianza del 95 % la G crítica para n=12 es 2,285.....	38
Tabla 19. Magnitudes estadísticas obtenidas para los patrones, muestras y muestras adicionadas del método SM 4500 P, D.....	39
Tabla 20. Resultados por analista para los rangos bajos, el F teórico para una prueba de una cola es F <sub>9,2</sub> = 19,38.....	40
Tabla 21. Resultados por analista para los rangos medios, el F teórico para una prueba de una cola es F <sub>8,2</sub> = 19,37.....	41
Tabla 22. Resultados por analista para los rangos altos, el F teórico para una prueba de una cola es F <sub>9,2</sub> = 19,38.....	41
Tabla 23. Resultados por analista para las muestras superficiales, el F teórico para una prueba de una cola es F <sub>9,2</sub> = 19,38.....	42
Tabla 24. Resultados por analista para las muestras residuales, el F teórico para una prueba de una cola es F <sub>9,2</sub> = 19,38.....	42
Tabla 25. Resultados por analista para las muestras superficiales adicionadas con el patrón de rango alto, el F teórico para una prueba de una cola es F <sub>9,2</sub> = 19,38.....	43
Tabla 26. Resultados por analista para las muestras residuales adicionadas con el patrón de rango bajo, el F teórico para una prueba de una cola es F <sub>9,2</sub> = 19,38.....	43
Tabla 27. Incertidumbres estándar relativas para los resultados obtenidos con los patrones de rango bajo RB.....	44
Tabla 28. Incertidumbres estándar relativas para los resultados obtenidos con los patrones de rango alto RA.....	46
Tabla 29. Resultados para la curva de calibración del método SM 4500 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , E.....	47
Tabla 30. Parámetros estadísticos para la curva de calibración del método SM 4500 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , E.....	48

Tabla 31. Resultados en mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L para blancos y patrones con concentración equivalente al límite de cuantificación del método SM 4500 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , E.....	49
Tabla 32. Resultados de G para el contraste de Grubbs de datos sospechosos en blancos y LCM, para un nivel de confianza del 95 % la G crítica para n=6 es 1,88.....	49
Tabla 33. Magnitudes estadísticas obtenidas para los blancos y los límites de cuantificación del método SM 4500 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , E.....	50
Tabla 34. Resultados en mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L para patrones, muestras y muestras adicionadas del método SM 4500 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , E.....	50
Tabla 35. Resultados de G para el contraste de Grubbs de datos sospechosos, para un nivel de confianza del 95 % la G crítica para n=12 es 2,285.....	51
Tabla 36. Magnitudes estadísticas obtenidas para los patrones, muestras y muestras adicionadas del método SM 4500 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , E.....	52
Tabla 37. Resultados por analista para los rangos bajos, el F teórico para una prueba de una cola es F <sub>9,2</sub> = 19,38.....	53
Tabla 38. Resultados por analista para los rangos medios, el F teórico para una prueba de una cola es F <sub>9,2</sub> = 19,38.....	53
Tabla 39. Resultados por analista para los rangos altos, el F teórico para una prueba de una cola es F <sub>9,2</sub> = 19,38.....	53
Tabla 40. Resultados por analista para las muestras superficiales, el F teórico para una prueba de una cola es F <sub>9,2</sub> = 19,38.....	54
Tabla 41. Resultados por analista para las muestras residuales, el F teórico para una prueba de una cola es F <sub>9,2</sub> = 19,38.....	54
Tabla 42. Resultados por analista para las muestras superficiales adicionadas con el patrón de rango alto, el F teórico para una prueba de una cola es F <sub>9,2</sub> = 19,38.....	54
Tabla 43. Resultados por analista para las muestras residuales adicionadas con el patrón de rango bajo, el F teórico para una prueba de una cola es F <sub>9,2</sub> = 19,38.....	55
Tabla 44. Incertidumbres estándar relativas para los resultados obtenidos con los patrones de rango bajo RB.....	56



Tabla 45. Incertidumbres estándar relativas para los resultados obtenidos con los patrones de rango alto RA.....	57
Tabla 46. Blancos de inóculo sembrados por cada analista, variando la cantidad de agua de semilla para evaluar el consumo, desempeño y toxicidad de la cepa seleccionada.....	59
Tabla 47. Resultados en mg O <sub>2</sub> /L para blancos del método SM 5210 B.....	60
Tabla 48. Resultados de G para el contraste de Grubbs de datos sospechosos en blancos, para un nivel de confianza del 95 % la G crítica para n=12 es 2,29.....	61
Tabla 49. Magnitudes estadísticas obtenidas para los blancos del método SM 5210 B.....	62
Tabla 50. Resultados en mg O <sub>2</sub> /L para patrones de control y muestras del método SM 5210 B.....	62
Tabla 51. Resultados de G para patrones de control y muestras, para un nivel de confianza del 95 % la G crítica para n=12 es 2,285.....	63
Tabla 52. Magnitudes estadísticas obtenidas para los patrones de control y las muestras del método SM 5210 B.....	65
Tabla 53. Incertidumbres estándar relativas para los resultados obtenidos con los límites de cuantificación del método SM 5210 B.....	66
Tabla 54. Incertidumbres estándar relativas para los resultados obtenidos con los patrones de control P200 del método SM 5210 B.....	67

## LISTADO DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva de calibración para la implementación del método SM 4500 P, D.....	34
Gráfica 2. Diagrama de fuentes de incertidumbre consideradas en la determinación del fósforo reactivo soluble.....	44
Gráfica 3. Curva de calibración resultante para el método SM 4500 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , E.....	47
Gráfica 4. Diagrama de fuentes de incertidumbre consideradas en la determinación de sulfatos.....	55
Gráfica 5. Representación gráfica del consumo de oxígeno en función del volumen de inóculo utilizado por el analista 1.....	59
Gráfica 6. Representación gráfica del consumo de oxígeno en función del volumen de inóculo utilizado por el analista 2.....	60
Gráfica 7. Diagrama de fuentes de incertidumbre consideradas en la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno.....	65

## TABLA DE CONTENIDO

1.	RESUMEN.....	1
2.	PROBLEMA CIENTÍFICO.....	2
3.	MARCO TEÓRICO .....	3
3.1.	INTRODUCCIÓN .....	3
3.2.	RECURSO HÍDRICO.....	5
3.3.	LABORATORIO AMBILAB S.A.S .....	7
3.4.	ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	7
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	9
3.6.	DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE.....	12
4.	OBJETIVO GENERAL.....	14
5.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
6.	METODOLOGÍAS.....	15
7.	RESULTADOS .....	33
7.1.	FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE .....	34
7.2.	SULFATOS .....	37
7.3.	DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO.....	40
8.	CONCLUSIONES .....	69
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	70
	ANEXOS .....	72

## 1. RESUMEN

El presente trabajo recopila los resultados del proceso de estandarización de tres diferentes métodos analíticos para análisis fisicoquímico en muestras de agua superficial y residual (fosfatos como fósforo reactivo soluble, sulfatos y demanda bioquímica de oxígeno). El proceso analítico se desarrolló de forma que cumpliera los lineamientos para el aseguramiento de la calidad de los métodos de ensayo establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2005.

Los métodos analíticos fueron seleccionados de acuerdo con las necesidades y alcance del laboratorio ambiental AMBILAB S.A.S de la ciudad de Pitalito-Huila, entidad privada especializada en el monitoreo, análisis fisicoquímico y microbiológico de cuerpos de agua y asesoramiento en procesos productivos agrícolas de entidades públicas y privadas de la región.

Para el objetivo de la verificación de los métodos analíticos establecidos, se seleccionaron métodos normalizados del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012), esto con el fin de contar con información suficiente que permitiera tener un panorama claro de la calidad de los resultados. De acuerdo con esto se seleccionaron los métodos analíticos a implementar: SM 4500 P, D. SM 4500  $\text{SO}_4^{2-}$ , E y SM 5210 B-ASTM D888-12&1-C, respectivamente para los análisis de fósforo reactivo soluble, sulfatos y  $\text{DBO}_5$ . Además para complementar los requerimientos de la norma se desarrolló para cada método, un procedimiento de análisis y un plan de confirmación con el fin de que cualquier analista sea capaz de desarrollar la metodología implementada. Además se emitieron informes de resultados de las confirmaciones analíticas, donde se destaca la estimación y cumplimiento de los parámetros estadísticos de aceptabilidad para los citados procedimientos analíticos. Entre estos están el cálculo de la precisión en términos del porcentaje del coeficiente de variación de los resultados; la exactitud en forma de error relativo y la estimación de la incertidumbre del procedimiento.

Palabras clave: estandarización, incertidumbre, método analítico, fósforo, sulfatos,  $\text{DBO}_5$ .

## 2. PROBLEMA CIENTÍFICO

La importancia del agua para las diferentes actividades antropogénicas (consumo humano, agricultura, alimentación animal), genera la necesidad de contar con procedimientos analíticos para la cuantificación de sustancias presentes en el agua, además se hace indispensable garantizar la confiabilidad de esos resultados. Debido a que el sur del departamento del Huila desarrolla importantes actividades agrícolas, resulta fundamental hacer un seguimiento a los niveles de sustancias usadas regularmente como fertilizantes entre los que se encuentran el fósforo y sulfatos, los cuales son necesarios para las prácticas agrícolas pero que debido al desconocimiento y a la falta de políticas amigables con el medio ambiente son muy difíciles de controlar y terminan generalmente disueltas en las aguas de escorrentía las cuales se vierten sin control en ríos y demás, afectando notablemente los ecosistemas en donde estas sustancias se concentran, generando desbalances tales como los procesos de eutrofización de cuerpos de agua. Otro aspecto importante son las aguas residuales resultantes de diferentes procesos como el uso residencial e industrial, las cuales se vierten muchas veces sin control en los diferentes afluentes llevando a una progresiva acumulación de sustancias contaminantes.

Estas aguas generalmente presentan altas concentraciones de materia orgánica. Debido a esto y a la alta demanda se hizo necesaria la implementación del método para la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno ( $DBO_5$ ).

El laboratorio de la empresa Ambilab SAS de la ciudad de Pitalito-Huila al encontrarse en proceso de acreditación y al no contar con metodologías analíticas implementadas para los métodos propuestos en el presente documento, se propuso de forma colaborativa disponer las instalaciones para permitir ejecutar el proceso de estandarización de los métodos descritos, ya que cuenta con todo el instrumental e inventario de sustancias químicas necesarias para el desarrollo analítico, se procedió al desarrollo e implementación de metodologías estándar de análisis fisicoquímico para lograr el objetivo de afianzar la empresa como una fuente de desarrollo y emprendimiento en el suroccidente colombiano.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. INTRODUCCIÓN**

El fósforo es una especie inorgánica presente en concentraciones considerables en las aguas superficiales y residuales, este elemento se encuentra en diversas formas químicas, entre estas se encuentran principalmente los ortofosfatos los cuales son generalmente la especie más abundante, además se encuentran especies de polifosfatos y el fósforo presente en moléculas orgánicas.

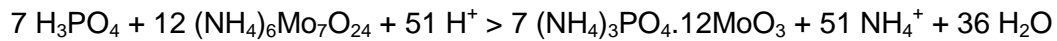
El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de organismos inferiores y superiores, estas formas de fosfatos son ampliamente utilizados en productos de limpieza y en fertilizantes por la industria de la agricultura, lo cual conlleva a serios problemas ambientales por el uso irracional y abusivo de dichos productos, a raíz de esto se genera la acumulación de estas especies en los cuerpos de agua donde generalmente empiezan a ser transformados a través de procesos biológicos por ciertos micro y macro organismos fotosintéticos.

Los métodos de análisis de fósforo son colorimétricos y se cuantifican en función de la concentración de ortofosfatos; debido al variado número de formas en que se encuentra el fósforo es importante definir la fracción a analizar.

El fósforo que responde directamente al análisis colorimétrico se denomina “fósforo reactivo” y se compone de los ortofosfatos presentes en la muestra y pequeñas cantidades de fosfatos condensados que son hidrolizados durante el análisis.

La filtración a través de una membrana con un diámetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  separa la fracción disuelta de las formas suspendidas de fósforo. De esta forma se seleccionó para el proceso de estandarización la fracción disuelta del fósforo reactivo o fósforo reactivo soluble, compuesta por los ortofosfatos disueltos presentes en la muestra después de someterse al proceso de filtración.

La selección del método colorimétrico se basó en las necesidades del laboratorio para dar cumplimiento a sus objetivos de calidad y a las necesidades de los análisis de rutina, además de la disponibilidad de materiales y reactivos en el laboratorio AMBILAB S.A.S, de acuerdo con esto se seleccionó el método del cloruro estañoso (SM 4500 P,D); en este los ortofosfatos presentes en la muestra reaccionan con el molibdato de amonio en medio ácido para producir el ácido 12-fosfomolibdico según la reacción:



Este es reducido por el cloruro estañoso a azul de molibdeno, el cual es un compuesto de composición desconocida debido a su rápida descomposición, el cual presenta una fuerte absorción a una longitud de onda de 690 nm. (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012).

Los sulfatos son aniones inorgánicos ampliamente distribuidos en la naturaleza, además se encuentran presentes en las aguas naturales en un amplio rango de concentraciones. Se producen naturalmente por la oxidación de minerales azufrados como la piritita y a través de meteorización y oxidación de minerales del suelo. (Valente, Grande, de la Torre, Santisteban & Cerón, 2013)

La determinación se realiza por medio de un método turbidimétrico, en este el ion sulfato es precipitado en un medio de ácido acético, con cristales de cloruro de bario de tamaño homogéneo. Los cristales de  $\text{BaSO}_4$  generan una turbiedad homogénea que depende de la concentración de ion sulfato. Es importante regular los tiempos de lectura debido a la estabilidad de los cristales formados, esto afecta directamente la medida de la turbiedad. El color y la materia orgánica afectan notablemente las mediciones, es necesaria su remoción por filtración a través de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012).

La determinación de la demanda bioquímica de oxígeno es un procedimiento para establecer los requerimientos relativos de oxígeno en aguas residuales, efluentes y aguas contaminadas. El procedimiento tiene su uso práctico, en la medición de las cargas contaminantes por materia orgánica en los vertimientos de aguas residuales y en aguas superficiales contaminadas, además para medir la carga contaminante a la entrada de sistemas de tratamiento y la eficiencia en la eliminación de residuos en dichos sistemas de tratamiento.

El proceso mide el oxígeno molecular empleado durante un periodo de incubación específico para la biodegradación de la materia orgánica, además de ciertos compuestos inorgánicos como sulfuros y hierro ferroso.

El método implementado consiste en incubar una muestra diluida en agua con nutrientes específicos y un inóculo seleccionado como fuente de bacterias, en una botella de

dimensiones estándar por un tiempo y a una temperatura específicas. El oxígeno disuelto inicial es medido posteriormente a la dilución de la muestra en la botella Winkler y al finalizar el periodo de incubación de 5 días, esto se hace con un electrodo de luminiscencia. (ASTM, D888-12e1, 2012). La DBO se estima a partir de la diferencia entre el oxígeno disuelto al iniciar y al finalizar la incubación. (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012).

### **3.2. RECURSO HÍDRICO**

El agua es la sustancia más abundante en la corteza terrestre con cerca del 70 %, además es el componente principal de los organismos vivos. El agua permite el desarrollo de todas las reacciones químicas y bioquímicas necesarias para sustentar la vida.

El acceso a agua potable es un derecho fundamental de la humanidad reconocido oficialmente por la asamblea general de las naciones unidas mediante la resolución 64/292 del 28 de julio del 2010 ("United Nations Official Document", 2010), de acuerdo con esta idea surge la necesidad de conocer las características fisicoquímicas y microbiológicas de las aguas superficiales, que corresponden a las que fluyen libremente sobre la superficie de la tierra; utilizadas para consumo humano así como también para la agricultura y la ganadería. Además se extiende a las aguas residuales domésticas y no domésticas, definidas como las aguas que quedan después del uso de estas, dependiendo su uso se define su naturaleza, las aguas residuales domesticas provienen del uso en lavamanos, tinas de baño, duchas, lavaplatos, descargas de retretes y otros artefactos de uso habitual en lugares residenciales. Las aguas residuales no domesticas corresponden a las provenientes de actividades industriales, comerciales o de servicios distintos a los de las aguas residuales domésticas ("Tesouro Ambiental para Colombia", 2018).

Para evaluar una muestra de agua es necesario hacerlo de acuerdo con parámetros físicos, químicos y biológicos, el agua no se encuentra 100 % pura en estado natural. Ya sea por factores antropogénicos o naturales, lo cual hace indispensable el conocimiento de esta información para brindar una recomendación acertada sobre la calidad de un afluente.

La resolución 2115 del 22 de junio del 2007 señala características, aspectos de calidad y los máximos niveles permisibles de sustancias que afectan la potabilidad del agua destinada a consumo humano. La resolución 0631 del 17 de marzo de 2015 (Ministerio de



ambiente y desarrollo sostenible, 2015) regula los parámetros y los valores límites permisibles de los vertimientos de aguas residuales a cuerpos de agua superficiales.

Para el desarrollo analítico se seleccionaron los métodos para la determinación de fósforo reactivo soluble, sulfatos y la demanda bioquímica de oxígeno (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012).

Se desarrollaron estas tres metodologías debido a, primero: El uso extendido de fosfatos en diversos productos como: detergentes, jabones, fertilizantes de uso agrícola, campo en el cual se encuentran también los sulfatos y segundo, respecto a la DBO, ya que su uso como indicador para determinar el grado de contaminación por sustancias orgánicas en los cuerpos de agua es de gran ayuda en el campo ambiental. Estos ítems de ensayo producen un grado de deterioro relacionado directamente con su concentración.

El fósforo se encuentra en aguas superficiales y residuales en forma de fosfatos, estos se clasifican en ortofosfatos, fosfatos condensados (piro, meta y otros polifosfatos) y especies ligadas a moléculas orgánicas, los ortofosfatos provienen principalmente del uso extendido de fertilizantes y detergentes. Es importante controlar la concentración de esta especie debido a la posibilidad de producir la eutrofización de los cuerpos de agua en los cuales son vertidos.

Los sulfatos son iones ampliamente difundidos en la naturaleza, provienen del drenado de agua a través de depósitos minerales ricos en sulfatos o por oxidación de otros como la pirita, además se utilizan ampliamente en fertilizantes. Sus concentraciones son muy variables, desde muy bajas cantidades a varios miles de miligramos por litro. El consumo de altas cantidades de sulfatos puede generar molestias intestinales como diarrea y deshidratación.

La demanda bioquímica de oxígeno es una medida empírica de la carga orgánica presente en una muestra de agua, es usada principalmente para determinar la carga residual en plantas de tratamiento de agua. El método consiste en determinar el consumo de oxígeno durante un periodo de incubación de 5 días, en el caso particular se seleccionó un periodo de 5 días por razones técnicas relacionadas con el desarrollo de la metodología como son evitar los procesos de nitrificación y evitar la acumulación de muestras sin analizar. La prueba mide el oxígeno utilizado para la degradación de la materia orgánica y ciertas especies fácilmente oxidables, durante dicho periodo de incubación. (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012).

### 3.3. LABORATORIO AMBILAB S.A.S

EL laboratorio AMBILAB S.A.S es una empresa creada en el sur del departamento del Huila, en el municipio de Pitalito, donde debido a sus características climáticas se presentan condiciones óptimas para el cultivo de diferentes productos de importante empuje para la economía de la región, como lo son el café, plátano y frijol.

Además cuenta con importantes fuentes hídricas, debido a su posición estratégica en el macizo colombiano. De acuerdo con esto surge la necesidad de una entidad privada con la capacidad de realizar observaciones objetivas acerca de la calidad del recurso hídrico de la región, así como también de las aguas residuales generadas en la misma zona.

Para tal fin la empresa implementa técnicas analíticas normalizadas con el fin de lograr acreditarlas bajo los requerimientos del sistema de gestión de calidad necesarios para cumplir los lineamientos de la norma ISO/IEC 17025:2005 (ICONTEC, 2005).

### 3.4. ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

De acuerdo con la información recolectada acerca de los procesos de estandarización de métodos analíticos, se planificó la estrategia a seguir para implementar y verificar los métodos analíticos seleccionados. Parte fundamental es adecuar el procedimiento del método a las condiciones del laboratorio, donde se dan a conocer todas las características, materiales a usar, reactivos necesarios y metodología a desarrollar para la correcta reproducción del método.

Se estableció la señal del límite de detección así:

$$LDM = 2 \times t \times s \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde t es la t de Student para el numero de grados de libertad y s es la desviación estándar de la señal de los blancos, además la señal del límite de cuantificación estadístico, como diez veces la desviación estándar de la señal correspondiente a los blancos (Currie, 1995).

$$LCM = 10 \times s \text{ (blancos)} \quad (\text{Ecuación 2})$$

De tal forma que se lograra distinguirlo correctamente de la señal producida por los blancos.

Adicionalmente después de establecer la curva de calibración de los métodos que así lo requieren se procedió a verificarlo de forma analítica, esto preparando series de 12 patrones de concentración equivalente los cuales para ser aceptados deben cumplir con los atributos estadísticos establecidos para la verificación de la precisión y la exactitud de los resultados. En caso de no lograrse una buena reproducibilidad de los resultados, se debía fijar un nuevo límite con concentración más alta y proceder a verificar de forma analítica los resultados obtenidos después de elaborar una nueva curva de calibración.

Para los métodos espectrofotométricos y turbidímetricos se plantea la elaboración de una curva de calibración, elemento fundamental para la interpolación de los resultados a obtener y posterior cuantificación de los resultados, la preparación de esta se planteó con mínimo 5 puntos preparados con concentraciones ascendentes de analito, esta resultante del promedio de 6 series de patrones, con el fin de lograr la máxima repetibilidad y reproducibilidad. Se establece como aceptable una curva de calibración, si su coeficiente de correlación de Pearson  $r^2$  es mayor a 0,995, ya que esto muestra que alrededor del 99,5 % de la variación de los resultados es explicada por el modelo de regresión lineal y se ajusta a la ley de Beer. (Skoog, West, Holler, Crouch & Mora Lugo, 2014).

En el proceso de estandarización de los métodos, para la determinación de fósforo reactivo soluble y sulfatos, después de establecer un rango de trabajo y una curva de calibración correspondiente a dicho rango, se procedió a realizar la evaluación de los atributos estadísticos con series de patrones con concentraciones distribuidas en todo el rango de trabajo, para evaluar la precisión y la exactitud del método.

De forma paralela se analizaron muestras crudas de tipo superficial y residual (MS y MR) para evaluar los efectos producidos por matrices reales en el desempeño y repetibilidad de los métodos seleccionados. Este grupo de muestras permite evaluar la precisión y la repetibilidad del método.

Adicionalmente se analizaron series de muestras fortificadas con el analito en concentraciones equivalentes a los patrones seleccionados para la evaluación de los rangos de trabajo de los métodos, esto con el fin de evaluar la interferencia producida por una matriz compleja como lo es una muestra de agua cruda y de esta manera calcular el porcentaje de recuperación del analito en la matriz, para de esta forma estimar indirectamente la exactitud y la precisión del método.

La estandarización del método para la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno difiere de los anteriores, en el hecho de que éste no requiere la elaboración de curva de calibración, esto debido a que la medida de oxígeno, al hacerse de forma electrométrica, permite obtener el valor de forma directa y de esta manera calcular la DBO de acuerdo con la dilución seleccionada. Además para este método no es necesario el análisis de muestras fortificadas con analito, de esta manera para la confirmación se analizaron series de patrones y muestras crudas distribuidas en la mayor cantidad de días posible siempre y cuando se cumplan con las condiciones de almacenamiento y preservación de las muestras. (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012).

Adicionalmente se analizaron muestras interlaboratorios certificadas para cada parámetro para darle validez al proceso analítico realizado. En la etapa de estandarización correspondiente a cada método se hablara en detalle acerca de las metodologías seguidas y la distribución de las muestras y patrones analizados durante el proceso.

### **3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson, además la desviación estándar y el límite de confianza al 95 % de la pendiente y del intercepto con el eje Y a la curva de calibración promedio obtenida para cada método para verificar la correlación entre las variables aleatorias y determinar el cumplimiento de la ley de Beer-Lambert. Además para cada conjunto de datos obtenidos en la estandarización de los tres métodos propuestos, se calculó el promedio ( $\bar{X}$ ), la desviación estándar (s), el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) y el error relativo de las mediciones incluyendo patrones, muestras y muestras adicionadas. Esto permitió estimar la precisión y la exactitud de los resultados; solo se midió el error a los patrones de concentración conocida. Además, se estableció el porcentaje de recuperación del analito en las muestras fortificadas para los métodos de fósforo reactivo soluble y sulfatos (Skoog, West, Holler, Crouch & Mora Lugo, 2014). Se verificó la presencia de datos anómalos atribuibles a errores aleatorios no controlados o a errores sistemáticos los cuales pueden afectar la calidad de los atributos estadísticos aplicando una prueba de contraste de Grubbs (Miller, Miller, Maté Jiménez & Izquierdo Hornillos, 2008).

Los resultados obtenidos por debajo del límite de detección deben considerarse con precaución, pues la concentración es tan baja que la señal no puede ser diferenciada del

ruido instrumental intrínseco en el desarrollo de las metodologías. Sin embargo en caso de presentarse el caso, es aceptable utilizar como valor aproximado de concentración el límite crítico del método, equivalente a la mitad del límite de detección, esto con el propósito de lograr realizar la estadística necesaria para determinar los atributos de los métodos analíticos implementados (Currie, 1995).

Los resultados obtenidos que se encuentran por debajo del límite de cuantificación, pero por encima del límite de detección de cada método, a pesar de que no es confiable la determinación analítica, si están siendo detectados. Por lo tanto, para los cálculos analíticos debe usarse el valor obtenido después de aplicar el método, teniendo en consideración el sesgo que puede presentarse en los resultados.

La repetibilidad se estableció mediante los resultados de esta etapa del análisis estadístico, se agruparon los datos en una racha debido a que fueron realizados en cortos periodos de tiempo, teniendo en cuenta que el propósito de la estandarización es lograr establecer un protocolo que cumpla con los requerimientos de la norma ISO/IEC 17025:2005.

La reproducibilidad se evaluó al realizar un análisis de las varianzas de un factor y se compararon mediante una prueba de contraste F de una cola con un nivel de confianza de  $P=0,05$ ; en donde se considera que los resultados se comportan de manera normal, esto con el propósito de verificar la hipótesis nula  $H_0$ : La varianza de los resultados obtenidos por analistas no es significativamente superior de la varianza obtenida por los resultados entre analistas. Este procedimiento se aplicó a la determinación de fósforo reactivo soluble y sulfatos, ya que fueron los métodos implementados entre 3 analistas.

Por último, se realizó una estimación de la incertidumbre a partir de los componentes individuales que aportan a la incertidumbre de la medida de forma aleatoria, siguiendo la guía Eurachem (Ellison & Williams, 2012).

Con la información obtenida mediante este análisis, se procedió a emitir un informe del proceso para cada método, destacando los atributos estadísticos obtenidos y el cumplimiento de estos.

Se establecieron los criterios de aceptabilidad para los resultados obtenidos en los procesos de confirmación, la finalidad de estos criterios es evaluar los atributos estadísticos relacionados con la precisión y la exactitud de cada grupo de muestras. La precisión se estimó determinando el porcentaje del coeficiente de variación de las

muestras, para esto inicialmente se determinó el promedio y la desviación estándar de cada grupo de muestras así:

Para el cálculo del promedio:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{x=1}^n X}{n} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde  $\bar{x}$  es el promedio de un conjunto de datos, calculado como la sumatoria de los datos que componen cada grupo de muestras, dividido entre el número de muestras analizadas para cada grupo.

La desviación estándar se calculó así:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{x=1}^n (X_i - X_m)^2}{n-1}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde  $X_i$  corresponde al valor individual de cada dato en cada grupo de muestras y  $X_m$  corresponde al valor promedio para ese grupo de muestras. La expresión  $n-1$  se refiere a los grados de libertad del conjunto de muestras.

Con estos datos se calculó el porcentaje del coeficiente de variación (% CV), así:

$$\% \text{ CV} = \frac{\text{Desviación estándar}}{|\text{promedio}|} \times 100 \% \quad (\text{Ecuación 5})$$

La estimación de la exactitud se realizó calculando el error relativo (% E) a los grupos de patrones, así:

$$\% \text{ E} = \frac{|X_p - X_v|}{X_v} \times 100 \% \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde  $X_p$  corresponde al valor promedio del grupo de patrones y  $X_v$  corresponde al valor real del patrón analizado.

Adicionalmente se realizó otra estimación de la exactitud para la determinación del fósforo reactivo soluble y sulfatos, mediante el cálculo del porcentaje de recuperación del analito en muestras fortificadas o adicionadas con el analito específico para cada método. Estos ensayos permiten analizar la especificidad del método por el analito en muestras reales con gran cantidad de interferencias presentes, se calculó así:

$$\% \text{ RECUPERACIÓN} = \frac{|X_A - X_m|}{X_v} \times 100 \% \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde  $X_A$  corresponde a la concentración promedio de analito de las muestras adicionadas con el analito y  $X_m$  corresponde a la concentración promedio de analito presente en las muestras, esto dividido entre la concentración de analito adicionado a las muestras para fortificarlas, denotado como  $X_v$ .

Los criterios de aceptabilidad para cada parámetro estadístico en los diferentes métodos analíticos implementados, fueron fijados por el laboratorio de acuerdo con las necesidades y al alcance del proceso de acreditación, la precisión y exactitud para los métodos fósforo reactivo soluble y sulfatos fueron fijadas en un 15 % en términos de porcentaje de coeficiente de variación y porcentaje de error relativo respectivamente; para la demanda bioquímica de oxígeno, los criterios de aceptabilidad para el error y la precisión se fijaron en un 20 %. El porcentaje de recuperación de analito aceptable para las muestras adicionadas en los métodos para la determinación del fósforo reactivo soluble y los sulfatos se fijó entre el 80 y el 120 %.

### **3.6. DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**

La incertidumbre es considerada: "Un parámetro asociado al resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando." ("Evaluation of measurement data-Guide to the expression of uncertainty in measurement", 2008).

El proceso de análisis proporciona una determinación del mensurando, generalmente se considera que dicho análisis es la mejor estimación, siempre y cuando se cumplan los criterios de aceptabilidad por parte de los resultados; las fuentes de incertidumbre provenientes de efectos aleatorios y sistemáticos aportan al grado de dispersión de los resultados (Hsu & Chen, 2010).

Para cada método analítico se evalúan las diferentes fuentes de incertidumbre que más afectan la reproducibilidad y la veracidad de los resultados, siguiendo la ley de propagación de la incertidumbre.

$$Y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_N) \quad (\text{Ecuación 8})$$

Cada fuente de incertidumbre se trata por separado y fue evaluada en forma de desviación estándar, la cual se denomina incertidumbre estándar relativa.

La incertidumbre total de cada método analítico se expresa como incertidumbre estándar combinada, la cual es una desviación estándar estimada como la raíz cuadrada de la varianza total obtenida por combinación de las incertidumbres estándar relativas de todas las fuentes de incertidumbre evaluadas:

$$U_c(Y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 U^2(x_i)} \quad (\text{Ecuación 9})$$

La forma final de representación de la incertidumbre se realiza en forma de incertidumbre expandida (U), la cual proporciona un intervalo en el que se considera que se encuentra el valor de la concentración del mensurando. La incertidumbre expandida se obtiene multiplicando la incertidumbre estándar combinada para las diferentes fuentes de incertidumbre por un factor de cobertura (K), que depende del nivel de confianza esperado para el método y esto por el valor de concentración real ( $X_V$ ) para el patrón con el que se evalúa la incertidumbre.

$$U = U_c \times K \times X_V \quad (\text{Ecuación 10})$$

Para realizar un análisis de las causas y el efecto, se realiza un diagrama de espina de pescado, en este se describen las fuentes de incertidumbre para los métodos implementados, para la estimación no se consideran todas las fuentes de incertidumbre.



#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Implementar y estandarizar a las condiciones del laboratorio Ambilab SAS las técnicas analíticas para la determinación de fosfatos como fósforo reactivo soluble (SM 4500 P, D), sulfatos (SM 4500  $\text{SO}_4^{2-}$ , E) y  $\text{DBO}_5$  (SM 5210, B-ASTM D888-12&1-C) en muestras de aguas superficiales y residuales.

#### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Verificar las metodologías seleccionadas para cada procedimiento a estandarizar cumpliendo todos los criterios de calidad y aceptabilidad descritos en la guía de estandarización de métodos analíticos del IDEAM (COY, 2006).

Establecer los parámetros analíticos de calidad para cada método a estandarizar, como son límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud, incertidumbre, linealidad, sensibilidad, intervalo de trabajo.

Documentar y recopilar la información obtenida en el sistema de gestión de calidad del laboratorio, para garantizar un correcto desempeño en el proceso de acreditación empresarial.

## 6. METODOLOGÍAS

### 6.1. REACTIVOS

Tabla 1. Reactivos para estandarización de métodos

REACTIVO	MARCA	USO*
Fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	PANREAC	P, D
Molibdato de amonio tetrahidratado ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	PANREAC	P
XÁcido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	SIGMA ALDRICH	P, D
Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ )	SIGMA ALDRICH	P
Ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ )	FISHER	P
Cloruro estañoso dihidratado ( $\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	PANREAC	P
Glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ )	PANREAC	P
Fenolftaleína	PANREAC	P
Sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	SIGMA ALDRICH	S
Cloruro de magnesio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	PANREAC	S
Acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )	PANREAC	S
Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )	PANREAC	S
Ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )	SIGMA ALDRICH	S
Cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ )	MERCK	S
Cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	PANREAC	D
Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	PANREAC	D
Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )	PANREAC	D
Cloruro férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	PANREAC	D
Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ )	SIGMA ALDRICH	D
Glucosa	PANREAC	D
Ácido glutámico	PANREAC	D

\*: P: Fósforo reactivo soluble, S: Sulfatos, D: Demanda bioquímica de oxígeno

## **FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE:**

Solución acuosa de fenolftaleína

Solución de ácido fuerte: Agitando se añadió 300 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado a 600 mL de agua desionizada, cuando enfrió, se adiciono 4 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado.

Reactivo de molibdato de amonio I: Se disolvieron 25 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  en 175 mL de agua desionizada. A parte y con cautela se añadieron 280 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado a 400 mL de agua desionizada, se dejó enfriar y después añadirle la solución de molibdato de amonio a esta, diluir a 1 L.

Reactivo de cloruro estañoso: Se disolvieron 2,5 g de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 100 mL de glicerol, se calentó en baño maría y agito con varilla de vidrio. Reactivo estable que no requiere almacenamiento especial

Solución estándar de potasio: Se disolvieron en agua desionizada 219,5 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhidro y diluyeron a 1 L, la concentración de la solución es de 50 mg P- $\text{PO}_4/\text{L}$ .

## **SULFATOS:**

Solución Buffer A: Se disolvieron 30 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 5 g de acetato de sodio, 1 g de  $\text{KNO}_3$  y 20 mL de ácido acético en 500 mL de agua desionizada, se aforó a un volumen de 1000 mL.

Solución estándar de sulfatos: Se disolvió en agua desionizada 0,1479 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se diluyo a 1 L, la concentración de la solución es de 100 mg  $\text{SO}_4/\text{L}$ .

## **DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO**

Solución Buffer fosfato: Se disolvieron 42,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1,7 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en cerca de 700 mL de agua, se ajustó el pH a 7,2 con  $\text{NaOH}$  al 30 %.

Solución de sulfato de magnesio: Se disolvieron 22,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en agua, se aforó a 1 L de solución.

Solución de cloruro de calcio: Se disolvieron 27,5 g de  $\text{CaCl}_2$  en agua, se aforó a 1 L de solución.

Solución de cloruro férrico: Se disolvieron 0,25 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en agua, se aforó a 1 L de solución.

Solución ácida 1 N: Se disolvieron 28 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado en agua, se aforó a 1 L de solución.

Solución básica 1 N: Se disolvieron 40 g de NaOH en agua, se aforó a 1 L de solución.

Solución de glucosa-ácido glutámico (P200): Se secaron los reactivos a 103 °C por 1 hora; se pesaron 150 mg de cada reactivo y se disolvieron en agua desionizada, se homogenizo y se aforó a 1 L de solución.

## 6.2. EQUIPOS

Tabla 2. Equipos para estandarización de métodos.

EQUIPO	MARCA	USO*
Campana de extracción de gases	E & Q	P, S
Espectrofotómetro	Thermo Aquamate 4500	P
Balanza Analítica	Radwag	P, S, D
Potenciómetro	Thermo	P, D
Bomba de vacío	Rocket	P, S
Transferpipeta de 10 mL	Boeco	P, S, D
Micropipeta de 1 mL	Brand	P, S, D
Cronómetro	Miyagi	P, S
Turbidímetro	Thermo Aquamate 4500	S
Agitador magnético	Schott	S, D
Oxímetro	Thermo	D
Incubadora DBO	Philips modificada	D
Bomba de oxigenación	N.A	D

\*: P: Fosforo reactivo soluble, S: Sulfatos, D: Demanda bioquímica de oxígeno

Los equipos para los cuales sus mediciones afectan significativamente los resultados se encuentran calibrados y verificados de acuerdo con un procedimiento de calibración externa y certificada, establecido por Ambilab SAS.

### **6.3. MATERIALES**

Matraces aforados de 100, 250, 500 y 1000 mL.

Vasos de precipitado de 25, 50, 100 y 250 mL.

Pipetas aforadas de 1, 5, 10, 15, 20 mL

Probetas de 50, 100 Y 250 mL

Puntas para transferpipeta de 10 mL

Puntas para micropipeta de 1 mL

Equipo de filtración

Filtros de acetato de celulosa, diámetro de poro 0,45 µm.

Cuchara de 0,3 mL

Botellas Winkler 300 mL.

Toda la vidriería usada fue nueva tipo A con certificado de calibración de fábrica vigente.

### **6.4. PLAN DE ESTANDARIACIÓN**

El proceso de estandarización para el fósforo reactivo soluble y los sulfatos se realizó entre 3 personas; el estudiante y dos analistas con el fin de obtener la mayor reproducibilidad y en diferentes días para evaluar la repetibilidad, el cronograma se distribuyó de tal forma que se lograra el máximo rendimiento y no se sobrepasaran los tiempos límites de preservación de muestras. En la tabla 3 se muestra la programación condensada a ejecutar para el cumplimiento de los objetivos propuestos. Las etapas del trabajo analítico para cada método se desglosan en la sección 6.6

Tabla 3. Actividades para estandarización de método SM 4500 P, D y SM 4500 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, E.

<b>ACTIVIDAD</b>	<b>DESCRIPCIPÓN</b>
Montaje de blancos	Se realizó la lectura de 10 blancos (Bk) de agua desionizada, sometidos al procedimiento de análisis establecido. A partir de esta información se establecen los límites críticos de detección y cuantificación (LDM y LCM) de manera estadística.
Curvas de calibración	Se montaron 6 curvas de calibración en un periodo de dos días, una diaria por cada analista.
Verificación de límite de cuantificación de forma analítica	Preparación de patrones de concentración equivalente al límite de cuantificación estadístico, verificar si cumple criterios de aceptabilidad. A partir de esta información se establece la concentración de los patrones de control de rango bajo, medio y alto.
Medición de muestras superficiales, patrones de control y muestras adicionadas	Preparación de patrones de rango alto y rango medio (RA y RM), muestras superficiales y muestras superficiales adicionadas en rango alto (MS y MSRA) por duplicado, por dos días consecutivos para un total de 12 mediciones de cada tipo de muestra, excepto los rangos medios que se corrieron uno por cada analista para un total de 6 mediciones.
Medición de muestras residuales, patrones de control y muestras adicionadas	Preparación de patrones de rango bajo y rango medio (RB y RM), muestras residuales y muestras residuales adicionadas en rango (MR y MRRB) bajo por duplicado, por dos días consecutivos para un total de 12 mediciones de cada tipo de muestra, excepto los rangos medios que se corrieron uno por cada analista para un total de 6 mediciones.
Análisis estadístico	Determinación de criterios de aceptabilidad, rechazo de datos atípicos, determinación de la incertidumbre de la medición.
Emisión de informe	Elaboración de informe de resultados demostrando el cumplimiento de los criterios de aceptabilidad del método.

La estandarización de la demanda bioquímica de oxígeno se realizó entre el estudiante y un analista, se siguió el esquema general presentado a continuación:

Tabla 4. Actividades para estandarización del método SM 5210 B.

<b>ACTIVIDAD</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Montaje de blancos	Se realizó la lectura de 12 blancos (Bk) de agua desionizada, sometidos al procedimiento de análisis establecido. A partir de esta información se establece el límite crítico de cuantificación (LCM) de manera estadística.
Curvas de consumo de oxígeno por el inóculo	Se montaron 2 curvas de consumo de oxígeno por parte del inóculo, una cada analista, el mismo día. Se sembraron puntos

	con cantidades ascendentes de inóculo.
Verificación de límite de cuantificación de forma analítica	Preparación de patrones de concentración equivalente al límite de cuantificación estadístico (LCM), verificar si cumple criterios de aceptabilidad.
Medición de muestras superficiales y patrones de control	Preparación de patrones de control de DBO aproximada de 200 mg O <sub>2</sub> /L y muestras superficiales (P200 y MS), se sembraron 12 muestras entre los dos analistas, el mismo día, debido a la nula capacidad de conservación de las muestras.
Medición de muestras residuales y patrones de control	Preparación de patrones de control de DBO aproximada de 200 mg O <sub>2</sub> /L y muestras residuales (P200 y MR), se sembraron 12 muestras entre los dos analistas, el mismo día, debido a la nula capacidad de conservación de las muestras.
Análisis estadístico	Determinación de criterios de aceptabilidad, rechazo de datos atípicos, determinación de la incertidumbre de la medición.
Emisión de informe	Elaboración de informe de resultados demostrando el cumplimiento de los criterios de aceptabilidad del método.

## 6.5. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras para las 3 metodologías se tomaron de acuerdo con lo especificado en los procedimientos de muestreo establecidos por el laboratorio Ambilab S.A.S, se preservaron de acuerdo con lo establecido por el Standard Methods for Analysis of Water and Wastewater en la sección SM 1060 C. (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012).

La muestra superficial y residual se muestreo en la ciudad de Pitalito, en el departamento del Huila. La muestra superficial se tomó sobre el sector de Tazajeras, sobre el rio guarapas cuyas coordenadas son: 1°50`09`` N, 76°02`56,3`` W

La muestra residual se tomó en el vertimiento denominado PTAR 2 por la empresa de acueducto del municipio, este desemboca en el rio guarapas sin tratamiento, las coordenadas del vertimiento son: 1°51`17,1`` N, 76°03`30,5 W

Ambos tipos de muestras se mantuvieron refrigeradas a temperaturas inferiores a los 6 °C con el fin de garantizar la preservación del analito. Las muestras para el análisis de fósforo reactivo soluble y sulfatos se analizaron antes de completar el tiempo máximo de almacenamiento recomendado de 48 horas y la muestra de DBO<sub>5</sub> se analizó el mismo día

de recolectada. Se tomó un volumen de 4 L de cada tipo de muestra en cada metodología implementada

Las muestras no se tomaron al mismo tiempo, debido a la capacidad del laboratorio y a la necesidad de evaluar la reproducibilidad durante la mayor cantidad de días posibles, sin afectar la integridad del analito a cuantificar. Para el desarrollo de cada método se tomó una muestra diferente en el mismo sitio de muestreo, esto debido a que las metodologías no fueron evaluadas de forma simultánea.

## **6.6. PROCEDIMIENTOS**

### **6.6.1. FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE:**

Lavar el material con ácido clorhídrico 0,1 N para evitar interferencias positivas por contaminación cruzada.

Ya que la fracción a analizar corresponde al fósforo reactivo soluble, la primera etapa es eliminar el color y la turbidez filtrando las muestras a través de un filtro con un diámetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

A 100 mL de muestra conteniendo no más de 2 mg  $\text{P-PO}_4^{3-}/\text{L}$ , libre de color y turbiedad se añade una gota de solución acuosa de fenolftaleína; si se torna rosada la solución, decolorar con no más de 5 gotas de solución de ácido fuerte.

Añadir a cada muestra 4 mL de reactivo de molibdato de amonio I, homogenizar bien y leer absorbancias iniciales en el espectrofotómetro a 690 nm; para compensar la turbiedad y el color de las muestras

Adicionar 0,5 mL de reactivo de cloruro estañoso, el desarrollo de color depende de la temperatura ambiente. Un aumento de 1 °C implica un aumento en la intensidad del color del 1 %. Mantener las muestras a temperaturas que no difieran en más de dos grados centígrados.

Se realizan las lecturas de absorbancias finales a los 10 minutos y antes de los 12 a 690 nm. (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012).



Nota:

En caso que una muestra se salga del rango de trabajo, diluir de forma tal que el resultado se encuentre en el rango lineal de la curva de calibración.

#### **6.6.1.1. MONTAJE DE BLANCOS**

Siguiendo el procedimiento de análisis para el método SM 4500 P, D se prepararon por 3 analistas, 10 blancos (Bk) durante dos días diferentes; el primer día cada analista preparó un blanco por duplicado y el segundo día solo dos analistas prepararon blancos por duplicado, los resultados se almacenan en los formatos de captura de datos apropiados para tal método.

A partir de esto se obtuvo un valor estadístico para la señal del límite de detección determinado como  $(2 \times t \times s)$ , donde el 2 corresponde al factor de confianza para una cobertura del 92,1 % de probabilidad,  $t$  es la  $t$  de Student para  $n-1$  grados de libertad y  $s$  es la desviación estándar de la señal de los blancos (Currie, 1995). Además se obtuvo un valor para la señal del límite de cuantificación determinado como 10 veces la desviación estándar de la señal de los blancos, posteriormente el límite de cuantificación teórico fue evaluado de forma analítica para calcular la precisión y exactitud de los resultados.

#### **6.6.1.2. PREPARACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN**

Se corrieron 6 series de 5 patrones y un blanco para obtener las curvas de calibración durante dos días, cada analista preparó una a diario. Las curvas de calibración se prepararon a partir de un patrón de 10 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L preparado por dilución a partir del patrón de 50 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L. La curva de calibración promedio que se obtuvo, es vigente por todo un año de acuerdo con lo establecido en el plan de confirmación de métodos analíticos del laboratorio Ambilab S.A.S, siempre y cuando las verificaciones rutinarias cumplan los criterios de aceptabilidad, de lo contrario el método debe ser verificado en su totalidad nuevamente. A partir de esta solución se prepararon los patrones de curva como se indica en la tabla 5. El rango de trabajo se acordó de acuerdo con las necesidades y alcance del laboratorio para cumplir con los requerimientos de las normas para vertimientos de aguas residuales y aprovechamiento agrícola, así como para la normatividad correspondiente al recurso hídrico destinado para consumo humano.

Además, se estableció el límite superior de trabajo en 2 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L debido a la posible pérdida de linealidad a mayores concentraciones y posibles interferencias que limiten el correcto desarrollo del método, de acuerdo con SM 4500 P, D. (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012).

Tabla 5. Patrones para la curva de calibración del método SM 4500 P, D.

CONCENTRACIÓN A PREPARAR (mg P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)	VOLUMEN ALÍCUOTA (mL)	VOLUMEN FINAL ALÍCUOTA (mL)	CONCENTRACIÓN DE PARTIDA (mg P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)
0,2	2,0 +/- 0,001	100	10 +/- 0,03
0,5	5,0 +/- 0,003	100	10 +/- 0,03
1,0	10,0 +/- 0,004	100	10 +/- 0,03
1,5	15,0 +/- 0,0052	100	10 +/- 0,03
2,0	20,0 +/- 0,0066	100	10 +/- 0,03

### 6.6.1.3. VERIFICACIÓN ANALÍTICA DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se estableció inicialmente de forma teórica y posteriormente de forma analítica como límite de cuantificación y límite inferior del rango de trabajo para la determinación del fósforo reactivo soluble un valor de 0,2 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L, se procedió a verificarlo analíticamente, para esto, 3 analistas prepararon y analizaron 12 patrones con concentración de 0,2 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L en dos días consecutivos, cada día una medición por duplicado.

El patrón se preparó a partir de la solución madre de 50 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L por dilución de 0,4 mL de solución madre diluida a un volumen final de 100 mL. Estas alícuotas se sometieron al procedimiento de análisis del método SM 4500 P, D.

### 6.6.1.4. MEDICIÓN DE PATRONES DE CONTROL

A partir del rango de trabajo se definieron los patrones de control como se muestra en la tabla 6. Los patrones se prepararon y se midieron en conjunto junto a las muestras superficiales y residuales y las muestras adicionadas para cada tipo de matriz.

Tabla 6. Definición de patrones de control para estandarización de método SM 4500 P, D.

<b>PATRÓN DE CONTROL</b>	<b>DEFINICIÓN</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
Rango bajo (RB)	2 x LCM	0,4 mg P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L
Rango medio (RM)	Aproximadamente la mitad del rango de trabajo	1,0 mg P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L
Rango alto (RA)	90 % rango de trabajo	1,8 mg P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L

#### **6.6.1.5. MEDICIÓN DE MUESTRAS SUPERFICIALES Y RESIDUALES**

Las muestras superficial y residual (MS y MR) se recolectaron con dos días de diferencia y después de ser recogidas se trasladaron al laboratorio donde se almacenaron bajo refrigeración, al ser analizadas se filtraron a través de filtro de acetato de celulosa con un poro de 0,45 µm con el fin de retener partículas sólidas y coloidales que afectan el color y la turbiedad de la muestra.

Para cada tipo de matriz, se realizaron 12 repeticiones, en cada ensayo se analizó una alícuota con volumen de 100 mL. Para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad se analizaron en dos días consecutivos por 3 analistas manteniéndose en los valores permisibles de almacenamiento para este método que es de 48 horas. Cada analista realizó una medición por duplicado cada día, para un total de 12.

No fue necesario hacer dilución de las muestras debido a las bajas concentraciones de analito tanto en las muestras superficiales como en las de agua residual.

#### **6.6.1.6. MUESTRAS ADICIONADAS**

Este proceso consiste en fortificar las muestras seleccionadas para la verificación analítica con el analito, para esto se decidió fortificar la muestra superficial con el patrón de rango alto (MSRA) y la muestra residual con el patrón de rango bajo (MRRB), el proceso consiste en adicionar patrón y aforar al volumen de la alícuota de análisis con muestra, el volumen de patrón no debe exceder el 5 % del volumen final para lograr

evaluar los efectos de la matriz. Se usaron los volúmenes de patrón descritos en la tabla 7, solo que se usó muestra filtrada para aforar a la alícuota de 100 mL.

Tabla 7. Preparación de muestras adicionadas con analito para estandarización de método SM 4500 P, D.

MUESTRA ADICIONADA	CONCENTRACIÓN mg P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	CONCENTRACIÓN DE PARTIDA mg P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	VOLUMEN ALÍCUOTA (mL)
MSRA	1,8	50 +/- 0,08	3,6 +/- 0,0586
MRRB	0,4	50 +/- 0,08	0,8 +/- 0,0017

#### 6.6.2. SULFATOS:

Se lava el material con jabón neutro y abundante agua, se purga con agua desionizada para evitar interferencias positivas por contaminación cruzada.

Se filtran las muestras a través de filtro con diámetro de poro de 0,45 µm.

En vasos de precipitado de 250 mL se adicionan 100 mL de muestra que contenga no más de 40 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L, libre de color y turbiedad, se añaden 20 mL de solución buffer, se agitan y leen las turbiedades iniciales.

Bajo agitación constante, se adiciona una fracción de 0,3 mL aproximadamente de cristales de BaCl<sub>2</sub>, se agita por 60 s ± 2 s.

Se mantienen las soluciones en reposo por un periodo de 5 min ± 0,5 min, después de este periodo se lee la turbiedad final de la soluciones. (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012).

##### 6.6.2.1. MONTAJE DE BLANCOS

Siguiendo el procedimiento de análisis para el método SM 4500 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, E. Se prepararon por 3 analistas, 6 blancos (Bk) durante un día; cada analista preparó un blanco por

duplicado, los resultados se almacenan en los formatos de captura de datos apropiados para tal método.

### 6.6.2.2. PREPARACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN

Se corrieron 6 series de 7 patrones y un blanco para obtener las curvas de calibración durante dos días, cada analista preparó una a diario. Las curvas de calibración se prepararon a partir de un patrón de 100 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L preparado por disolución de 0,1479 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> secado a 103 °C en un volumen de 1000 mL. A partir de esta solución se prepararon los patrones de curva como se indica en la tabla 8. La curva de calibración promedio que se obtuvo, es vigente por todo un año de acuerdo con lo establecido en el plan de confirmación de métodos analíticos del laboratorio Ambilab S.A.S, siempre y cuando las verificaciones rutinarias cumplan los criterios de aceptabilidad, de lo contrario el método debe ser verificado en su totalidad nuevamente

Tabla 8. Patrones para la curva de calibración del método SM 4500 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, E.

CONCENTRACIÓN A PREPARAR (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L)	VOLUMEN ALÍCUOTA (mL)	VOLUMEN FINAL ALÍCUOTA (mL)	CONCENTRACIÓN DE PARTIDA (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L)
10	10 +/- 0,0040	100	100 +/- 0,21
15	15 +/- 0,0052	100	100 +/- 0,21
20	20 +/- 0,0066	100	100 +/- 0,21
25	25 +/- 0,0066	100	100 +/- 0,21
30	30 +/- 0,0074	100	100 +/- 0,21
35	35 +/- 0,0084	100	100 +/- 0,21
40	40 +/- 0,0093	100	100 +/- 0,21

### 6.6.2.3. VERIFICACIÓN ANALÍTICA DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Los patrones se prepararon a partir de la solución madre de 100 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L por dilución de 10 mL de solución madre diluida a un volumen final de 100 mL. Estas alícuotas se sometieron al procedimiento de análisis del método SM 4500 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, E.

Se estableció como límite de cuantificación y límite inferior del rango de trabajo para la determinación de sulfatos un valor de 10 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L de acuerdo con la información del método SM 4500 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, E (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012) donde especifica que para concentraciones por debajo de esta, se debe usar un reactivo diferente. Se procedió a verificarlo de forma analítica realizando 6 mediciones, realizadas por 3 analistas, cada analista preparó un patrón por duplicado, los resultados se almacenan en los formatos de captura de datos apropiados para tal método.

#### 6.6.2.4. MEDICIÓN DE PATRONES DE CONTROL

Los patrones se prepararon de la siguiente manera:

Tabla 9. Patrones de control para el método SM 4500 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, E.

CONCENTRACIÓN A PREPARAR (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L)	CONCENTRACIÓN DE PARTIDA (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L)	VOLUMEN ALÍCUOTA (mL)	VOLUMEN FINAL (mL)
14 RB	700 +/- 1,36	2,0 +/- 0,001	100
20 RM	100 +/- 0,21	20,0 +/- 0,0066	100
35 RA	700 +/- 1,36	5,0 +/- 0,003	100

Los patrones se prepararon y se midieron junto a las muestras superficiales y residuales y las muestras adicionadas para cada tipo de matriz.

#### 6.6.2.5. MEDICIÓN DE MUESTRAS SUPERFICIALES Y RESIDUALES

Las muestras superficial y residual (MS y MR) se muestrearon con dos días de diferencia y después de ser recolectadas se trasladaron al laboratorio donde se almacenan bajo refrigeración, al ser analizadas se filtran a través de filtro de acetato de celulosa con un poro de 0,45 µm con el fin de retener partículas sólidas y coloidales que afectan el color y la turbiedad de la muestra.

Se realizaron 12 mediciones, para cada una se analizaron alícuotas de 100 mL de muestra. Para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad se analizaron en dos días consecutivos por 3 analistas manteniéndose en los valores permisibles de

almacenamiento para este método que es de 28 días de acuerdo con el SM 1060 C (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012). Cada analista realizó una medición por duplicado cada día, para un total de 12.

Fue necesario hacer dilución de la muestra residual, debido a la alta concentración de analito y al limitado rango de trabajo.

#### 6.6.2.6. MUESTRAS ADICIONADAS

Se decidió fortificar la muestra superficial con el patrón de rango alto (MSRA) y la muestra residual con el patrón de rango bajo (MRRB).

En el caso de las muestras residuales, donde se observó en los ensayos preliminares concentraciones superiores al límite superior del rango de trabajo, fue necesario diluir la muestra para obtener valores aceptables para la cuantificación del analito.

Tabla 10. Volúmenes de patrón para fortificar las muestras superficiales y residuales.

MUESTRA ADICIONADA	CONCENTRACIÓN mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L	CONCENTRACIÓN DE PARTIDA mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L	VOLUMEN ALÍCUOTA (mL)
MSRA	35	700 +/- 1,36	5 +/- 0,003
MRRB	14	700 +/- 1,36	2 +/- 0,001

#### 6.6.3. DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO:

Es importante tener en cuenta que las muestras para el análisis de la demanda bioquímica de oxígeno se degradan significativamente entre la recolección de la muestra y el análisis, es vital analizarlas en un periodo no mayor a 6 horas si no se refrigera la muestra y estando refrigerada se puede almacenar por hasta máximo 48 horas.

Se verificó que el pH de las muestras se encontrara entre 6 y 8; en caso de no ser así, se hace necesario ajustar la temperatura de la muestra a 20 ± 3 °C y posteriormente se ajusta el pH a entre 7 a 7,2 usando la solución 1 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o NaOH según sea el caso.

Es importante obtener agua de excelente calidad para los análisis de DBO<sub>5</sub>, esto debido a la sensibilidad del método a sustancias contaminantes o tóxicas que pueden afectar las poblaciones de bacterias que están siendo incubadas.

Etapa fundamental es la correcta selección de un tipo de muestra con una población adecuada y saludable de bacterias, las cuales van a actuar como inóculo para los patrones y muestras con poblaciones bacterianas muy pobres y que no van a presentar un consumo de oxígeno adecuado durante el periodo de incubación. Para el proceso descrito se seleccionó una muestra superficial con bajo contenido de sedimentos y bastante oxigenada, la cual fue contaminada con heces de *Canis lupus familiaris*, esta se dejó decantar y se tomó el sobrenadante para los procesos de análisis. No es necesario cuantificar la población de bacterias, pero si estimar el consumo de oxígeno en función del volumen de inóculo adicionado a cada botella Winkler.

El agua de dilución se preparó tomando un volumen conocido de agua desionizada con las mejores características fisicoquímicas y microbiológicas posibles, esto se garantiza con el monitoreo de la conductividad y del crecimiento de bacterias heterótrofas (mesófilos) al agua destinada al análisis de la DBO<sub>5</sub>, estos parámetros deben encontrarse por debajo de 2,0  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y menos de 100 UFC/100mL respectivamente. Se saturó el agua de oxígeno de forma que presente una concentración de mínimo 7,5 mg +/- 0,11 mg O<sub>2</sub>/L, se verificó la saturación con el electrodo de luminiscencia. A continuación se añadió 1 mL por cada litro de agua de dilución preparada, de cada uno de los reactivos, que fueron el buffer fosfato de pH 7,2, la solución de sulfato de magnesio, la solución de cloruro de calcio y la solución de cloruro férrico. Se mezcló bien y se saturó de oxígeno con una bomba libre de aceite manteniendo el agua a una temperatura de  $20 \pm 3$  °C.

Se prepararon diluciones de las muestras a analizar por duplicado, usando el agua de dilución preparada con anterioridad, se adicionó a las botellas Winkler una cantidad de agua de dilución; se buscó preparar diluciones que permitieran obtener después del periodo de incubación de 5 días, un consumo de oxígeno de mínimo 2 mg/L y un oxígeno residual de mínimo 1 mg/L (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012). Para la selección de las diluciones se tuvo en cuenta la tabla 11.



Tabla 11. Rango de volúmenes de muestra a sembrar de acuerdo con el tipo de muestras para el método SM 5210 B.

<b>TIPO DE MUESTRA</b>	<b>MILILITROS DE MUESTRA</b>
Residuales domésticas crudas fuertes	0,3-1,0
Residuales domésticas crudas normales	0,5-1,5
Residuales domésticas intermedias	1,0-3,0
Residuales domésticas tratadas (funcionamiento regular)	2,0-10,0
Residuales domésticas tratadas (funcionamiento normal)	5,0-20,0
Residuales domésticas tratadas (funcionamiento excelente)	10,0-50,0
Aguas superficiales parcialmente contaminadas	20,0-100,0
Aguas superficiales no contaminadas	50,0-200,0

Cuando se utilizó el inóculo, en muestras poco contaminadas y patrones; se añadió el volumen determinado mediante la estandarización de la solución de inóculo a las botellas donde se realizó la dilución, se determinó que 1 mL era suficiente para obtener un consumo de oxígeno entre 0,6 y 1,0 mg O<sub>2</sub>/L. La estandarización se realiza con el fin de determinar el volumen adecuado para que un patrón de glucosa-ácido glutámico presentara una DBO de 198 ± 30,5 mg O<sub>2</sub>/L; es decir que si un 1 mL del inóculo es suficiente para obtener este resultado en los patrones, se debe adicionar el mismo volumen a las muestras a inocular para lograr una correcta medición de la DBO<sub>5</sub>. Con cada lote de muestras se sembró un blanco de inóculo (BS) por duplicado para cuantificar el consumo de oxígeno por parte del inóculo utilizado y así compensar el consumo real de muestras y patrones inoculados.

La medición de oxígeno se hace siempre bajo agitación para garantizar la lectura de oxígeno, además permite homogenizar las bacterias a través de la solución. Se llenaron las botellas hasta el cuello donde encaja el sello esmerilado sin dejar burbujas, posteriormente se adiciona agua sobre la tapa para establecer un sello hidráulico y así evitar la oxigenación.

Se incuban las botellas a  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se evitó la exposición a la luz y los cambios de temperatura en la incubadora donde se encuentran las muestras.

Después de 5 días  $\pm$  6 horas de incubación, se determinó el oxígeno disuelto en todas las botellas incubadas que contienen blancos, blancos de semilla, patrones y diluciones de muestras (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012).

#### **6.6.3.1. MONTAJE DE BLANCOS**

Siguiendo el procedimiento de análisis para el método SM 5210, B. Se prepararon entre 2 analistas, 12 blancos (Bk) durante un día; cada analista preparó tres blancos por duplicado, los resultados se almacenan en los formatos de captura de datos apropiados para tal método.

#### **6.6.3.2. PREPARACIÓN DE CURVAS DE CONSUMO DE OXÍGENO POR EL INÓCULO**

Se sembraron 2 series de 4 blancos de inóculo preparados con diferentes cantidades de agua de semilla y un blanco por cada analista para obtener curvas de consumo de oxígeno por parte del inóculo seleccionado para el proceso de estandarización. Esto con el fin de evaluar el desempeño del agua seleccionada y además evaluar la toxicidad de esta.

#### **6.6.3.3. VERIFICACIÓN ANALÍTICA DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

Se estableció como límite de cuantificación y límite inferior del rango de trabajo para la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno un valor de  $2\text{ mg O}_2/\text{L}$ , esto de acuerdo con la normatividad del reglamento del sector de agua potable y saneamiento básico RAS, donde se estipula que para el recurso hídrico destinado a consumo humano, la demanda bioquímica de oxígeno no debe superar los  $5\text{ mg O}_2/\text{L}$ , con el fin de poder ofrecer el servicio de análisis a muestras crudas destinadas a la potabilización de agua para consumo humano se estableció un límite de cuantificación inferior al establecido en la normatividad vigente. Se procedió a verificarlo de forma analítica realizando 12 mediciones, realizadas por 2 analistas, cada analista preparo 3 patrones por duplicado,

los resultados se almacenan en los formatos de captura de datos apropiados para tal método.

El patrón se preparó a partir de la solución patrón de 200 mg O<sub>2</sub>/L por dilución de 2,5 mL de solución patrón diluida a un volumen final de 250 mL. Estas alícuotas se sometieron al procedimiento de análisis del método SM 5210, B-ASTM D888 12E1-C.

#### **6.6.3.4. MEDICIÓN DE PATRONES DE CONTROL**

A partir de las características y requerimientos del método se definió el patrón de control para la DBO<sub>5</sub> como P200, este tiene una DBO teórica, ya establecida como 198 ± 30,5 mg O<sub>2</sub>/L

Se realizaron 12 repeticiones entre los dos analistas, divididos en los dos días de análisis de las muestras superficiales y residuales. Los patrones se prepararon y se midieron en conjunto junto a las muestras superficiales y residuales.

#### **6.6.3.5. MEDICIÓN DE MUESTRAS SUPERFICIALES Y RESIDUALES**

Las muestras superficial y residual (MS y MR) se muestrearon con 7 días de diferencia, esto con el fin de esperar a obtener los datos finales para el primer grupo de muestras. Después de ser recolectadas se trasladaron al laboratorio donde se analizaron el mismo día.

Se realizaron 12 mediciones, para las muestras superficiales se analizaron alícuotas de 100 mL de muestra. Para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad se analizaron el mismo día, entre 2 analistas, manteniéndose en los valores permisibles de almacenamiento para este método que es de máximo 48 horas. Cada analista realizó tres mediciones por duplicado, para un total de 12.

Para la siembra de la muestra de agua residual, se realizaron 12 mediciones, usando alícuotas de 5 mL de muestra. Se analizaron el mismo día entre 2 analistas. Cada analista realizó tres mediciones por duplicado, para un total de 12.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE

#### 7.1.1. CURVA DE CALIBRACIÓN

Durante los dos días de medición de curvas de calibración se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 12, donde se muestran las absorbancias de cada serie de patrones seleccionados para la elaboración de la curva de calibración, además la absorbancia promedio de todas las mediciones y el intervalo de confianza de los resultados.

Tabla 12. Resultados para la curva de calibración del método SM 4500 P, D

<b>PATRONES mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>PROMEDIO ABSORBANCIAS</b>
0,2	0,181	0,184	0,180	0,189	0,189	0,183	0,184 +/- 0,003
0,5	0,442	0,442	0,438	0,440	0,413	0,395	0,428 +/- 0,016
1,0	0,829	0,836	0,786	0,839	0,790	0,764	0,807 +/- 0,025
1,5	1,175	1,176	1,181	1,162	1,142	1,155	1,165 +/- 0,012
2,0	1,486	1,493	1,499	1,536	1,434	1,466	1,486 +/- 0,027

La curva de calibración resultante se muestra en la gráfica 1.

De la curva de calibración promedio de la gráfica 1 se obtuvieron como parámetros de análisis: la pendiente de la recta, el intercepto con el eje Y, además el coeficiente de correlación, la desviación estándar y el límite de confianza al 95 de probabilidad de la pendiente y del intercepto con el eje Y para determinar el cumplimiento de la ley de Beer, estos se muestran en la tabla 13. Se destaca que la curva presenta un coeficiente de correlación mayor a 0,995, lo cual permite aceptar esta curva de calibración, con la cual se obtendrán los resultados de los grupos de muestras por interpolación.

Gráfica 1. Curva de calibración para la implementación del método SM 4500 P, D

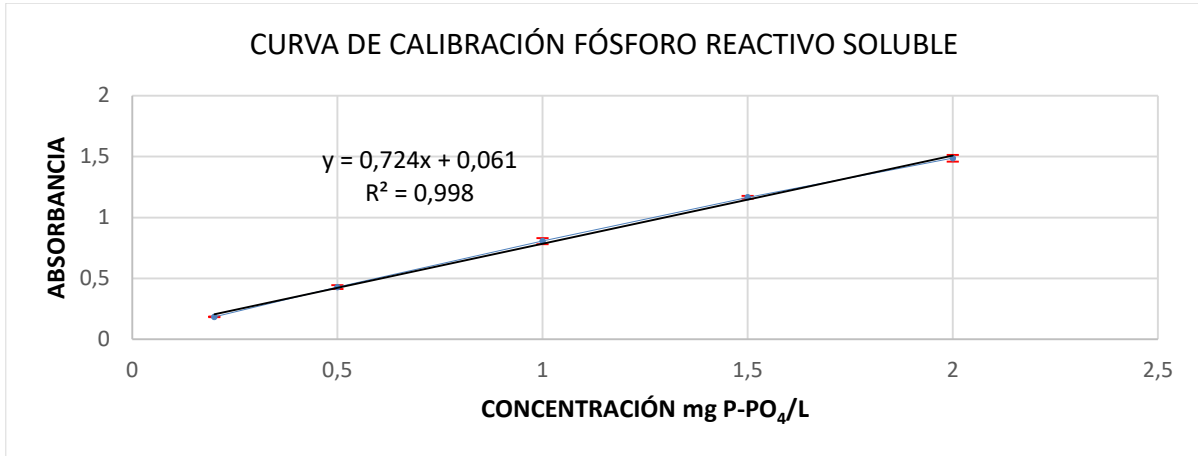


Tabla 13. Parámetros estadísticos para la curva de calibración del método SM 4500 P, D.

PARÁMETRO	VALOR
Pendiente	0,724
Intercepto con eje Y	0,061
Coefficiente de correlación	0,998
Desviación estándar pendiente	0,017
Límite de confianza pendiente	0,724 +/- 0,054
Desviación estándar intercepto	0,021
Límite de confianza intercepto	0,061 +/- 0,067

### 7.1.2. BLANCOS Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se calculó inicialmente la señal de los límites de detección y de cuantificación de forma teórica, para esto se usó la señal de los blancos como se muestran en la tabla 14. A partir de estos datos y teniendo en cuenta que la t de Student para 9 grados de libertad es 2,262, se estableció el límite de detección y de cuantificación así:

$$LDM = 2 \times t \times s$$

$$LDM = 2 \times 2,262 \times 0,002$$

$$LDM = 0,009$$

Donde s es la desviación estándar de la señal de los blancos.

Posteriormente se calculó la señal del límite de cuantificación así:

$$\text{LCM} = 10 \times s$$

$$\text{LCM} = 10 \times 0,002$$

$$\text{LCM} = 0,020$$

De acuerdo a los resultados de preestandarización se concluyó que son valores de absorbancia extremadamente bajos y difíciles de reproducir con criterios estadísticos favorables, por lo tanto los límites se establecieron de forma práctica teniendo en cuenta los límites máximos permisibles de las normas para agua tratada y residual y con base a la información obtenida en la etapa de preestandarización, así se seleccionó el valor de 0,2 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L; además permiten destacar la excelente calidad y limpieza de los reactivos, agua desionizada y material utilizado, pues se obtienen datos de absorbancia muy bajos para los blancos.

A partir de los resultados obtenidos para los blancos se realizó un análisis de precisión de los datos y de verificación de datos sospechosos mediante el contraste de Grubbs, seguidamente se verificó de forma analítica el límite de cuantificación establecido por el laboratorio. Los resultados se muestran en la tabla 14:

Tabla 14. Resultados en mg P-PO<sub>4</sub>/L para blancos y patrones con concentración equivalente al límite de cuantificación del método SM 4500 P, D.

<b>ENSAYO</b>	<b>SEÑAL DE BLANCOS (ABS)</b>	<b>BLANCOS mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L</b>	<b>LCM 0,2 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L</b>
1	0,006	-0,076	0,166
2	0,007	-0,075	0,180
3	0,014	-0,065	0,174
4	0,007	-0,075	0,175
5	0,007	-0,075	0,164
6	0,010	-0,071	0,155
7	0,007	-0,075	0,161
8	0,007	-0,075	0,172
9	0,007	-0,075	0,177
10	0,007	-0,075	0,184

11	-	-	0,171
12	-	-	0,175

Se evaluó la presencia de datos anómalos dentro de los conjuntos de resultados, esto se hizo calculando el estadístico G, con el fin de aceptar o rechazar la hipótesis nula de que los datos sospechosos no son datos anómalos, así como se muestra en la tabla 15:

Tabla 15. Resultados de G para el contraste de Grubbs de datos sospechosos en blancos y LCM para el método SM 4500 P, D.

ENSAYO	BLANCOS	LCM 0,2 mg P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L
1	0,799	0,673
2	0,378	1,068
3	2,565	0,327
4	0,378	0,494
5	0,378	0,840
6	0,883	2,008
7	0,378	1,174
8	0,378	0,161
9	0,378	0,661
10	0,378	1,495
11		0,006
12		0,494

Se destaca de estos resultados que el estadístico G para el ensayo número 3 de los blancos excede el G crítico para ese número de ensayos, por lo tanto, la hipótesis de que este dato sospechoso no es anómalo se rechaza al igual que este dato del conjunto total.

A partir de esta información se obtienen las magnitudes estadísticas destinados a la evaluación de la precisión y la exactitud.

Los valores de concentración negativos para los blancos se deben a una situación matemática y no física, el proceso de regresión lineal dio un intercepto de la curva superior al promedio de las señal de los blancos, al interpolar en la curva de calibración se obtiene un falso negativo para las alícuota de agua usadas como blancos

Tabla 16. Magnitudes estadísticas obtenidas para los blancos y los límites de cuantificación del método SM 4500 P, D.

MAGNITUD ESTADÍSTICA	BLANCOS	LCM 0,2 mg P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L
$\hat{x}$	-0,074	0,171
S	0,002	0,008
%CV	2,03	4,84
% Error	-	14,42

Los resultados de la tabla 16 cumplen con los criterios de aceptabilidad para la evaluación de la precisión y la exactitud.

### 7.1.3. PATRONES, MUESTRAS Y MUESTRAS ADICIONADAS

A continuación, se muestran en la tabla 17. Los resultados obtenidos por los 3 analistas durante los días de análisis, en esta están agrupados los resultados de todos los grupos de muestras sin distinguir entre analistas.

Tabla 17. Resultados en mg P-PO<sub>4</sub>/L para patrones, muestras y muestras adicionadas del método SM 4500 P, D.

ENSAYO	RB	RM	RA	MS	MR	MSRA	MRRB
1	0,396	1,048	1,816	-0,073	-0,066	1,808	0,425
2	0,393	1,048	1,809	-0,073	-0,069	1,820	0,424
3	0,414	1,091	1,801	-0,072	-0,064	1,821	0,436
4	0,425	1,088	1,806	-0,072	-0,062	1,828	0,435



5	0,434	1,074	1,826	-0,064	-0,061	1,806	0,446
6	0,421	1,089	1,842	-0,066	-0,060	1,806	0,432
7	0,429	1,087	1,821	-0,072	-0,058	1,813	0,435
8	0,427	1,085	1,824	-0,072	-0,057	1,817	0,436
9	0,381	1,063	1,827	-0,069	-0,060	1,790	0,420
10	0,428	1,138	1,841	-0,069	-0,057	1,821	0,422
11	0,409	1,063	1,817	-0,075	-0,061	1,806	0,434
12	0,405	1,077	1,812	-0,069	-0,061	1,781	0,434

Se evaluó la presencia de datos anómalos dentro de los conjuntos de resultados, esto se hizo calculando el estadístico G con el fin de aceptar o rechazar la hipótesis nula de que los datos sospechosos no son datos anómalos, así como se muestra en la tabla 18:

Tabla 18. Resultados de G para el contraste de Grubbs de datos sospechosos, para un nivel de confianza del 95 % la G crítica para n=12 es 2,285.

<b>ENSAYO</b>	<b>RB</b>	<b>RM</b>	<b>RA</b>	<b>MS</b>	<b>MR</b>	<b>MSRA</b>	<b>MRRB</b>
1	1,030	1,305	0,333	0,871	1,388	0,169	0,854
2	1,195	1,305	0,874	0,871	2,129	0,743	1,040
3	0,041	0,480	1,523	0,435	0,648	0,845	0,637
4	0,701	0,365	1,090	0,435	0,278	1,351	0,450
5	1,195	0,211	0,423	2,177	0,093	0,270	1,941
6	0,453	0,422	1,721	1,306	0,463	0,270	0,078
7	0,948	0,307	0,099	0,435	0,833	0,237	0,450
8	0,783	0,249	0,315	0,435	1,203	0,541	0,637
9	1,937	0,672	0,532	0,435	0,463	1,487	1,599
10	0,865	2,437	1,613	0,435	1,203	0,845	1,227
11	0,288	0,672	0,225	1,306	0,093	0,270	0,264
12	0,536	0,096	0,658	0,435	0,093	2,095	0,264

De acuerdo a estos resultados, cabe notar que el estadístico G para el ensayo número 10 de los patrones de rango medio excede el G crítico para ese número de ensayos con un valor de 2,285, por lo tanto, la hipótesis de que este dato sospechoso no es anómalo se rechaza al igual que este dato del conjunto total.

A partir de esta información se obtienen las magnitudes estadísticas destinados a la evaluación de la precisión y la exactitud, estas se observan en la tabla 19.

Tabla 19. Magnitudes estadísticas obtenidas para los patrones, muestras y muestras adicionadas del método SM 4500 P, D.

<b>MAGNITUD ESTADÍSTICA</b>	<b>RB</b>	<b>RM</b>	<b>RA</b>	<b>MS</b>	<b>MR</b>	<b>MSRA</b>	<b>MRRB</b>
$\hat{x}$	0,413	1,074	1,820	-0,07	-0,06	1,812	0,432
S	0,017	0,016	0,013	0,003	0,004	0,015	0,007
%CV	4,05	1,50	0,70	4,49	6,09	0,801	1,72
% Recuperación	-	-	-	-	-	100,55	107,89
% Error	3,37	7,40	1,12	-	-	-	-

De la tabla 19 se puede observar que todos los grupos de muestras cumplen con los criterios de aceptabilidad preestablecidos para la caracterización de la precisión y la exactitud del método, lo cual permite concluir que el método es aceptable para los propósitos del laboratorio de análisis. Además, permite determinar que el método es repetible ya que no se encuentran diferencias significativas entre los resultados obtenidos de forma consecutiva.

Sin embargo toca hacer una observación acerca de los resultados obtenidos con las muestras superficiales y residuales, en donde se destaca que el valor promedio de las absorbancias es menor al intercepto de la curva de calibración, por tal motivo se obtiene una concentración negativa; el significado de esto es que la señal del analito es prácticamente ausente que no se distingue del ruido instrumental, es decir que está por debajo del límite de cuantificación del método. En estos casos, para poder hacer el análisis estadístico en el caso de las muestras adicionadas, se usa el límite crítico que corresponde a la mitad del límite de detección (Currie, 1995), en el presente caso al ser tan baja la señal del límite de detección, es mejor tomar como ausente la concentración de analito en las muestras, para así calcular el porcentaje de recuperación de las

muestras adicionadas MSRA y MRRB como se muestra en la tabla 19, ya que ambos tipos de matrices se encuentran por debajo del límite de detección.

#### 7.1.4. REPRODUCIBILIDAD

Para evaluar la reproducibilidad se realizó un análisis de varianzas; en este caso se calculó la varianza dentro de los resultados obtenidos por cada analista y la varianza entre los promedios de los resultados de cada analista.

Con estos valores se realizó una prueba de contraste F de una cola, debido a que se compara la varianza de los resultados obtenidos por cada analista con la varianza de los resultados obtenidos entre analistas con un nivel de confianza del 95 % para verificar la hipótesis nula  $H_0$ = La varianza de los resultados obtenidos por analistas no es significativamente superior de la varianza obtenida por los resultados entre analistas.

Se analizó por separado cada grupo de muestras, teniendo en cuenta los 4 análisis realizados por cada analista.

##### 7.1.4.1. PATRONES DE CONTROL

A continuación, en las tablas 20, 21 y 22 se muestran los resultados para los rangos bajo, medio y alto respectivamente, seleccionados para el proceso de estandarización.

Tabla 20. Resultados por analista para los rangos bajos, el F teórico para una prueba de una cola es  $F_{9,2} = 19,38$ .

ANALISTA	RB 1	RB 2	RB 3	RB 4	$S^2$ dentro muestra	$S^2$ entre muestras	$F_{calculado}$
1	0,396	0,393	0,414	0,425	2,09x10 <sup>-4</sup> Para 9 g.l	3,78x10 <sup>-5</sup> Para 2 g.l	5,53
2	0,434	0,421	0,429	0,427			
3	0,381	0,428	0,409	0,405			

Tabla 21. Resultados por analista para los rangos medios, el F teórico para una prueba de una cola es  $F_{8,2} = 19,37$ .

ANALISTA	RM 1	RM 2	RM 3	RM 4	$S^2$ dentro muestra	$S^2$ entre muestras	$F_{calculado}$
----------	------	------	------	------	----------------------	----------------------	-----------------

1	1,048	1,048	1,091	1,088	2,27 x10 <sup>-4</sup> para 8 g.l	2,05x10 <sup>-5</sup> Para 2 g.l	11,10
2	1,074	1,089	1,087	1,085			
3	1,063		1,063	1,077			

Tabla 22. Resultados por analista para los rangos altos, el F teórico para una prueba de una cola es  $F_{9,2} = 19,38$ .

ANALISTA	RA 1	RA 2	RA 3	RA 4	S <sup>2</sup> <sub>dentro muestra</sub>	S <sup>2</sup> <sub>entre muestras</sub>	F <sub>calculado</sub>
1	1,816	1,809	1,801	1,806	9,64x10 <sup>-5</sup> para 9 g.l	2,90x10 <sup>-5</sup> Para 2 g.l	3,33
2	1,826	1,842	1,821	1,824			
3	1,827	1,841	1,817	1,812			

Cada analista realizó 4 análisis, es decir que los grados de libertad dentro de muestra para los resultados de cada analista son 3, sumando los grados de libertad de los 3 analistas se obtienen un total de 9 y los grados de libertad entre muestras son dos, porque se comparan los resultados de 3 analistas diferentes. Nótese que en el caso de los patrones de rango medio disminuyeron los grados de libertad para los resultados obtenidos dentro de muestra debido al rechazo del dato anómalo en la tabla 18, por eso los grados de libertad se reducen a 8.

#### 7.1.4.2. MUESTRAS SUPERFICIALES Y RESIDUALES

A continuación, se muestran en las tablas 23 y 24 los resultados para las muestras superficiales y residuales respectivamente, seleccionados para el proceso de estandarización.

Tabla 23. Resultados por analista para las muestras superficiales, el F teórico para una prueba de una cola es  $F_{9,2} = 19,38$

ANALISTA	MS 1	MS 2	MS 3	MS 4	S <sup>2</sup> <sub>dentro muestra</sub>	S <sup>2</sup> <sub>entre muestras</sub>	F <sub>calculado</sub>
1	-0,073	-0,073	-0,072	-0,072	8,48x10 <sup>-6</sup> para 9 g.l	1,07x10 <sup>-6</sup> Para 2 g.l	7,90
2	-0,064	-0,066	-0,072	-0,072			

3	-0,069	-0,069	-0,075	-0,069			
---	--------	--------	--------	--------	--	--	--

Tabla 24. Resultados por analista para las muestras residuales, el F teórico para una prueba de una cola es  $F_{9,2} = 19,38$

ANALISTA	MR 1	MR 2	MR 3	MR 4	$S^2_{dentro}$ muestra	$S^2_{entre}$ muestras	$F_{calculado}$
1	-0,066	-0,069	-0,064	-0,062	$5,46 \times 10^{-6}$ para 9 g.l	$3,25 \times 10^{-6}$ Para 2 g.l	1,68
2	-0,061	-0,060	-0,058	-0,057			
3	-0,060	-0,057	-0,061	-0,061			

Al realizar la estadística a los resultados de las tablas 23 y 24, con valores de concentración negativos. Es importante ser precavido con las conclusiones. Físicamente no es viable considerar la cuantificación del analito ya que se concluyó que los valores se encuentran por debajo del límite de detección, sin embargo es importante observar que no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos por los 3 analistas, lo cual permite confirmar la ausencia del analito en las muestras y no que se haya debido al error sistemático por parte de alguno de los analistas.

#### 7.1.4.3. MUESTRAS ADICIONADAS CON ANALITO

A continuación se muestran los resultados en las tablas 25 Y 26 para las muestras superficiales y residuales adicionadas en patrón alto y bajo respectivamente, seleccionados para el proceso de estandarización.

Tabla 25. Resultados por analista para las muestras superficiales adicionadas con el patrón de rango alto, el F teórico para una prueba de una cola es  $F_{9,2} = 19,38$

ANALISTA	MSRA1	MSRA2	MSRA3	MSRA4	$S^2_{dentro}$ muestra	$S^2_{entre}$ muestras	$F_{calculado}$
1	1,808	1,820	1,821	1,828	$1,39 \times 10^{-4}$ para 9 g.l	$2,43 \times 10^{-5}$ Para 2 g.l	5,74
2	1,806	1,806	1,813	1,817			
3	1,790	1,821	1,806	1,781			

Tabla 26. Resultados por analista para las muestras residuales adicionadas con el patrón de rango bajo, el F teórico para una prueba de una cola es  $F_{9,2} = 19,38$

ANALISTA	MRRB1	MRRB2	MRRB3	MRRB4	$S^2_{dentro\ muestra}$	$S^2_{entre\ muestras}$	$F_{calculado}$
1	0,425	0,424	0,436	0,435	4,34x10 <sup>-5</sup> para 9 g.l	6,69x10 <sup>-6</sup> Para 2 g.l	6,49
2	0,446	0,432	0,435	0,436			
3	0,420	0,422	0,434	0,434			

Analizando que el F calculado no supera el F crítico para ninguno de los grupos de patrones de control (RB, RM y RA) muestras superficiales (MS), muestras residuales (MR) y muestras adicionadas (MSRA y MRRB), se acepta la hipótesis de que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por los analistas participantes del desarrollo analítico.

#### 7.1.5. DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

En la gráfica 2 se muestran las fuentes de incertidumbre consideradas en el análisis estadístico para la estimación de la incertidumbre del método analítico para la determinación del fósforo reactivo soluble.

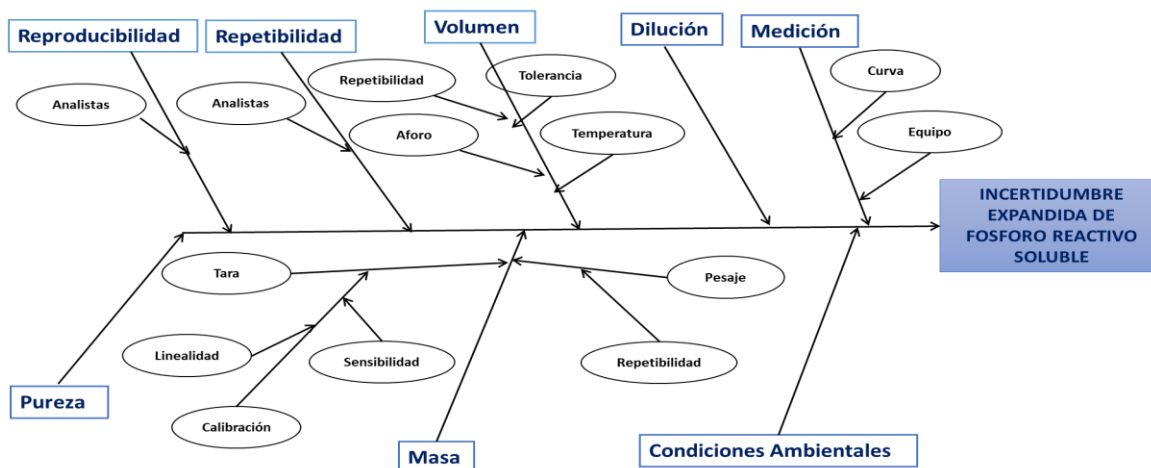
Debido a que toda medida analítica está sujeta a errores de tipo aleatorio y en ciertos casos errores sistemáticos es necesario cuantificar estas causas con el fin de determinar en qué valores se encuentra realmente la medida analítica.

Estas desviaciones provienen de diferentes fuentes que aportan en cierta medida a aumentar el sesgo de las mediciones.

La incertidumbre se expresa sobre una medida con un valor conocido establecido como el valor real, alrededor de este se sitúan los resultados de manera aleatoria. De acuerdo con esto se expresara la incertidumbre para los patrones de control de rango bajo y alto. Esta medida del sesgo en los resultados analíticos sirve para estimar la incertidumbre en los análisis de muestras superficiales y residuales ya que las fuentes de incertidumbre consideradas son las mismas.

Gráfica 2. Diagrama de fuentes de incertidumbre consideradas en la determinación del método SM 4500 P, D.

DIAGRAMAS DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE.



El procedimiento para el cálculo de la incertidumbre se encuentra en el anexo 1.

Se muestra en la tabla 27 las incertidumbres estándar relativas para cada fuente de incertidumbre que afecta la determinación de los patrones de rango bajo (RB) y a partir de esta se procede a calcular la incertidumbre estándar combinada.

Tabla 27. Incertidumbres estándar relativas para los resultados obtenidos con los patrones de rango bajo RB.

FUENTE DE INCERTIDUMBRE	INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA
Incertidumbre del peso de patrón	4,16E-04
Incertidumbre pureza del patrón	2,89E-04
Incertidumbre peso molecular patrón	5,14E-06
Incertidumbre dilución para solución patrón	6,43E-04
Incertidumbre mediciones en el espectrofotómetro	8,01E-03
Incertidumbre de la alícuota de análisis	8,39E-04
Incertidumbre alícuota para preparar RB	2,30E-03
Incertidumbre aforo del estándar RB	8,45E-04
Incertidumbre reproducibilidad mediciones RB	1,21E-02
Incertidumbre de curva de calibración para	4,96E-02

determinación de los RB	
-------------------------	--

De acuerdo con estos resultados calculamos la incertidumbre estándar combinada como la raíz de la sumatoria de los cuadrados de las incertidumbres estándar relativas, así se obtiene el siguiente valor:

$$U_c = 5,17 \times 10^{-2}$$

Debido a la poca representatividad de la incertidumbre combinada para que la amplitud de este intervalo abarque todos los valores posibles del mensurando, se hace necesario aumentar la probabilidad teniendo en cuenta las características normales de la distribución de los datos evaluados; para un nivel de confianza del 95,45 % el factor de cobertura K es igual a 2, además se multiplica por el valor del rango bajo que corresponde a 0,4 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L para obtener la incertidumbre estándar expandida, así:

$$U = 5,17 \times 10^{-2} \times 2 \times 0,4$$

$$U = 4,14 \times 10^{-2}$$

Con esto estimamos el porcentaje de incertidumbre en los resultados obtenidos para los patrones de control de rango bajo:

$$\frac{4,14 \times 10^{-2}}{0,4} \times 100\% = 10,35 \%$$

Los resultados se expresan como: 0,4 ± 0,04 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L:

De igual manera, en la tabla 28 se muestra la incertidumbre para los resultados obtenidos con los patrones de control de rango alto:

Tabla 28. Incertidumbres estándar relativas para los resultados obtenidos con los patrones de rango alto RA.

FUENTE DE INCERTIDUMBRE	INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA
Incertidumbre del peso de patrón	4,16E-04
Incertidumbre pureza del patrón	2,89E-04
Incertidumbre peso molecular patrón	5,14E-06
Incertidumbre dilución para solución patrón	6,43E-04



Incertidumbre mediciones en el espectrofotómetro	2,09E-03
Incertidumbre de la alícuota de análisis	8,39E-04
Incertidumbre alícuota para preparar RA	1,64E-02
Incertidumbre aforo del estándar RA	8,45E-04
Incertidumbre reproducibilidad mediciones RA	2,05E-03
Incertidumbre de curva de calibración para determinación de los RA	1,14E-02

De acuerdo con estos resultados se calcula la incertidumbre estándar combinada:

$$U_c = 2,02 \times 10^{-2}$$

Con este dato se calcula la incertidumbre expandida considerando un factor de cobertura igual a 2 para una distribución normal con un nivel de confianza del 95,45 %, además se multiplica por el valor del rango alto que corresponde a 1,8 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L:

$$U = 2,02 \times 10^{-2} \times 2 \times 1.8$$

$$U = 7,28 \times 10^{-2}$$

Con esto estimamos el porcentaje de incertidumbre en los resultados obtenidos para los patrones de control de rango alto:

$$\frac{7,28 \times 10^{-2}}{1.8} \times 100\% = 4,05 \%$$

Los resultados se expresan como: 1,80 ± 0,07 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L.

## 7.2. SULFATOS

### 7.2.1. CURVA DE CALIBRACIÓN

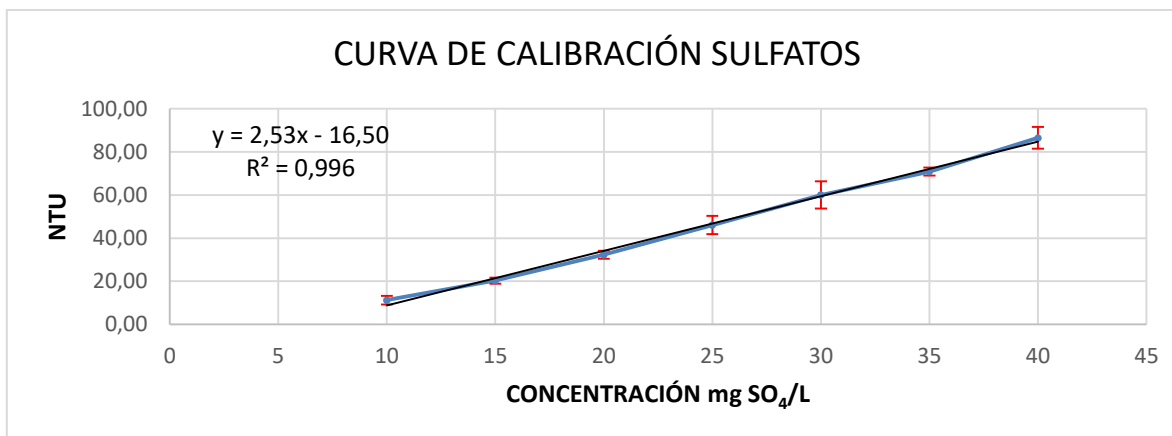
Durante los dos días de medición de curvas de calibración se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 29, donde se muestran las turbiedades de cada serie de patrones seleccionados para la elaboración de la curva de calibración, además la turbiedad promedio de todas las mediciones.

Tabla 29. Resultados para la curva de calibración del método SM 4500 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, E.

<b>PATRONES mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>PROMEDIO TURBIEDADES</b>
10	10,78	10,40	10,91	12,74	12,37	10,48	11,28 +/- 0,81
15	19,28	20,02	20,21	20,87	21,37	20,21	20,33 +/- 0,58
20	32,32	30,61	33,00	32,06	33,30	32,72	32,34 +/- 0,77
25	48,75	43,41	46,82	45,11	48,07	44,32	46,08 +/- 1,71
30	65,50	62,00	57,31	58,75	57,10	59,35	60,00 +/- 2,58
35	71,32	68,99	71,42	71,53	71,10	70,82	70,86 +/- 0,76
40	87,12	82,12	86,91	85,28	89,78	87,60	86,47 +/- 2,06

La curva de calibración promedio se muestra en la gráfica 3:

Gráfica 3. Curva de calibración resultante para el método SM 4500 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, E.



De la gráfica 3 se obtuvieron como parámetros de análisis la pendiente de la recta, el intercepto con el eje Y, además el coeficiente de correlación, la desviación estándar y el límite de confianza al 95 % de probabilidad de la pendiente y el intercepto con el eje Y, estos se muestran en la tabla 30. Se destaca que la curva presenta un coeficiente de correlación mayor a 0,995, lo cual permite aceptar esta curva de calibración con la cual se obtendrán los resultados de los grupos de muestras por interpolación.

Tabla 30. Parámetros estadísticos para la curva de calibración del método SM 4500 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, E.

PARÁMETRO	VALOR
Pendiente	2,53
Intercepto con eje Y	-16,50
Coeficiente de correlación	0,996
Desviación estándar pendiente	0,07
Límite de confianza pendiente	2,53 +/- 0,17
Desviación estándar intercepto	1,81
Límite de confianza intercepto	-16,50 +/- 4,66

### 7.2.2. BLANCOS Y LÍMITES DE CUANTIFICACIÓN

A partir de los datos de la tabla 31 y teniendo en cuenta que la t de Student para 5 grados de libertad es 2,5706, se estableció la señal del límite de detección y de cuantificación así:

$$\begin{aligned} \text{LDM} &= 2 \times t \times s \\ \text{LDM} &= 2 \times 2,5706 \times 0,02 \\ \text{LDM} &= 0,10 \end{aligned}$$

Donde s es la desviación estándar de la señal de los blancos en unidades nefelométricas de turbiedad (NTU).

Posteriormente se calculó la señal del límite de cuantificación así:

$$\begin{aligned} \text{LCM} &= 10 \times s \\ \text{LCM} &= 10 \times 0,02 \\ \text{LCM} &= 0,20 \end{aligned}$$

Este cálculo se realizó con el propósito de dar cumplimiento al plan de estandarización implementado, sin embargo el valor tan bajo de concentración no es viable debido a la información del método, donde se especifica que el rango lineal para el método SM 4500  $\text{SO}_4^{2-}$  E es entre 10 y 40 mg  $\text{SO}_4^{2-}$ /L (Rice, Baird, Eaton & Clesceri, 2012). Justamente es el patrón de 10 mg  $\text{SO}_4^{2-}$ /L el seleccionado como LCM y verificado analíticamente para corroborar la reproducibilidad de dicho valor como se observa en la tabla 31.

A partir de los resultados obtenidos para la verificación analítica de los blancos y los límites de cuantificación se realizó el análisis estadístico de los datos. Los resultados se muestran en la tabla 33:

Tabla 31. Resultados en mg  $\text{SO}_4^{2-}$ /L para blancos y patrones con concentración equivalente al límite de cuantificación del método SM 4500  $\text{SO}_4^{2-}$ , E.

ENSAYO	BLANCOS (NTU)	BLANCOS mg $\text{SO}_4^{2-}$ /L	LCM 10 mg $\text{SO}_4^{2-}$ /L
1	0,02	6,53	10,79
2	0,00	6,52	10,63
3	0,02	6,53	10,83
4	0,02	6,53	11,56
5	0,02	6,53	11,41
6	0,05	6,54	10,66

Se evaluó la presencia de datos anómalos dentro de los conjuntos de resultados, esto se hizo calculando el estadístico G, esto con el fin de aceptar o rechazar la hipótesis nula de que los datos sospechosos son datos anómalos, así como se muestra en la tabla 32:

Tabla 32. Resultados de G para el contraste de Grubbs de datos sospechosos en blancos y LCM, para un nivel de confianza del 95 % la G crítica para n=6 es 1,88.

ENSAYO	BLANCOS	LCM 10 mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L
1	0,627	0,478
2	1,379	0,879
3	0,125	0,368
4	0,125	1,449
5	0,125	1,067
6	1,630	0,791

Se destaca que el estadístico G para ningún ensayo excede el G crítico para ese número de ensayos, por lo tanto la hipótesis de que estos conjuntos de datos sospechosos son anómalos se rechaza.

A partir de esta información se obtienen las magnitudes estadísticas destinados a la evaluación de la precisión y la exactitud.

Tabla 33. Magnitudes estadísticas obtenidas para los blancos y los límites de cuantificación del método SM 4500 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, E.

MAGNITUD ESTADÍSTICA	BLANCOS	LCM 10 mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L
$\hat{x}$	6,53	10,98
S	0,005	0,402
%CV	0,080	3,660
% Error	-	9,802

Estos resultados cumplen con los criterios de aceptabilidad para la evaluación de la precisión y la exactitud.

### 7.2.3. PATRONES, MUESTRAS Y MUESTRAS ADICIONADAS

A continuación se muestran los resultados obtenidos por los 3 analistas durante los días de análisis en la tabla 34, en esta están agrupados los resultados de todos los grupos de muestras sin distinguir entre analistas.

Tabla 34. Resultados en mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L para patrones, muestras y muestras adicionadas del método SM 4500 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, E.

ENSAYO	RB	RM	RA	MS	MR	MSRA	MRRB
1	14,55	18,70	34,27	6,573	73,296	39,709	73,190
2	14,00	19,21	33,80	6,585	70,499	39,753	79,512
3	14,00	19,26	35,30	6,581	67,211	38,800	76,087
4	13,83	18,90	35,212	6,596	65,852	41,266	78,669
5	13,79	19,65	35,615	6,612	64,997	36,498	81,224
6	13,72	19,93	36,098	6,616	65,867	39,519	84,622
7	13,96	22,34	34,505	6,600	61,204	37,741	79,538
8	13,62	22,17	35,039	6,577	60,598	39,045	79,486
9	14,52	19,72	37,089	6,585	64,628	38,077	78,932
10	13,90	19,30	35,497	6,596	62,389	38,105	76,272
11	13,87	19,72	36,277	6,600	60,767	38,201	77,231
12	14,24	18,93	35,107	6,577	61,083	38,371	77,204

Se evaluó la presencia de datos anómalos dentro de los conjuntos de resultados, esto se hizo calculando el estadístico G en la tabla 35, esto con el fin de aceptar o rechazar la hipótesis nula de que los datos sospechosos son datos anómalos:

Tabla 35. Resultados de G para el contraste de Grubbs de datos sospechosos, para un nivel de confianza del 95 % la G crítica para n=12 es 2,285.

ENSAYO	RB	RM	RA	MS	MR	MSRA	MRRB
1	1,875	0,932	1,156	1,312	2,089	0,781	1,851
2	0,001	0,510	1,681	0,483	1,395	0,817	0,354
3	0,001	0,463	0,024	0,759	0,581	0,035	0,840

4	0,561	0,767	0,116	0,345	0,244	2,059	0,060
5	0,708	0,143	0,330	1,450	0,033	1,854	0,951
6	0,962	0,091	0,864	1,726	0,248	0,625	2,136
7	0,132	2,103	0,898	0,621	0,907	0,834	0,363
8	1,283	1,964	0,308	1,036	1,057	0,236	0,345
9	1,768	0,080	1,961	0,483	0,059	0,558	0,152
10	0,360	0,437	0,199	0,345	0,614	0,535	0,776
11	0,435	0,079	1,062	0,621	1,016	0,456	0,442
12	0,796	0,746	0,232	1,036	0,937	0,317	0,451

De acuerdo con estos resultados, cabe notar que el estadístico G para ningún ensayo excede el G crítico para ese número de ensayos, por lo tanto la hipótesis de que algún dato sospechoso es anómalo debe ser rechazada.

A partir de esta información se obtienen las magnitudes estadísticas destinados a la evaluación de la precisión y la exactitud, estas se observan en la tabla 36.

Tabla 36. Magnitudes estadísticas obtenidas para los patrones, muestras y muestras adicionadas del método SM 4500 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, E.

MAGNITUD ESTADÍSTICA	Bk	RB	RM	RA	MS	MR	MSRA	MRRB
$\hat{x}$	6,53	14,00	19,82	35,32	6,59	64,87	38,76	78,50
S	0,005	0,295	1,206	0,904	0,014	4,037	1,219	2,868
%CV	0,08	2,11	6,04	2,56	0,22	6,22	3,14	3,65
% Recuperación	-	-	-	-	-	-	91,90	97,37
% Error	-	0,01	0,91	0,91	-	-	-	-

De la tabla 36 se puede observar que todos los grupos de muestras cumplen con los criterios de aceptabilidad preestablecidos para la caracterización de la precisión y la exactitud del método, lo cual permite concluir que el método es aceptable para los propósitos del laboratorio de análisis. Además permite determinar que el método es

repetible ya que no se encuentran diferencias significativas entre los resultados obtenidos de forma consecutiva.

Los resultados obtenidos para la muestra superficial (MS) en la tabla 36 no son fiables para la cuantificación, sin embargo el analito está siendo detectado, por lo tanto se aplicó el análisis estadístico correspondiente y se usó el valor para calcular el porcentaje de recuperación en las muestras fortificadas.

#### 7.2.4. REPRODUCIBILIDAD

Se analizó por separado cada grupo de muestras, teniendo en cuenta los 4 análisis realizados por cada analista.

##### 7.2.4.1. PATRONES DE CONTROL

A continuación se muestran los resultados en las tablas 37, 38 y 39 para los rangos bajo, medio y alto respectivamente, seleccionados para el proceso de estandarización.

Tabla 37. Resultados por analista para los rangos bajos, el F teórico para una prueba de una cola es  $F_{9,2} = 19,38$

ANALISTA	RB 1	RB 2	RB 3	RB 4	S <sup>2</sup> <sub>dentro muestra</sub>	S <sup>2</sup> <sub>entre muestras</sub>	F <sub>calculado</sub>
1	14,554	14,001	14,001	13,835	7,17x10 <sup>-2</sup> para 9 g.l	9.80x10 <sup>-3</sup> Para 2 g.l	7,31
2	13,792	13,717	13,962	13,622			
3	14,523	13,895	13,872	14,236			

Tabla 38. Resultados por analista para los rangos medios, el F teórico para una prueba de una cola es  $F_{9,2} = 19,38$

ANALISTA	RM 1	RM 2	RM 3	RM 4	S <sup>2</sup> <sub>dentro muestra</sub>	S <sup>2</sup> <sub>entre muestras</sub>	F <sub>calculado</sub>
1	18,703	19,209	19,265	18,901	7,53x10 <sup>-1</sup> para 9 g.l	2,80x10 <sup>-1</sup> Para 2 g.l	2,69
2	19,648	19,928	22,335	22,169			



3	19,723	19,296	19,724	18,926			
---	--------	--------	--------	--------	--	--	--

Tabla 39. Resultados por analista para los rangos altos, el F teórico para una prueba de una cola es  $F_{9,2} = 19,38$

ANALISTA	RA 1	RA 2	RA 3	RA 4	$S^2_{dentro}$ muestra	$S^2_{entre}$ muestras	$F_{calculado}$
1	34,272	33,798	35,295	35,212	5,94x10 <sup>-1</sup> para 9 g.l	1,14x10 <sup>-1</sup> Para 2 g.l	5,23
2	35,615	36,098	34,505	35,039			
3	37,089	35,497	36,277	35,107			

#### 7.2.4.2. MUESTRAS SUPERFICIALES Y RESIDUALES

A continuación se muestran los resultados en las tablas 40 y 41 para las muestras superficiales y residuales respectivamente, seleccionados para el proceso de estandarización.

Tabla 40. Resultados por analista para las muestras superficiales, el F teórico para una prueba de una cola es  $F_{9,2} = 19,38$

ANALISTA	MS 1	MS 2	MS 3	MS 4	$S^2_{dentro}$ muestra	$S^2_{entre}$ muestras	$F_{calculado}$
1	6,573	6,585	6,581	6,596	1,77x10 <sup>-4</sup> para 9 g.l	2,05x10 <sup>-5</sup> Para 2 g.l	8,66
2	6,612	6,616	6,600	6,577			
3	6,585	6,596	6,600	6,577			

Tabla 41. Resultados por analista para las muestras residuales, el F teórico para una prueba de una cola es  $F_{9,2} = 19,38$

ANALISTA	MR 1	MR 2	MR 3	MR 4	$S^2_{dentro}$ muestra	$S^2_{entre}$ muestras	$F_{calculado}$
1	73,296	70,499	67,211	65,852	7,11 para 9 g.l	3,60 Para 2 g.l	1,97
2	64,997	65,867	61,204	60,598			
3	64,628	62,389	60,767	61,083			

### 7.2.4.3. MUESTRAS ADICIONADAS CON ANALITO

A continuación se muestran los resultados en las tablas 42 y 43 para las muestras superficiales y residuales adicionadas en patrón alto y bajo respectivamente, seleccionados para el proceso de estandarización.

Tabla 42. Resultados por analista para las muestras superficiales adicionadas con el patrón de rango alto, el F teórico para una prueba de una cola es  $F_{9,2} = 19,38$ .

ANALISTA	MSRA1	MSRA2	MSRA3	MSRA4	$S^2_{dentro}$ muestra	$S^2_{entre}$ muestras	$F_{calculado}$
1	39,709	39,753	38,800	41,266	$9,72 \times 10^{-1}$ para 9 g.l	$2,37 \times 10^{-1}$ Para 2 g.l	4,10
2	36,498	39,519	37,741	39,045			
3	38,077	38,105	38,201	38,371			

Tabla 43. Resultados por analista para las muestras residuales adicionadas con el patrón de rango bajo, el F teórico para una prueba de una cola es  $F_{9,2} = 19,38$ .

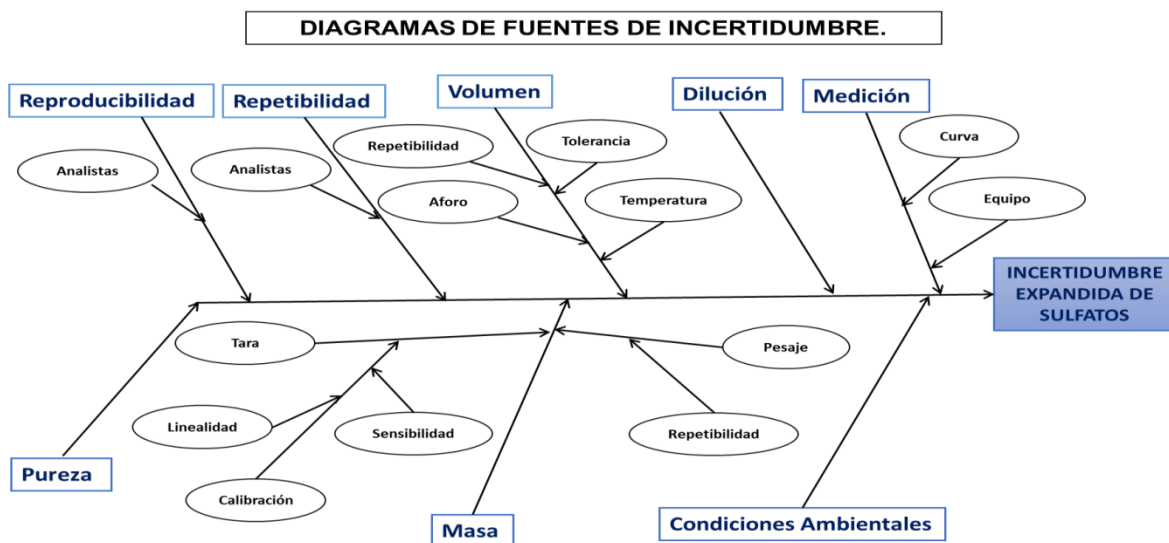
ANALISTA	MRRB1	MRRB2	MRRB3	MRRB4	$S^2_{dentro}$ muestra	$S^2_{entre}$ muestras	$F_{calculado}$
1	73,190	79,512	76,087	78,669	5,05 para 9 g.l	1,41 Para 2 g.l	3,59
2	81,224	84,622	79,538	79,486			
3	78,932	76,272	77,231	77,204			

Analizando que el F calculado no supera el F crítico para ninguno de los grupos de patrones de control (RB, RM y RA) muestras superficiales (MS), muestras residuales (MR) y muestras adicionadas (MSRA y MRRB), se acepta la hipótesis de que la varianza de los resultados obtenidos por analistas no es significativamente superior de la varianza obtenida por los resultados entre analistas.

### 7.2.5. DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO

En la gráfica 4 se muestran las fuentes de incertidumbre consideradas en el análisis estadístico para la estimación de la incertidumbre del método analítico para la determinación de sulfatos.

Gráfica 4. Diagrama de fuentes de incertidumbre consideradas en la determinación del método SM 4500 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> E



Se expresará la incertidumbre para los patrones de control de rango bajo y alto. Esta medida del sesgo en los resultados analíticos sirve para estimar la incertidumbre en los análisis de muestras superficiales y residuales ya que las fuentes de incertidumbre consideradas son las mismas.

El procedimiento para el cálculo de la incertidumbre se encuentra en el anexo 2.

Se muestra en la tabla 44 las incertidumbres estándar relativas para cada fuente de incertidumbre que afecta la determinación de los patrones de rango bajo (RB) y a partir de esta se procede a calcular la incertidumbre estándar combinada.

Tabla 44. Incertidumbres estándar relativas para los resultados obtenidos con los patrones de rango bajo RB.

FUENTE DE INCERTIDUMBRE	INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA
Incertidumbre del peso de patrón de 100	6,18E-04
Incertidumbre del peso de patrón de 700	3,53E-04
Incertidumbre pureza del patrón	5,78E-04
Incertidumbre peso molecular patrón	2,09E-05

Incertidumbre dilución para solución patrón de 100	6,43E-04
Incertidumbre dilución para solución patrón de 700	6,93E-04
Incertidumbre mediciones en el turbidímetro	3,05E-04
Incertidumbre de la alícuota de análisis	8,39E-04
Incertidumbre alícuota para preparar RB	5,80E-03
Incertidumbre aforo del estándar RB	8,39E-04
Incertidumbre reproducibilidad mediciones RB	6,09E-03
Incertidumbre de curva de calibración para determinación de los RB	3,10E-02

Incertidumbre estándar combinada total:

$$U_c = 3,21 \times 10^{-2}$$

Con este dato se calcula la incertidumbre expandida considerando un factor de cobertura igual a 2 para una distribución normal con un nivel de confianza del 95,45 %, además se multiplica por el valor del rango bajo que corresponde a 14 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L:

$$U = 3,21 \times 10^{-2} \times 2 \times 14$$

$$U = 0,90$$

Porcentaje de incertidumbre en los resultados obtenidos para los patrones de control de rango bajo:

$$\frac{0,90}{14} \times 100\% = 6,43 \%$$

Los resultados se expresan como: 14,0 ± 0,90 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L.

De igual manera se calcula la incertidumbre para los resultados obtenidos con los patrones de control de rango alto:

Tabla 45. Incertidumbres estándar relativas para los resultados obtenidos con los patrones de rango alto RA.

FUENTE DE INCERTIDUMBRE	INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA
Incertidumbre del peso de patrón de 100	6,18E-04
Incertidumbre del peso de patrón de 700	3,53E-04
Incertidumbre pureza del patrón	5,78E-04
Incertidumbre peso molecular patrón	2,09E-05
Incertidumbre dilución para solución patrón de 100	6,43E-04
Incertidumbre dilución para solución patrón de 700	6,93E-04
Incertidumbre mediciones en el turbidímetro	7,92E-05
Incertidumbre de la alícuota de análisis	8,39E-04
Incertidumbre alícuota para preparar RA	1,93E-03
Incertidumbre aforo del estándar RA	8,39E-04
Incertidumbre reproducibilidad mediciones RA	7,45E-03
Incertidumbre de curva de calibración para determinación de los RA	1,23E-02

Incertidumbre estándar combinada total como la raíz de la sumatoria de los cuadrados de las incertidumbres estándar relativas, de acuerdo con esto se obtiene el siguiente valor:

$$U_c = 1,46 \times 10^{-2}$$

Con este dato se calcula la incertidumbre expandida considerando un factor de cobertura igual a 2 para una distribución normal con un nivel de confianza del 95,45 %, además se multiplica por el valor del rango alto que corresponde a 35 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L:

$$U = 1,46 \times 10^{-2} \times 2 \times 35$$

$$U = 1,02$$

Porcentaje de incertidumbre en los resultados obtenidos para los patrones de control de rango alto:

$$\frac{1,02}{35} \times 100\% = 2,92\%$$

Los resultados se expresan como: 35,0 ± 1,02 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L.

### 7.3. DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO

#### 7.3.1. CURVA DE CONSUMO DE OXÍGENO POR PARTE DEL INÓCULO

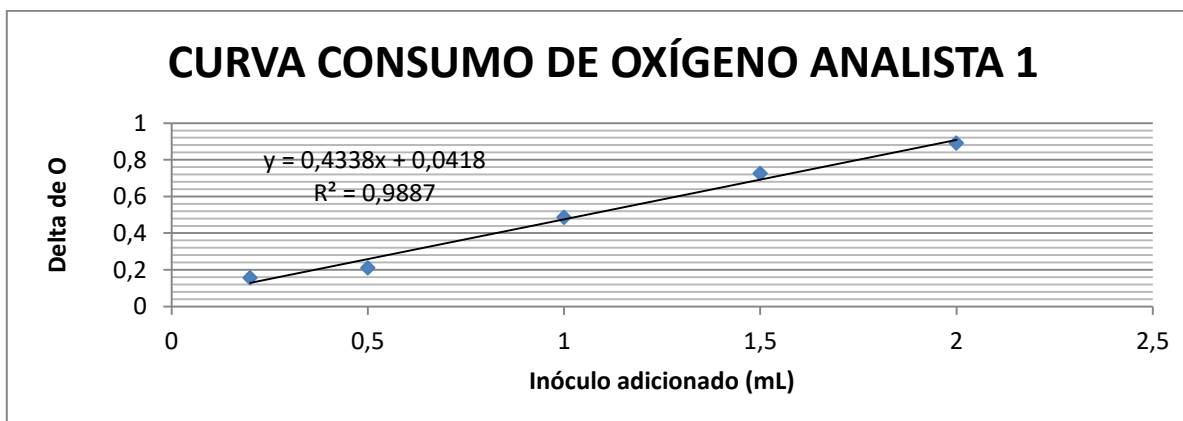
Se incubaron varios blancos de inóculo, se prepararon entre los dos analistas, el mismo día, esto con el fin de evaluar el desempeño de la cepa.

En la tabla 46 se muestra las cantidades de inóculo sembradas y los promedios de los consumos de oxígeno para los puntos sembrados por cada analista. Las gráficas 5 y 6 muestran el comportamiento del inóculo utilizado.

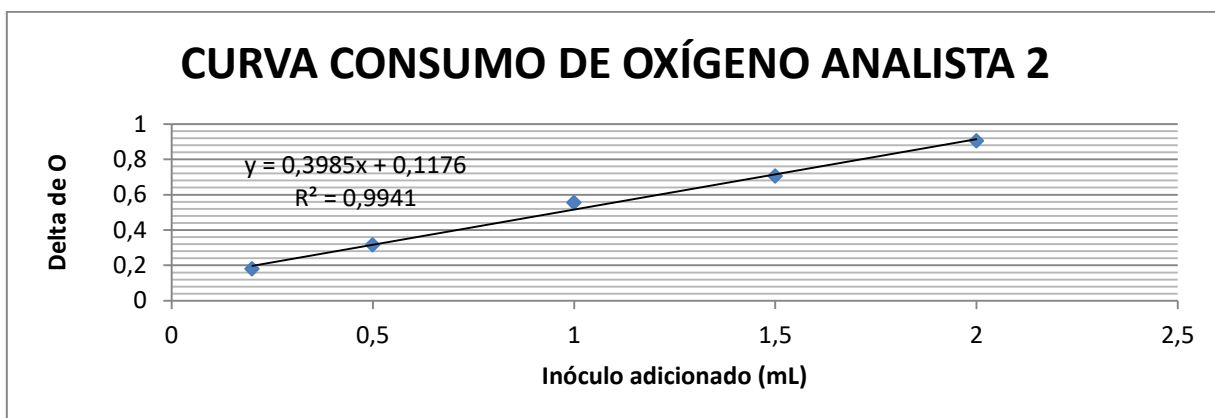
Tabla 46. Blancos de inóculo sembrados por cada analista, variando la cantidad de agua de semilla para evaluar el consumo, desempeño y toxicidad de la cepa seleccionada.

VOLUMEN DE INÓCULO (mL)	CONSUMO DE OXÍGENO (mg O <sub>2</sub> /L)	
	ANALISTA 1	ANALISTA 2
0,2	0,155	0,180
0,5	0,210	0,315
1,0	0,485	0,555
1,5	0,725	0,705
2,0	0,890	0,905

Gráfica 5. Representación gráfica del consumo de oxígeno en función del volumen de inóculo utilizado por el analista 1.



Gráfica 6. Representación gráfica del consumo de oxígeno en función del volumen de inóculo utilizado por el analista 2.



Es importante observar la buena linealidad de los resultados, además de destacar que el intercepto de las curvas es menor a 0,2 mg O<sub>2</sub>/L, lo cual es el valor esperado para los blancos de análisis.

Se observa una diferencia significativa entre las curvas obtenidas para cada analista, esta es una visualización del error aleatorio introducido al evaluarse el método entre dos analistas, sin embargo este efecto se compensa al momento de que cada analista realiza los cálculos con su cepa estandarizada, esto se confirma con la evaluación de la repetibilidad de los resultados.

### 7.3.2. BLANCOS

A partir de los resultados obtenidos para los blancos se realizó un análisis de precisión de los datos y de verificación de datos sospechosos mediante el contraste de Grubbs, seguidamente se verificó de forma analítica el límite de cuantificación establecido por el laboratorio. Los resultados se muestran en la tabla 47, donde se muestran los resultados para blancos.

Tabla 47. Resultados en mg O<sub>2</sub>/L para blancos del método SM 5210 B

Ensayo	Blancos
1	0,150
2	0,110

3	0,140
4	0,100
5	0,120
6	0,110
7	0,050
8	0,050
9	0,010
10	0,080
11	0,110
12	0,100

Se evaluó la presencia de datos anómalos dentro de los conjuntos de resultados, esto se hizo calculando el estadístico G, así como se muestra en la tabla 48:

Tabla 48. Resultados de G para el contraste de Grubbs de datos sospechosos en blancos, para un nivel de confianza del 95 % la G crítica para n=12 es 2,29.

<b>Ensayo</b>	<b>Blancos</b>
1	1,384
2	0,393
3	1,136
4	0,145
5	0,641
6	0,393
7	1,095
8	1,095
9	2,087
10	0,351
11	0,393
12	0,145



Se destaca que el estadístico G para ningún ensayo excede el G crítico para ese número de ensayos, por lo tanto la hipótesis de que estos conjuntos de datos sospechosos son anómalos se rechaza.

En la tabla 49 se representan las magnitudes estadísticas destinados a la evaluación de la precisión y la exactitud.

Tabla 49. Magnitudes estadísticas obtenidas para los blancos del método SM 5210 B

<b>MAGNITUD ESTADÍSTICA</b>	<b>Blancos</b>
$\hat{x}$	0,094
S	0,040
%CV	42,8
% Error	-

Es importante evaluar el alto coeficiente de variación obtenido para los blancos, sin embargo es algo esperado debido a las difíciles características del método, además es importante recalcar que el criterio de aceptabilidad de los blancos es referente al consumo de oxígeno, el cual no debe exceder de 0,2 mg O<sub>2</sub>/L en el lapso de 5 días, característica que se está cumpliendo y prueba inequívoca de las excelentes características fisicoquímicas del agua seleccionada para el desarrollo de las metodologías analíticas.

Estos resultados cumplen con los criterios de aceptabilidad para la evaluación de la precisión y la exactitud.

### 7.3.3. PATRONES Y MUESTRAS

A continuación se muestran los resultados obtenidos por los 2 analistas durante los días de análisis, en esta están agrupados los resultados de todos los grupos de patrones y muestras sin distinguir entre analistas.

Tabla 50. Resultados en mg O<sub>2</sub>/L para patrones de control y muestras del método SM 5210 B

<b>ENSAYO</b>	<b>LCM</b>	<b>P200</b>	<b>MS</b>	<b>MR</b>
1	2,232	231,98	0,465	136,80

2	1,860	229,48	0,615	120,00
3	2,796	229,47	0,795	127,20
4	2,004	228,97	0,765	131,40
5	2,004	207,98	0,555	129,60
6	2,676	205,48	0,765	128,40
7	2,196	304,48	0,675	126,60
8	2,700	277,98	0,645	124,20
9	1,992	193,48	0,525	132,60
10	1,836	201,98	9,29	137,40
11	2,424	218,98	17,84	132,60
12	1,944	199,98	6,44	128,40

Se evaluó la presencia de datos anómalos dentro de los conjuntos de resultados, esto se hizo calculando el estadístico G, esto con el fin de aceptar o rechazar la hipótesis nula de que los datos sospechosos son datos anómalos, así como se muestra en la tabla 51:

Tabla 51. Resultados de G para patrones de control y muestras, para un nivel de confianza del 95 % la G crítica para n=12 es 2,285.

<b>ENSAYO</b>	<b>LCM</b>	<b>P200</b>	<b>MS</b>	<b>MR</b>
1	0,029	0,135	0,522	1,446
2	1,049	0,059	0,494	1,927
3	1,663	0,059	0,460	0,482
4	0,631	0,044	0,466	0,361
5	0,631	0,591	0,505	0,000
6	1,315	0,667	0,466	0,241
7	0,075	2,329	0,483	0,602
8	1,385	1,527	0,488	1,084
9	0,666	1,030	0,510	0,602
10	1,118	0,773	1,113	1,566
11	0,585	0,258	2,697	0,602
12	0,805	0,833	0,585	0,241

De acuerdo con estos resultados, cabe notar que el estadístico G para ningún ensayo perteneciente al grupo de ensayos correspondientes a los límites de cuantificación y a las muestras residuales excede el G crítico para ese número de ensayos, por lo tanto la hipótesis de que algún dato sospechoso es anómalo debe ser rechazada.

Sin embargo es necesario hacer un paréntesis y analizar los ensayos correspondientes a los patrones de control y a las muestras superficiales. En el primer caso, referente a los patrones de control P200, se observa que el ensayo número 7 excede el G crítico, por lo tanto este dato sospechoso si es anómalo y debe ser rechazado. De esta forma la desviación estándar de ese grupo de muestras disminuye de 33,042 a 23,55 y el promedio pasa de 227,52 mg O<sub>2</sub>/L a 220,52 mg O<sub>2</sub>/L; adicionalmente, al rechazar este dato el G calculado del ensayo 8 aumenta a 2,44 y permite ser rechazado ya que el G crítico para una población de 11 datos es de: 2,23. Este proceso además mejora los resultados concernientes a los atributos estadísticos.

En lo relacionado a los resultados obtenidos con las muestras superficiales, cabe resaltar el resultado obtenido para el valor de G por el ensayo 11 el cual excede el G crítico para ese número de ensayos, por lo tanto ese dato sospechoso puede ser descartado; al realizar esto la desviación estándar disminuye de 5,40 a 2,99 y el G calculado para el ensayo 10 aumenta a 2,452, el cual excede el G crítico para 11 ensayos de 2,23 y también puede ser rechazado, de esta forma la desviación estándar vuelve a disminuir de 2,99 a 1,83 y el G calculado para el ensayo 12 aumenta a 2,841, el cual excede el G crítico para 10 datos que es de 2,18. Este proceso también mejora notablemente los parámetros estadísticos obtenidos para este grupo de muestras.

No es conveniente el rechazo de tres datos en una población de 12 datos; el motivo para hacerlo es la observación de que todos los otros resultados se encuentran por debajo del límite de cuantificación establecido para el método, debido a esta observación y a la difícil reproducibilidad de resultados por debajo del límite de cuantificación, se decide concluir que el valor excesivo para la DBO de los ensayos 10, 11 y 12 debe ser producto de contaminación en las botellas y por lo tanto los resultados obtenidos son anómalos y deben ser rechazados.

A partir de esta información se obtienen las magnitudes estadísticas destinados a la evaluación de la precisión y la exactitud, estos se calculan sobre el grupo de resultados después del proceso de rechazo de datos, se observan en la tabla 52.

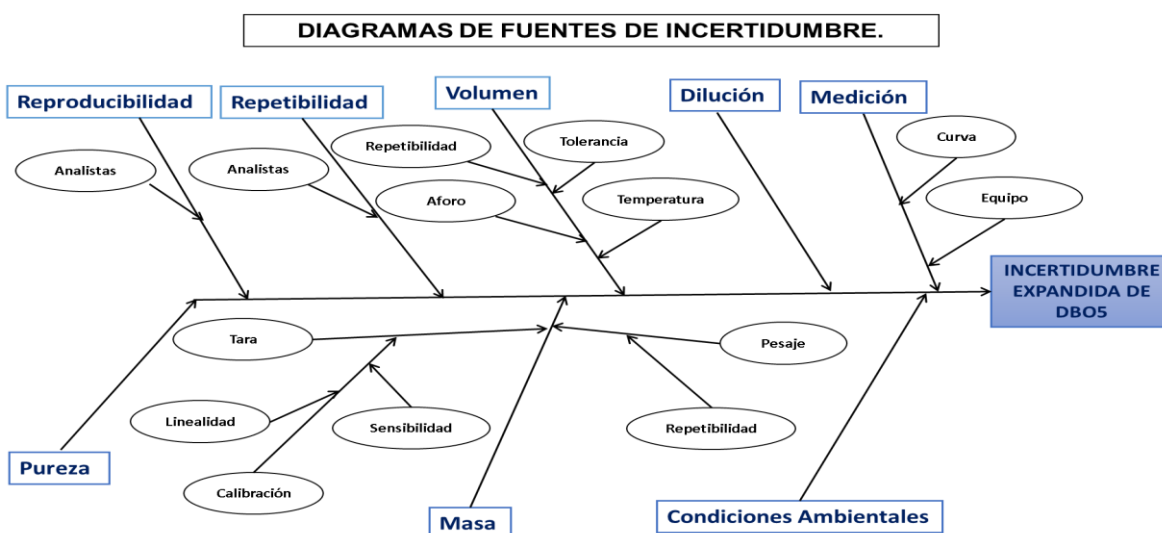
Tabla 52. Magnitudes estadísticas obtenidas para los patrones de control y las muestras del método SM 5210 B.

MAGNITUD ESTADÍSTICA	LCM	P200	MS	MR
$\hat{x}$	2,222	214,778	0,645	129,60
S	0,345	14,590	0,116	4,981
%CV	15,536	6,793	18,014	3,843
% Error	11,100	8,474		

De la tabla 52 se puede observar que todos los grupos de muestras cumplen con los criterios de aceptabilidad preestablecidos para la caracterización de la precisión y la exactitud del método, lo cual permite concluir que el método es aceptable para los propósitos del laboratorio de análisis. Además permite determinar que el método es reproducible ya que no se encuentran diferencias significativas entre los resultados obtenidos de forma consecutiva.

### 7.3.4. Determinación de la incertidumbre del método

Gráfica 7. Diagrama de fuentes de incertidumbre consideradas en la determinación del método SM 5210 B-ASTM D888-12E1-C.



Se expresará la incertidumbre para los patrones de control con concentración equivalente al límite de cuantificación que corresponde a 2 mg O<sub>2</sub>/L y al patrón con concentración de 198 mg O<sub>2</sub>/L.

El procedimiento para el cálculo de la incertidumbre se encuentra en el anexo 3.

Se muestra en la tabla 53 las incertidumbres estándar relativas para cada fuente de incertidumbre que afecta la determinación de los límites de cuantificación (LCM) y a partir de esta se procede a calcular la incertidumbre estándar combinada.

Tabla 53. Incertidumbres estándar relativas para los resultados obtenidos con los límites de cuantificación del método SM 5210 B.

<b>FUENTE DE INCERTIDUMBRE</b>	<b>INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA</b>
Incertidumbre del peso de la glucosa	6,09E-04
Incertidumbre del peso del ácido glutámico	6,09E-04
Incertidumbre pureza glucosa	2,89E-04
Incertidumbre pureza ácido glutámico	5,83E-05
Incertidumbre peso molecular glucosa	1,66E-05
Incertidumbre peso molecular ácido glutámico	1,66E-05
Incertidumbre dilución solución patrón	6,43E-04
Incertidumbre del oxímetro para los patrones de control	3,12E-02
Incertidumbre en la medición de la alícuota para dilución de P200 a LCM	2,36E-02
Incertidumbre en el aforo de los patrones de control LCM	6,93E-04
Incertidumbre reproducibilidad LCM	4,98E-02

De acuerdo con estos resultados se calcula la incertidumbre estándar combinada como la raíz de la sumatoria de los cuadrados de las incertidumbres estándar relativas, de acuerdo con esto se obtiene el siguiente valor:

$$U_c = 6,33 \times 10^{-2}$$

Con este dato se calcula la incertidumbre expandida considerando un factor de cobertura igual a 2 para una distribución normal con un nivel de confianza del 95,45 %, además se multiplica por el valor del límite de cuantificación que corresponde a 2 mg O<sub>2</sub>/L:

$$U = 6,33 \times 10^{-2} \times 2 \times 2$$

$$U = 0.25$$

Se estima el porcentaje de incertidumbre en los resultados obtenidos para los límites de cuantificación:

$$\frac{0,25}{2} \times 100\% = 12,67 \%$$

Los resultados se expresan como: 2,0 ± 0,25 mg O<sub>2</sub>/L.

De igual manera se calcula la incertidumbre para los resultados obtenidos con los patrones de control P200:

Tabla 54. Incertidumbres estándar relativas para los resultados obtenidos con los patrones de control P200 del método SM 5210 B.

<b>FUENTE DE INCERTIDUMBRE</b>	<b>INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA</b>
Incertidumbre del peso de la glucosa	6,09E-04
Incertidumbre del peso del ácido glutámico	6,09E-04
Incertidumbre pureza glucosa	2,89E-04
Incertidumbre pureza ácido glutámico	5,83E-05
Incertidumbre peso molecular glucosa	1,66E-05
Incertidumbre peso molecular ácido glutámico	1,66E-05
Incertidumbre dilución solución patrón	6,43E-04
Incertidumbre del oxímetro para los patrones de control	1,34E-02
Incertidumbre en la medición de la alícuota de análisis para P200	9,83E-03
Incertidumbre reproducibilidad P200	2,33E-02

Incertidumbre estándar combinada como la raíz de la sumatoria de los cuadrados de las incertidumbres estándar relativas, se obtiene el siguiente valor:

$$U_c = 2,87 \times 10^{-2}$$

Con este dato se calcula la incertidumbre expandida considerando un factor de cobertura igual a 2 para una distribución normal con un nivel de confianza del 95,45 %, además se multiplica por el valor del patrón que corresponde a 198 mg O<sub>2</sub>/L:

$$U = 2,87 \times 10^{-2} \times 2 \times 198$$

$$U = 11,35$$

Se estima el porcentaje de incertidumbre en los resultados obtenidos para los patrones de control P200:

$$\frac{11,35}{198} \times 100\% = 5,73 \%$$

Los resultados se expresan como: 198 ± 11,35 mg O<sub>2</sub>/L.

## **8. CONCLUSIONES**

Se cumplió con el proceso de estandarización de los métodos seleccionados para la determinación de fósforo reactivo soluble, sulfatos y demanda bioquímica de oxígeno en los tiempos propuestos, esto queda demostrado por la estimación y cumplimiento de los atributos estadísticos seleccionados para la evaluación del desempeño de los métodos analíticos.

Se estimaron los parámetros estadísticos para cada método analítico implementado, además se determinó la incertidumbre de las medidas realizadas durante el proceso de estandarización

Se emitió la documentación necesaria para evidenciar y demostrar el cumplimiento de los objetivos de estandarización, esto como parte de las metas propuestas para la implementación del sistema de gestión de calidad que satisfaga los requerimiento de la norma NTC-ISO/IEC 17025 del 2005.



## 9. BIBLIOGRAFIA

ASTM D888-12E1, A. (2012). Standard Test Methods for Dissolved Oxygen in Water. Retrieved from <https://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/D888-12E1.htm>

COY, G. (2006). Estandarización De Métodos Analíticos. Retrieved from [http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38152/Estandarizacion\\_metodos\\_analaticos.pdf/934bd941-dd47-4501-8507-d2721ef4f316](http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38152/Estandarizacion_metodos_analaticos.pdf/934bd941-dd47-4501-8507-d2721ef4f316), [Accessed 15 Mar. 2017].

Currie, L. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995).

Ellison, S., & Williams, A. (2012). Cuantificación de la incertidumbre en medidas analíticas. Retrieved from [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012\\_P1\\_ES.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1_ES.pdf), [Accessed 03 Mar. 2017].

Evaluation of measurement data-Guide to the expression of uncertainty in measurement. (2008). Retrieved from [https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf](https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf), [Accessed 15 Mar. 2017].

Hsu, K., & Chen, C. (2010). The effect of calibration equations on the uncertainty of UV-Vis spectrophotometric measurements. *Measurement*, 43(10), 1525-1531. doi: 10.1016/j.measurement.2010.08.021

Miller, J., Miller, J., Maté Jiménez, C., & Izquierdo Hornillos, R. (2008). *Estadística y quimiometría para química analítica* (4th ed., pp. 51-62). Madrid: Pearson Prentice-Hall.

Norma Técnica Colombiana NTC ISO/IEC 17025:2005. Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

Normatividad Colombiana decreto 3930 2010, Resolución 0631 17 mayo de 2015.

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

Rice, E., Baird, R., Eaton, A., & Clesceri, L. (2012). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 2012* (22nd ed.). Washington, DC: American Public Health Assn. Pag: 1-(6-15, 37-46), 4-(1-4, 154-155, 190-191), 5-(1-10).

Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S., & Mora Lugo, E. (2014). *Fundamentos de química analítica / Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R., Crouch ; traducción Dr. Eugenio de la Mora Lugo, M. en C. Jesús Miguel Torres Flores* (9th ed.). CENGAGE LEARNING.

Tesaurus Ambiental para Colombia. (2018). Retrieved from [http://www.invermar.org.co/redcostera1/invermar/docs/tesauro\\_ambiental/naveg.htm](http://www.invermar.org.co/redcostera1/invermar/docs/tesauro_ambiental/naveg.htm).

United Nations Official Document. (2010). Retrieved from [http://www.un.org/ga/search/view\\_doc.asp?symbol=A/RES/64/292&Lang=S](http://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/64/292&Lang=S) [Accessed 25 Jul. 2017]

Valente, T., Grande, J., de la Torre, M., Santisteban, M., & Cerón, J. (2013). Mineralogy and environmental relevance of AMD-precipitates from the Tharsis mines, Iberian Pyrite Belt (SW, Spain). *Applied Geochemistry*, 39, 11-25. doi: 10.1016/j.apgeochem.2013.09.014

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### INCERTIDUMBRE FÓSFORO REACTIVO SOLUBLE

##### INCERTIDUMBRE DEL PESO EN LA BALANZA

El primer paso consiste en calcular la incertidumbre combinada de la balanza analítica, para lo cual se hace uso del certificado de calibración del equipo. La incertidumbre combinada se obtiene así:

$$U_{c1} = \sqrt{(U_{\text{calibración}})^2 + (U_{\text{resolución}})^2}$$

Donde la U calibración corresponde a la desviación estándar reportada para el equipo con un valor de  $5,0 \times 10^{-5}$  y la U resolución se obtiene de la tolerancia reportada para el equipo igual a  $1,5 \times 10^{-4}$  dividida entre el valor obtenido de tablas de distribución normal estándar para un nivel de confianza del 95 % que equivale a 1,96

$$U_{\text{resolución}} = \frac{0,00015}{1,96} = 7,653 \times 10^{-5}$$

A partir de estos datos se obtiene la incertidumbre combinada así

$$U_{c1} = \sqrt{(5,0 \times 10^{-5})^2 + (7,653 \times 10^{-5})^2} = 9,14 \times 10^{-5}$$

De aquí se obtiene la incertidumbre estándar relativa (**IER1**) dividiendo la incertidumbre combinada entre los gramos de patrón primario utilizado para la preparación de la solución patrón de fósforo con una concentración de  $50 \text{ mg P-PO}_4^{3-}/\text{L}$ , que corresponden a  $0,2195 \text{ g de KH}_2\text{PO}_4$

$$\text{IER1} = \frac{9,14 \times 10^{-5}}{0,2195} = 4,16 \times 10^{-4}$$

##### INCERTIDUMBRE POR LA PUREZA DEL REACTIVO

En este caso se considera la pureza del reactivo reportada en el certificado de este y la tolerancia de esta medición. El certificado indica una pureza del 100 % y una tolerancia de 0,05. Primero obtenemos la fracción másica del reactivo como el cociente entre la pureza

y el 100 %, esto da un valor de 1. Seguido calculamos la incertidumbre estándar de la medición como el cociente entre la tolerancia y el porcentaje de pureza

$$S = \frac{0,05}{100} = 0,0005$$

Se obtiene la incertidumbre combinada considerando una distribución de tipo rectangular, de acuerdo con lo cual dividimos el resultado anterior entre  $\sqrt{3}$ :

$$U_{c2} = \frac{0,0005}{\sqrt{3}} = 2,89 \times 10^{-4}$$

Seguido se calcula la incertidumbre estándar relativa dividiendo la incertidumbre combinada entre la fracción másica que es igual a la unidad, por lo tanto **IER2:  $2,89 \times 10^{-4}$** .

### INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA MASA

Es necesario calcular la incertidumbre estándar combinada de la masa molar del patrón utilizado, se debe considerar la incertidumbre estándar de los pesos atómicos, estos son aportados por tablas establecidas por la IUPAC, a partir de estos calculamos el cociente de la incertidumbre estándar para cada átomo entre los límites de una distribución rectangular, es decir:

$$U_{\text{átomo}} = \frac{u \text{ peso atómico}}{\sqrt{3}} \times \# \text{ átomos}$$

Para las moléculas donde hay más de un átomo del mismo elemento es necesario multiplicar la  $U_{\text{átomo}}$  por el número de átomos presentes en la molécula, de acuerdo con esto para el patrón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  observamos los resultados en la tabla 1.

Tabla 1. Valores de incertidumbre estándar para los pesos atómicos de los elementos constituyentes del fosfato monobásico de potasio, la U atómica ya se encuentra multiplicada por el número de átomos en la molécula.

ELEMENTO	NÚMERO DE ÁTOMOS	U ATÓMICA
K	1	$5,77 \times 10^{-5}$
H	2	$8,08 \times 10^{-5}$
P	1	$1,15 \times 10^{-6}$

O	4	$6,93 \times 10^{-4}$
---	---	-----------------------

A partir de los resultados anteriores calculamos la incertidumbre estándar combinada como:

$$U_{c3} = \sqrt{(U_K)^2 + (U_H)^2 + (U_P)^2 + (U_O)^2}$$

$$U_{c3} = \sqrt{(5,77 \times 10^{-5})^2 + (8,08 \times 10^{-5})^2 + (1,15 \times 10^{-6})^2 + (6,93 \times 10^{-4})^2} = 7,0 \times 10^{-4}$$

Con este valor calculamos la incertidumbre estándar relativa al peso atómico (**IER3**) como el cociente entre la incertidumbre estándar combinada y el peso molecular del fosfato monobásico de potasio:

$$IER3 = \frac{7 \times 10^{-4}}{136,086} = 5,14 \times 10^{-6}$$

### INCERTIDUMBRE POR LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR

En este caso se considera la incertidumbre asociada a la dilución para la preparación de la solución patrón de 50 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L; se estima mediante el cálculo de las incertidumbres estándar asociadas a: La tolerancia reportada para el balón volumétrico de 1000 mL con un valor de 0,4, esta fuente se denominará (**U<sub>T</sub>**). La incertidumbre estándar debido al aforo en el balón (**U<sub>A</sub>**), en donde es necesario considerar el factor de expansión térmica del agua como componente mayoritario de la solución (0,000207 °C<sup>-1</sup>), se considera despreciable la dilatación térmica del vidrio de borosilicato. Además el rango de temperatura medido en el laboratorio, se estableció en un intervalo de 5 °C.

Para ambos casos las distribuciones de probabilidad se consideran dentro de los límites de una distribución rectangular, por lo tanto se usa un factor de  $\sqrt{3}$ . La incertidumbre asociada a la desviación estándar (**U<sub>S</sub>**) reportada en el certificado de calibración tiene un valor de 0,0596.

De esta forma:

$$U_T = \frac{0,4}{\sqrt{3}} = 0,2309$$

Y:

$$U_A = \frac{1000 \times 5 \times 0,000207}{\sqrt{3}} = 0,5976$$

Ahora calculamos la incertidumbre estándar combinada como:

$$U_{c4} = \sqrt{(U_T)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$

Reemplazando obtenemos:

$$U_{c4} = \sqrt{(0,2309)^2 + (0,5976)^2 + (0,0596)^2} = 0,643$$

Calculamos la incertidumbre estándar relativa (**IER4**) como el cociente entre la incertidumbre estándar combinada ( $U_{c4}$ ) y el volumen del balón volumétrico

$$IER4 = \frac{0,643}{1000} = 6,43 \times 10^{-4}$$

## **INCERTIDUMBRE DE PATRONES DE CONTROL**

Esta etapa toma a consideración los siguientes aportes a la incertidumbre de la medición:

- Incertidumbre del espectrofotómetro para los patrones de control.
- Incertidumbre en la medición de la alícuota de análisis.
- Incertidumbre en la medida de la alícuota para preparar los patrones de control.
- Incertidumbre en el aforo de los patrones de control.
- Incertidumbre en la reproducibilidad de los resultados para los patrones de control.

## **INCERTIDUMBRE DEL ESPECTROFOTÓMETRO PARA LOS PATRONES DE CONTROL**

La incertidumbre proviene de la resolución del espectrofotómetro, la cual es reportada por el fabricante, con un valor igual a 0,005.

La incertidumbre se ve reflejada en la aleatoriedad de los resultados de las absorbancias obtenidas para los patrones de control de rango bajo y alto. Los resultados se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Valores de absorbancias obtenidas para los patrones de control.

<b>ABSORBANCIAS RB</b>	<b>ABSORBANCIAS RA</b>
0,348	1,376
0,346	1,371
0,361	1,365
0,369	1,369
0,375	1,383
0,366	1,395
0,372	1,380
0,370	1,382
0,337	1,384
0,371	1,394
0,357	1,377
0,354	1,373
<b>PROMEDIO ABS RB</b>	<b>PROMEDIO ABS RA</b>
0,361	1,379

Se considera como fuente de incertidumbre la repetibilidad de los resultados obtenidos en las mediciones realizadas en el espectrofotómetro.

Se determina la incertidumbre combinada para la resolución del espectrofotómetro usado para las medidas analíticas de los patrones de control de rango bajo y alto respectivamente ( $U_{C5}$  y  $U_{C6}$ ), considerando una distribución de tipo rectangular.

A partir de esta información se calcula la incertidumbre estándar relativa para cada patrón de control ( $IER5$  y  $IER6$ ) respectivamente, teniendo en cuenta el promedio de las absorbancias obtenido para cada conjunto de datos.

Ahora se calcula la incertidumbre estándar para la resolución del equipo, teniendo en cuenta que  $U_{C5} = U_{C6}$ , debido a que la incertidumbre estándar depende solo de las características del equipo y no de los resultados obtenidos con el:

$$U_{R5 y 6} = \frac{0,005}{\sqrt{3}} = 2,89 \times 10^{-3}$$

De aquí se calcula la incertidumbre estándar relativa de las medidas analíticas realizadas con el espectrofotómetro para los patrones de control de rango bajo como el cociente entre la U resolución y el promedio de absorbancias (**IER<sub>5</sub>**):

$$IER_5 = \frac{2,89 \times 10^{-3}}{0,361} = 8,01 \times 10^{-3}$$

De igual manera se procede a calcular la incertidumbre estándar relativa para las medidas espectrofotométricas de los patrones de control de rango alto (**IER<sub>6</sub>**)

$$IER_6 = \frac{2,89 \times 10^{-3}}{1,379} = 2,09 \times 10^{-3}$$

## INCERTIDUMBRE EN LA MEDICIÓN DE LA ALÍCUOTA DE ANÁLISIS

Se consideran las mismas fuentes que para la preparación de la solución estándar; Las alícuotas de análisis se prepararon en balones volumétricos de 100 mL; para calcular la incertidumbre estándar relativa de la alícuota de análisis (**IER<sub>7</sub>**) se toman los datos del certificado de calibración del material referente a la tolerancia con un valor de 0,1 y la desviación estándar (**U<sub>S</sub>**) igual a 0,0118

De esta forma la incertidumbre estándar para la tolerancia **U<sub>T</sub>** se calcula como:

$$U_T = \frac{0,1}{\sqrt{3}} = 0,0577$$

La incertidumbre estándar para el aforo del balón de 100 mL **U<sub>A</sub>**, se calcula como:

$$U_A = \frac{100 \times 5 \times 0,000207}{\sqrt{3}} = 0,0598$$

Ahora calculamos la incertidumbre estándar combinada como:

$$U_{c7} = \sqrt{(U_T)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$



Reemplazando obtenemos:

$$U_{c7} = \sqrt{(0,0507)^2 + (0,0598)^2 + (0,0118)^2} = 0,084$$

Calculamos la incertidumbre estándar relativa de la alícuota de análisis (**IER<sub>7</sub>**) como el cociente entre la incertidumbre estándar combinada ( $U_{c7}$ ) y el volumen del balón volumétrico

$$IER_7 = \frac{0,084}{100} = 8,39 \times 10^{-4}$$

### **INCERTIDUMBRE EN LA MEDIDA DE LA ALÍCUOTA PARA PREPARAR LOS PATRONES DE CONTROL**

Se calculan las incertidumbres combinadas ( **$U_{c8}$**  y  **$U_{c9}$** ) para las alícuotas tomadas para la preparación de los estándares de control bajo y alto respectivamente así:

$$U_c = \sqrt{(U_R)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$

Ya que las alícuotas para los rangos bajo y alto son números decimales, las alícuotas se tomaron con una micropipeta y una transferpipeta con puntas de polipropileno con capacidad de 1 y 10 mL respectivamente con un factor de expansión térmica igual a  $0,00018 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  (Goodfellow.com, 2018). Las fuentes de incertidumbre son los valores de resolución de los dos instrumentos de medida que son 0,001 y 0,01 para la Micropipeta y la transferpipeta respectivamente, para obtener la incertidumbre estándar de la resolución ( **$U_R$** ), consideramos una distribución de tipo rectangular.

Además se determina la incertidumbre estándar de la alícuota usada para preparar los patrones de rango bajo y alto ( **$U_A$** ); donde las fuentes de incertidumbre aportantes son el volumen de la alícuota de análisis para la preparación de los patrones de control, el rango de temperaturas manejadas en el laboratorio establecido en  $5 \text{ } ^\circ\text{C}$  y la dilatación térmica del polipropileno, el factor de expansión térmica de este material es  $0,00018 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ . Se considera una distribución de probabilidad rectangular debido a la posibilidad de valores extremos.

Ya que estos instrumentos no especificaban la desviación estándar, se realizaron 7 mediciones de un volumen de agua hasta la máxima capacidad, al dividir la desviación estándar entre el número de medidas se calcula la incertidumbre debida a la repetibilidad

de los instrumentos de medición de volumen (**Us**); los resultados para la micropipeta y la transferpipeta se muestran en las tablas 3 y 4 respectivamente:

Tabla 3. Resultados para la verificación de la desviación estándar de la micropipeta de 1 mL

VOLUMEN NOMINAL (mL)	TEMPERATURA (°C)	PESO REPORTADO (g)	DENSIDAD (g/mL)	VOLUMEN CALCULADO (mL)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
1	24	0,9985	0,9974	1,0011	0,0045
1	24	0,9919	0,9974	0,9945	
1	24	1,0023	0,9974	1,0049	
1	24	1,0000	0,9974	1,0026	
1	26	1,0022	0,9969	1,0054	
1	26	1,0051	0,9969	1,0083	
1	26	1,0028	0,9969	1,0060	

Tabla 4. Resultados para la verificación de la desviación estándar de la transferpipeta de 10 mL.

VOLUMEN NOMINAL (mL)	TEMPERATURA (°C)	PESO REPORTADO (g)	DENSIDAD (g/mL)	VOLUMEN CALCULADO (mL)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
10	24	10,0753	0,9974	10,1018	0,1551
10	24	10,0309	0,9974	10,0572	
10	24	10,0085	0,9974	10,0348	
10	24	9,9863	0,9974	10,0125	
10	24	9,9647	0,9974	9,9909	
10	22	9,6200	0,9979	9,6406	

10	24	9,8746	0,9974	9,9005	
----	----	--------	--------	--------	--

Se procede a calcular las incertidumbres estándar provenientes de las 3 fuentes de incertidumbre citadas inicialmente para la preparación del rango bajo:

Se muestra inicialmente la determinación de la incertidumbre estándar para la resolución de la micropipeta ( $U_R$ ):

$$U_R = \frac{0,001}{\sqrt{3}} = 5,77 \times 10^{-4}$$

Posteriormente se calcula la incertidumbre debida a la alícuota de análisis tomada con la micropipeta ( $U_A$ ):

$$U_A = \frac{0,8 \times 5 \times 0,00018}{\sqrt{3}} = 4,16 \times 10^{-4}$$

Seguido calculamos la incertidumbre aportada por la desviación estándar del instrumento (tabla 3) ( $U_S$ ):

$$U_S = \frac{0,0045}{\sqrt{7}} = 1,70 \times 10^{-3}$$

Ahora calculamos la incertidumbre estándar combinada ( $U_{c8}$ ) para la alícuota de solución patrón de 50 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L necesarios para preparar el patrón de control de rango bajo (**RB**):

$$U_{c8} = \sqrt{(U_R)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$

$$U_{c8} = \sqrt{(5,77 \times 10^{-4})^2 + (4,16 \times 10^{-4})^2 + (1,70 \times 10^{-3})^2}$$

$$U_{c8} = 1,84 \times 10^{-3}$$

A partir de  $U_{c8}$  se calcula la incertidumbre estándar relativa debida a la alícuota para la preparación del patrón de control **RB**:

$$IER_B = \frac{1,84 \times 10^{-3}}{0,8} = 2,30 \times 10^{-3}$$

De igual forma se procede a calcular la incertidumbre estándar combinada ( $U_{c9}$ ) para la alícuota necesaria para preparar el patrón de control de rango alto **RA**

Se calcula la incertidumbre estándar aportada por la resolución de la transferpipeta:

$$U_R = \frac{0,01}{\sqrt{3}} = 5,77 \times 10^{-3}$$

Ahora se calcula la incertidumbre debida a la alícuota de análisis tomada con la transferpipeta ( $U_A$ ):

$$U_A = \frac{3,6 \times 5 \times 0,00018}{\sqrt{3}} = 1,87 \times 10^{-3}$$

Seguido se calcula la incertidumbre aportada por la desviación estándar del instrumento (tabla 4) ( $U_S$ ):

$$U_S = \frac{0,1551}{\sqrt{7}} = 5,86 \times 10^{-2}$$

Ahora se estima la incertidumbre estándar combinada ( $U_{c9}$ ) para la alícuota de solución patrón de 50 mg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L necesarios para preparar el patrón de control de rango alto (**RA**):

$$U_{c9} = \sqrt{(U_R)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$
$$U_{c9} = \sqrt{(5,77 \times 10^{-3})^2 + (1,87 \times 10^{-3})^2 + (5,86 \times 10^{-2})^2}$$
$$U_{c9} = 5,89 \times 10^{-2}$$

A partir de  $U_{c9}$  se calcula la incertidumbre estándar relativa debida a la alícuota para la preparación del patrón de control **RA**:

$$IER_9 = \frac{5,89 \times 10^{-2}}{3,6} = 1,64 \times 10^{-2}$$

## INCERTIDUMBRE EN EL AFORO DE LOS PATRONES DE CONTROL

Debido a que todos los patrones se prepararon en balones aforados de 100 mL, la incertidumbre para los patrones de control **RB** y **RA** es la misma.

Se calcula la incertidumbre combinada ( $U_{c10}$  y  $U_{c11}$ ) considerando las contribuciones aportadas por la tolerancia (0,1) y la desviación estándar ( $U_s=0,0118$ ) del material reportado por el fabricante; además de la incertidumbre aportada por el aforo del balón volumétrico:

$$U_c = \sqrt{(U_T)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$

La incertidumbre aportada por la tolerancia ( $U_T$ ) se calcula considerando una distribución de probabilidad de tipo rectangular

$$U_T = \frac{0,1}{\sqrt{3}} = 0,0577$$

La incertidumbre estándar para el aforo del balón de 100 mL ( $U_A$ ), se calcula como:

$$U_A = \frac{100 \times 5 \times 0,00021}{\sqrt{3}} = 0,061$$

Ahora se calcula la incertidumbre estándar combinada, teniendo en cuenta que  $U_{C10} = U_{C11}$ :

$$U_{C10} = \sqrt{(0,0577)^2 + (0,061)^2 + (0,0118)^2}$$

$$U_{C10} = 0,0845$$

Se determina la incertidumbre estándar relativa para el aforo de los patrones de control ( $IER_{10}$  y  $IER_{11}$ ) como el cociente entre la incertidumbre estándar combinada ( $U_{c8}$ ) y el volumen del balón volumétrico

$$IER_{10 \text{ y } 11} = \frac{0,0845}{100} = 8,45 \times 10^{-4}$$

## **INCERTIDUMBRE EN LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS PARA LOS PATRONES DE CONTROL**

Los resultados, al estar sometidos a los efectos aleatorios presentes en todo método analítico, presentan un grado de dispersión apreciable, este efecto es estimado por la determinación de la desviación estándar de los resultados obtenidos para las mediciones de los patrones de control. Los resultados para los patrones de control de rango bajo y alto se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados y desviación estándar obtenidos para los patrones de control.

<b>PATRONES RANGO BAJO 0,4 mg P- PO<sub>4</sub>/L</b>	<b>PATRONES RANGO ALTO 1,8 mg P- PO<sub>4</sub>/L</b>
0,396	1,816
0,393	1,809
0,414	1,801
0,425	1,806
0,434	1,826
0,421	1,842
0,429	1,821
0,427	1,824
0,381	1,827
0,428	1,841
0,409	1,817
0,405	1,812
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>	
0,017	0,013

Precisamente la desviación estándar permite cuantificar la incertidumbre aportada por los efectos aleatorios de la medición analítica. Se determina la incertidumbre estándar aportada por la desviación estándar para los patrones de rango bajo ( $U_S$ ) considerando una distribución normal:

$$U_S = \frac{0,017}{\sqrt{12}} = 4,84 \times 10^{-3}$$

Ahora se calcula la incertidumbre estándar combinada para la desviación estándar de los patrones de control de rango bajo ( $U_{C12}$ )

$$U_{c12} = \sqrt{(U_S)^2}$$

$$U_{c12} = \sqrt{(4,84 \times 10^{-3})^2} = 4,84 \times 10^{-3}$$

De esta manera se procede a calcular la incertidumbre estándar relativa para la desviación estándar de los patrones de control de rango bajo (**IER<sub>12</sub>**)

$$IER_{12} = \frac{4,84 \times 10^{-3}}{0,4} = 1,21 \times 10^{-2}$$

Se procede de igual forma con los resultados obtenidos para los patrones de control de rango alto, se inicia calculando la incertidumbre estándar (**U<sub>S</sub>**):

$$U_S = \frac{0,013}{\sqrt{12}} = 3,69 \times 10^{-3}$$

Ahora se calcula la incertidumbre combinada (**U<sub>c13</sub>**), para los patrones de rango alto:

$$U_{c13} = \sqrt{(3,69 \times 10^{-3})^2} = 3,69 \times 10^{-3}$$

Se finaliza determinando la incertidumbre estándar relativa para la repetibilidad de los resultados de los patrones de control de rango alto (**IER<sub>13</sub>**):

$$IER_{13} = \frac{3,69 \times 10^{-3}}{1,8} = 2,05 \times 10^{-3}$$

## **INCERTIDUMBRE DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN**

La incertidumbre de la curva de calibración se calcula con la siguiente ecuación:

$$U_c = \frac{S}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - C)^2}{S_x}}$$

Donde S es la desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal y m es la pendiente de la recta, p es el número de réplicas para cada punto evaluado, n corresponde al número de patrones empleados multiplicados por el número de repeticiones. C<sub>0</sub> es la concentración promedio del patrón en estudio, C es el promedio de las concentraciones de los patrones con los que se elabora la curva de calibración y S<sub>x</sub> es la suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas.

La desviación estándar residual se obtiene como:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n A_j + (b+m.C_j)^2}{n-2}}$$

Donde  $A_j$  son las  $j$ -ésimas absorbancias de los estándares,  $b$  el intercepto de la recta,  $m$  la pendiente,  $C_j$  corresponde a la concentración de los  $j$ -ésimos patrones usados para preparar la curva y  $n$  el número total de datos para la elaboración de la misma.

La suma de los cuadrados de los residuales de las concentraciones se obtiene así:

$$S_x = \sum_{j=1}^n (C_j - C)^2$$

De esta forma obtenemos  $U_{c14}$  y  $U_{c15}$  como las incertidumbres combinadas para la reproducibilidad de la curva de calibración elaborada:

$$U_{c14} = \frac{2,99 \times 10^{-2}}{0,724} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{30} + \frac{(0,413 - 1,040)^2}{12,84}}$$

$$U_{c14} = 1,98 \times 10^{-2}$$

Calculamos  $IER_{14}$  así:

$$IER_{14} = \frac{1,98 \times 10^{-2}}{0,4} = 4,96 \times 10^{-2}$$

Procedemos de igual forma para  $U_{c15}$ , así:

$$U_{c15} = \frac{2,99 \times 10^{-2}}{0,724} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{30} + \frac{(1,820 - 1,040)^2}{12,84}}$$

$$U_{c15} = 2,06 \times 10^{-2}$$

Calculamos  $IER_{15}$  así:

$$IER_{15} = \frac{2,06 \times 10^{-2}}{1,8} = 1,14 \times 10^{-2}$$

Tabla 6. Incertidumbres estándar relativas para el patrón de control de rango bajo.

FUENTE DE INCERTIDUMBRE	INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA
Incertidumbre del peso de patrón	4,16E-04



Incertidumbre pureza del patrón	2,89E-04
Incertidumbre peso molecular patrón	5,14E-06
Incertidumbre dilución para solución patrón	6,43E-04
Incertidumbre mediciones en el espectrofotómetro	8,01E-03
Incertidumbre de la alícuota de análisis	8,39E-04
Incertidumbre alícuota para preparar RB	2,30E-03
Incertidumbre aforo del estándar RB	8,45E-04
Incertidumbre reproducibilidad mediciones RB	1,21E-02
Incertidumbre de curva de calibración para determinación de los RB	4,96E-02

Se calcula la incertidumbre combinada total como:

$$U_c = \sqrt{\sum_{j=1}^n (IER_j)^2}$$

$$U_c = 5,17E-02$$

Se calcula la incertidumbre expandida así:

$$U = 5,17 \times 10^{-2} \times 2 \times 0,4$$

$$U = 4,14 \times 10^{-2}$$

Con esto estimamos el porcentaje de incertidumbre en los resultados obtenidos para los patrones de control de rango bajo:

$$\frac{4,14 \times 10^{-2}}{0,4} \times 100\% = 10,35 \%$$

Los resultados se expresan como:  $0,4 \pm 0,04 \text{ mg P-PO}_4^{3-}/\text{L}$ .

Tabla 7. Incertidumbres estándar relativas para el patrón de control de rango alto.

FUENTE DE INCERTIDUMBRE	INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA
Incertidumbre del peso de patrón	4,16E-04
Incertidumbre pureza del patrón	2,89E-04

Incertidumbre peso molecular patrón	5,14E-06
Incertidumbre dilución para solución patrón	6,43E-04
Incertidumbre mediciones en el espectrofotómetro	2,09E-03
Incertidumbre de la alícuota de análisis	8,39E-04
Incertidumbre alícuota para preparar RA	1,64E-02
Incertidumbre aforo del estándar RA	8,45E-04
Incertidumbre reproducibilidad mediciones RA	2,05E-03
Incertidumbre de curva de calibración para determinación de los RA	1,14E-02

Se procede de igual forma a calcular la incertidumbre combinada total para los patrones de control de rango alto:

$$U_c = 2,02E-02$$

Se calcula la incertidumbre expandida así:

$$U = 2,02 \times 10^{-2} \times 2 \times 1,8$$

$$U = 7,28 \times 10^{-2}$$

Con esto estimamos el porcentaje de incertidumbre en los resultados obtenidos para los patrones de control de rango alto:

$$\frac{7,28 \times 10^{-2}}{1,8} \times 100\% = 4,05\%$$

Los resultados se expresan como:  $1,8 \pm 0,07 \text{ mg P-PO}_4^{3-}/\text{L}$ .

## ANEXO 2

### INCERTIDUMBRE SULFATOS

#### INCERTIDUMBRE DEL PESO EN LA BALANZA

Incertidumbre combinada de la balanza analítica:

$$U_{c1} = \sqrt{(U_{\text{calibración}})^2 + (U_{\text{resolución}})^2}$$

Donde la U calibración corresponde a la desviación estándar reportada para el equipo con un valor de  $5,0 \times 10^{-5}$  y la U resolución se obtiene de la tolerancia reportada para el equipo igual a  $1,5 \times 10^{-4}$  dividida entre el valor obtenido de tablas de distribución normal estándar para un nivel de confianza del 95 % que equivale a 1,96

$$U_{\text{resolución}} = \frac{0,00015}{1,96} = 7,653 \times 10^{-5}$$

A partir de estos datos se obtiene la incertidumbre combinada así  $U_{c1} = U_{c2}$

$$U_{c1} = \sqrt{(5,0 \times 10^{-5})^2 + (7,653 \times 10^{-5})^2} = 9,14 \times 10^{-5}$$

De aquí obtenemos la incertidumbre estándar relativa para la pesada del patrón de 100 y de 700 mg  $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$  (**IER1 y IER2** respectivamente), dividiendo la incertidumbre combinada entre los gramos de patrón primario utilizado para la preparación de las soluciones patrón de sulfatos.

$$\text{IER1} = \frac{9,14 \times 10^{-5}}{0,1479} = 6,18 \times 10^{-4}$$

Y

$$\text{IER2} = \frac{9,14 \times 10^{-5}}{0,2588} = 3,53 \times 10^{-4}$$

#### INCERTIDUMBRE POR LA PUREZA DEL REACTIVO

Pureza de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ : 99,9 %

Tolerancia: 0,1

Se calcula la incertidumbre estándar de la medición como el cociente de la tolerancia entre 100

$$S = \frac{0,1}{100} = 0,001$$

Se calcula la incertidumbre combinada considerando una distribución de tipo rectangular:

$$U_{c3} = \frac{0,001}{\sqrt{3}} = 5,77 \times 10^{-4}$$

La incertidumbre estándar relativa se obtiene dividiendo la incertidumbre combinada entre la fracción másica que es igual a 0.999, por lo tanto:

$$IER3 = \frac{5,77 \times 10^{-4}}{0,999} = 5,78 \times 10^{-4}$$

#### INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA MASA

$$U_{\text{átomo}} = \frac{u \text{ peso atómico}}{\sqrt{3}} \times \# \text{ átomos}$$

Tabla 8. Valores de incertidumbre estándar para los pesos atómicos de los elementos constituyentes del sulfato de sodio, la U atómica ya se encuentra multiplicada por el número de átomos en la molécula.

ELEMENTO	NÚMERO DE ÁTOMOS	U ATÓMICA
Na	2	$2,31 \times 10^{-6}$
S	1	$2,89 \times 10^{-3}$
O	4	$6,93 \times 10^{-4}$

Se calcula la incertidumbre estándar combinada como:

$$U_{c4} = \sqrt{(U_{Na})^2 + (U_S)^2 + (U_O)^2}$$

$$U_{c3} = \sqrt{(2,31 \times 10^{-6})^2 + (2,89 \times 10^{-3})^2 + (6,93 \times 10^{-4})^2} = 2,97 \times 10^{-3}$$

Se calcula la incertidumbre estándar relativa al peso atómico (**IER4**):

$$\text{IER4} = \frac{2,97 \times 10^{-3}}{142,04} = 2,09 \times 10^{-5}$$

### **INCERTIDUMBRE POR LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR**

Se calculan dos incertidumbres relativas, la primera para la preparación del patrón de 100 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L (**IER5**) y seguido para el patrón de 700 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L (**IER6**)

Se estiman por aparte, debido a que a pesar de considerarse las mismas fuentes de incertidumbre para la dilución y aforo del patrón, se prepararon en balones de 1000 y 250 mL respectivamente cada solución madre. Para el balón de 1000 mL La tolerancia reportada es de 0,4; La incertidumbre asociada a la desviación estándar (**U<sub>s</sub>**) reportada en el certificado de calibración tiene un valor de 0,0596.

De esta forma:

$$U_T = \frac{0,4}{\sqrt{3}} = 0,2309$$

Y:

$$U_A = \frac{1000 \times 5 \times 0,000207}{\sqrt{3}} = 0,5976$$

Se calcula la incertidumbre estándar combinada como:

$$U_{c5} = \sqrt{(U_T)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$

Reemplazando obtenemos:

$$U_{c5} = \sqrt{(0,2309)^2 + (0,5976)^2 + (0,0596)^2} = 0,643$$

Se calcula la incertidumbre estándar relativa (**IER5**) como el cociente entre la incertidumbre estándar combinada (**U<sub>c4</sub>**) y el volumen del balón volumétrico

$$\text{IER5} = \frac{0,643}{1000} = 6,43 \times 10^{-4}$$

Se repite el proceso para el patrón de 700 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L considerando el volumen de 250 mL, la tolerancia para el balón de 0,15 y la desviación estándar de 0,0146:

$$U_T = \frac{0,15}{\sqrt{3}} = 0,0866$$

Y:

$$U_A = \frac{250 \times 5 \times 0,000207}{\sqrt{3}} = 0,1494$$

Se calcula la incertidumbre estándar combinada como:

$$U_{c6} = \sqrt{(U_T)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$

Reemplazando obtenemos:

$$U_{c6} = \sqrt{(0,0866)^2 + (0,1494)^2 + (0,0146)^2} = 0,173$$

Se calcula la incertidumbre estándar relativa (**IER6**) como el cociente entre la incertidumbre estándar combinada ( $U_{c5}$ ) y el volumen del balón volumétrico

$$IER6 = \frac{0,173}{250} = 6,93 \times 10^{-4}$$

## INCERTIDUMBRE DE PATRONES DE CONTROL

Esta etapa toma a consideración los siguientes aportes a la incertidumbre de la medición:

- Incertidumbre del turbidímetro para los patrones de control.
- Incertidumbre en la medición de la alícuota de análisis.
- Incertidumbre en la medida de la alícuota para preparar los patrones de control.
- Incertidumbre en el aforo de los patrones de control.
- Incertidumbre en la reproducibilidad de los resultados para los patrones de control.

## INCERTIDUMBRE DEL TURBIDÍMETRO PARA LOS PATRONES DE CONTROL

La incertidumbre proviene de la resolución del equipo, la cual es reportada por el fabricante, con un valor igual a 0,01.

Tabla 9. Valores de turbiedad obtenidas para los patrones de control.

TURBIEDAD RB	TURBIEDAD RA
17,970	70,230

18,930	69,030
18,930	72,820
18,510	72,610
18,400	73,630
18,210	74,850
18,830	70,820
20,330	72,170
20,250	77,360
18,660	73,330
18,604	75,304
19,524	72,344
<b>PROMEDIO NTU RB</b>	<b>PROMEDIO NTU RA</b>
18,929	72,875

Se determina la incertidumbre combinada para la resolución del turbidímetro usado para las medidas analíticas de los patrones de control de rango bajo y alto respectivamente ( $U_{C7}$  y  $U_{C8}$ ), considerando una distribución de tipo rectangular.

A partir de esta información se calcula la incertidumbre estándar relativa para cada patrón de control ( $IER_7$  y  $IER_8$ ) respectivamente, teniendo en cuenta el promedio de las turbiedades obtenido para cada conjunto de datos.

Incertidumbre estándar para la resolución del equipo, teniendo en cuenta que  $U_{C7} = U_{C8}$ :

$$U_{C7 y 8} = \frac{0,01}{\sqrt{3}} = 5,77 \times 10^{-3}$$

Incertidumbre estándar relativa para los patrones de control de rango bajo ( $IER_7$ ):

$$IER_7 = \frac{5,77 \times 10^{-3}}{18,929} = 3,05 \times 10^{-4}$$

Incertidumbre estándar relativa para los patrones de control de rango alto (**IER<sub>8</sub>**)

$$IER_8 = \frac{5,77 \times 10^{-3}}{72,875} = 7,92 \times 10^{-5}$$

### **INCERTIDUMBRE EN LA MEDICIÓN DE LA ALÍCUOTA DE ANÁLISIS**

Las alícuotas de análisis se prepararon en balones volumétricos de 100 mL; para calcular la incertidumbre estándar relativa de la alícuota de análisis (**IER<sub>9</sub>**) se toman los datos del certificado de calibración del material referente a la tolerancia con un valor de 0,1 y la desviación estándar (**U<sub>S</sub>**) igual a 0,0118

Incertidumbre estándar para la tolerancia **U<sub>T</sub>**:

$$U_T = \frac{0,1}{\sqrt{3}} = 0,0577$$

La incertidumbre estándar para el aforo del balón de 100 mL **U<sub>A</sub>**, se calcula como:

$$U_A = \frac{100 \times 5 \times 0,000207}{\sqrt{3}} = 0,0598$$

Se halla la incertidumbre estándar combinada como:

$$U_{c9} = \sqrt{(U_T)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$

Reemplazando obtenemos:

$$U_{c9} = \sqrt{(0,0507)^2 + (0,0598)^2 + (0,0118)^2} = 0,084$$

Ahora:

$$IER_9 = \frac{0,084}{100} = 8,39 \times 10^{-4}$$

### **INCERTIDUMBRE EN LA MEDIDA DE LA ALÍCUOTA PARA PREPARAR LOS PATRONES DE CONTROL**

Se calculan las incertidumbres combinadas (**U<sub>c10</sub>** y **U<sub>c11</sub>**) para las alícuotas tomadas para la preparación de los estándares de control bajo y alto con las pipetas de 2 y 5 mL respectivamente, así:



$$U_c = \sqrt{(U_T)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$

Se procede a calcular las incertidumbres estándar provenientes de las 3 fuentes de incertidumbre citadas inicialmente para la preparación del rango bajo:

La incertidumbre estándar para la tolerancia de la pipeta de 2 mL:

$$U_T = \frac{0,01}{\sqrt{3}} = 5,77 \times 10^{-3}$$

Posteriormente se calcula la incertidumbre debida a la alícuota de análisis tomada con la pipeta ( $U_A$ ):

$$U_A = \frac{2 \times 5 \times 0,000207}{\sqrt{3}} = 1,20 \times 10^{-3}$$

Ahora se calcula la incertidumbre estándar combinada ( $U_{c10}$ ) de la alícuota de solución patrón de 700 mg  $SO_4^{2-}/L$  necesarios para preparar el patrón de control de rango bajo (**RB**):

$$U_{c10} = \sqrt{(U_T)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$

$$U_{c10} = \sqrt{(5,77 \times 10^{-3})^2 + (1,20 \times 10^{-3})^2 + (1,00 \times 10^{-2})^2}$$

$$U_{c10} = 1,16 \times 10^{-2}$$

Incertidumbre estándar relativa debida a la alícuota para la preparación del patrón de control **RB**:

$$IER_{10} = \frac{1,16 \times 10^{-2}}{2} = 5,80 \times 10^{-3}$$

De igual forma se procede a calcular la incertidumbre estándar combinada ( $U_{c11}$ ) de la alícuota necesaria para preparar el patrón de control de rango alto **RA**

Incertidumbre estándar aportada por la tolerancia de la pipeta de 5 mL:

$$U_T = \frac{0,015}{\sqrt{3}} = 8,66 \times 10^{-3}$$

Incertidumbre debida a la alícuota de análisis tomada con la pipeta ( $U_A$ ):

$$U_A = \frac{5 \times 5 \times 0,000207}{\sqrt{3}} = 2,99 \times 10^{-3}$$

Ahora se calcula la incertidumbre estándar combinada ( $U_{C11}$ ) de la alícuota de solución patrón de 700 mg  $SO_4^{2-}/L$  necesarios para preparar el patrón de control de rango alto (**RA**):

$$U_{C11} = \sqrt{(U_T)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$

$$U_{C11} = \sqrt{(8,66 \times 10^{-3})^2 + (2,99 \times 10^{-3})^2 + (0,003)^2}$$

$$U_{C11} = 9,64 \times 10^{-3}$$

Incertidumbre estándar relativa debida a la alícuota para la preparación del patrón de control **RA**:

$$IER_{11} = \frac{9,64 \times 10^{-3}}{5} = 1,93 \times 10^{-3}$$

## INCERTIDUMBRE EN EL AFORO DE LOS PATRONES DE CONTROL

Debido a que todos los patrones se prepararon en balones aforados de 100 mL, la incertidumbre para los patrones de control **RB** y **RA** es la misma.

Se calcula la incertidumbre combinada ( $U_{C12}$  y  $U_{C13}$ ) considerando las contribuciones aportadas por la tolerancia (0,1) y la desviación estándar ( $U_S=0,0118$ ) del material reportado por el fabricante; además de la incertidumbre aportada por el aforo del balón volumétrico:

$$U_c = \sqrt{(U_T)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$

Incertidumbre aportada por la tolerancia ( $U_T$ ):

$$U_T = \frac{0,1}{\sqrt{3}} = 0,0577$$

La incertidumbre estándar para el aforo del balón de 100 mL ( $U_A$ ), se calcula como:

$$U_A = \frac{100 \times 5 \times 0,000207}{\sqrt{3}} = 0,0598$$

Incertidumbre estándar combinada, teniendo en cuenta que  $U_{C12} = U_{C13}$ :

$$U_{c12y13} = \sqrt{(0,0577)^2 + (0,0598)^2 + (0,0118)^2}$$

$$U_{c12y13} = 8,39 \times 10^{-2}$$

Incertidumbre estándar relativa del aforo de los patrones de control (**IER<sub>12</sub>** y **IER<sub>13</sub>**):

$$IER_{12y13} = \frac{8,39 \times 10^{-2}}{100} = 8,39 \times 10^{-4}$$

### INCERTIDUMBRE EN LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS PARA LOS PATRONES DE CONTROL

Los resultados para los patrones de control de rango bajo y alto se muestran en la tabla 10:

Tabla 10. Resultados y desviación estándar obtenidos para los patrones de control.

PATRONES RANGO BAJO 14 mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L	PATRONES RANGO ALTO 35 mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L
14,554	34,272
14,001	33,798
14,001	35,295
13,835	35,212
13,792	35,615
13,717	36,098
13,962	34,505
13,622	35,039
14,523	37,089
13,895	35,497
13,872	36,277
14,236	35,107
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>	
0,295	0,904

Incertidumbre estándar aportada por la desviación estándar para los patrones de rango bajo (**U<sub>s</sub>**) considerando una distribución normal:

$$U_s = \frac{0,295}{\sqrt{12}} = 8,52 \times 10^{-2}$$

Ahora se calcula la incertidumbre estándar combinada para la desviación estándar de los patrones de control de rango bajo ( $U_{c14}$ )

$$U_{c14} = \sqrt{(U_s)^2}$$

$$U_{c14} = \sqrt{(8,52 \times 10^{-2})^2} = 8,52 \times 10^{-2}$$

Incertidumbre estándar relativa de los patrones de control de rango bajo ( $IER_{14}$ )

$$IER_{14} = \frac{8,52 \times 10^{-2}}{14} = 6,09 \times 10^{-3}$$

Se procede de igual forma con los resultados obtenidos para los patrones de control de rango alto, se inicia calculando la incertidumbre estándar ( $U_s$ ):

$$U_s = \frac{0,904}{\sqrt{12}} = 2,61 \times 10^{-1}$$

Ahora se calcula la incertidumbre combinada ( $U_{c15}$ ), para los patrones de rango alto:

$$U_{c15} = \sqrt{(2,61 \times 10^{-1})^2} = 2,61 \times 10^{-1}$$

Incertidumbre estándar relativa de la repetibilidad de los resultados de los patrones de control de rango alto ( $IER_{15}$ ):

$$IER_{15} = \frac{2,61 \times 10^{-1}}{35} = 7,45 \times 10^{-3}$$

## INCERTIDUMBRE DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

La incertidumbre de la curva de calibración se calcula con la siguiente ecuación:

$$U_c = \frac{S}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - C)^2}{S_x}}$$

Donde S es la desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal y m es la pendiente de la recta, p es el número de réplicas para cada punto evaluado, n corresponde al número de patrones empleados multiplicados por el número de repeticiones.  $C_o$  es la concentración promedio del patrón en estudio, C es el promedio de

las concentraciones de los patrones con los que se elabora la curva de calibración y  $S_x$  es la suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas.

La desviación estándar residual se obtiene como:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n A_j + (b+m.C_j)^2}{n-2}}$$

Donde  $A_j$  son las  $j$ -ésimas absorbancias de los estándares,  $b$  el intercepto de la recta,  $m$  la pendiente,  $C_j$  corresponde a la concentración de los  $j$ -ésimos patrones usados para preparar la curva y  $n$  el número total de datos para la elaboración de la misma.

La suma de los cuadrados de los residuales de las concentraciones se obtiene así:

$$S_x = \sum_{j=1}^n (C_j - C)^2$$

De esta forma obtenemos  $U_{c16}$  y  $U_{c17}$  como las incertidumbres combinadas para la reproducibilidad de la curva de calibración elaborada:

$$U_{c16} = \frac{2,3448}{2,5308} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{42} + \frac{(14,00 - 25,00)^2}{4234,34}}$$

$$U_{c16} = 4,34 \times 10^{-1}$$

Se calcula  $IER_{16}$  así:

$$IER_{16} = \frac{4,34 \times 10^{-1}}{14} = 3,10 \times 10^{-2}$$

Procedemos de igual forma para  $U_{c17}$ , así:

$$U_{c17} = \frac{2,3448}{2,5308} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{42} + \frac{(35,32 - 25,00)^2}{4234,34}}$$

$$U_{c17} = 4,30 \times 10^{-1}$$

Se calcula  $IER_{17}$  así:

$$IER_{17} = \frac{4,30 \times 10^{-1}}{35} = 1,23 \times 10^{-2}$$

Ahora:

Tabla 11. Incertidumbres estándar relativas para el patrón de control de rango bajo.

FUENTE DE INCERTIDUMBRE	INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA
Incertidumbre del peso de patrón de 100	6,18E-04
Incertidumbre del peso de patrón de 700	3,53E-04
Incertidumbre pureza del patrón	5,78E-04
Incertidumbre peso molecular patrón	2,09E-05
Incertidumbre dilución para solución patrón de 100	6,43E-04
Incertidumbre dilución para solución patrón de 700	6,93E-04
Incertidumbre mediciones en el turbidímetro	3,05E-04
Incertidumbre de la alícuota de análisis	8,39E-04
Incertidumbre alícuota para preparar RB	5,80E-03
Incertidumbre aforo del estándar RB	8,39E-04
Incertidumbre reproducibilidad mediciones RB	6,09E-03
Incertidumbre de curva de calibración para determinación de los RB	3,10E-02

Se calcula la incertidumbre combinada total como:

$$U_c = \sqrt{\sum_{j=1}^n (IER_j)^2}$$

$$U_c = 3,21E-02$$

Se calcula la incertidumbre expandida así:

$$U = 3,21 \times 10^{-2} \times 2 \times 14$$

$$U = 0,90$$

Con esto estimamos el porcentaje de incertidumbre en los resultados obtenidos para los patrones de control de rango bajo:

$$\frac{0,90}{14} \times 100\% = 6,43 \%$$

Los resultados se expresan como:  $14 \pm 0,90 \text{ mg SO}_4^{2-}/\text{L}$ .

Tabla 12. Incertidumbres estándar relativas para el patrón de control de rango alto.

FUENTE DE INCERTIDUMBRE	INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA
Incertidumbre del peso de patrón de 100	6,18E-04
Incertidumbre del peso de patrón de 700	3,53E-04
Incertidumbre pureza del patrón	5,78E-04
Incertidumbre peso molecular patrón	2,09E-05
Incertidumbre dilución para solución patrón de 100	6,43E-04
Incertidumbre dilución para solución patrón de 700	6,93E-04
Incertidumbre mediciones en el turbidímetro	7,92E-05
Incertidumbre de la alícuota de análisis	8,39E-04
Incertidumbre alícuota para preparar RA	1,93E-03
Incertidumbre aforo del estándar RA	8,39E-04
Incertidumbre reproducibilidad mediciones RA	7,45E-03
Incertidumbre de curva de calibración para determinación de los RA	1,23E-02

Se procede de igual forma para calcular la incertidumbre combinada total para los patrones de control de rango alto:

$$U_c = 1,46E-02$$

Se calcula la incertidumbre expandida así:

$$U = 1,46 \times 10^{-2} \times 2 \times 35$$

$$U = 1,02$$

Con esto se estima el porcentaje de incertidumbre en los resultados obtenidos para los patrones de control de rango alto:

$$\frac{1,02}{35} \times 100\% = 2,92\%$$

Los resultados se expresan como:  $35 \pm 1,02 \text{ mg SO}_4^{2-}/\text{L}$ .

### ANEXO 3

#### INCERTIDUMBRE DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO

#### INCERTIDUMBRE DEL PESO EN LA BALANZA

Incertidumbre combinada de la balanza analítica:

$$U_c = \sqrt{(U_{\text{calibración}})^2 + (U_{\text{resolución}})^2}$$

Donde la U calibración corresponde a la desviación estándar reportada para el equipo con un valor de  $5,0 \times 10^{-5}$  y la U resolución se obtiene de la tolerancia reportada para el equipo igual a  $1,5 \times 10^{-4}$  dividida entre el valor obtenido de tablas de distribución normal estándar para un nivel de confianza del 95 % que equivale a 1,96

$$U_{\text{resolución}} = \frac{0,00015}{1,96} = 7,65 \times 10^{-5}$$

A partir de estos datos se obtiene la incertidumbre combinada para el peso de la glucosa y el ácido glutámico en la balanza analítica, considere que  $U_{c1} = U_{c2}$

$$U_{c1 y 2} = \sqrt{(5,0 \times 10^{-5})^2 + (7,653 \times 10^{-5})^2} = 9,14 \times 10^{-5}$$

Se obtiene la incertidumbre estándar relativa para la pesada del patrón compuesto, considerando el aporte por el peso de la glucosa y el ácido glutámico (**IER1 y IER2** respectivamente), dividiendo la incertidumbre combinada entre los gramos de patrón utilizados para la preparación de la soluciones estándar, téngase en cuenta que  $IER1=IER2$ .

$$IER_{1 y 2} = \frac{9,14 \times 10^{-5}}{0,15} = 6,09 \times 10^{-4}$$

#### INCERTIDUMBRE POR LA PUREZA DE LOS REACTIVOS

Pureza de Glucosa: 100 %

Tolerancia: 0,05

Se calcula la incertidumbre estándar de la medición como el cociente de la tolerancia entre 100

$$S = \frac{0,05}{100} = 0,0005$$



Incertidumbre combinada considerando una distribución de tipo rectangular:

$$U_{c3} = \frac{0,0005}{\sqrt{3}} = 2,89 \times 10^{-4}$$

La incertidumbre estándar relativa se obtiene dividiendo la incertidumbre combinada entre la fracción másica que es igual a 1, por lo tanto:

$$IER3 = \frac{2,89 \times 10^{-4}}{1} = 2,89 \times 10^{-4}$$

Para el ácido glutámico:

Pureza: 99 %

Tolerancia: 0,01

Incertidumbre estándar de la medición como el cociente de la tolerancia entre 100

$$S = \frac{0,01}{100} = 0,0001$$

Se calcula la incertidumbre combinada considerando una distribución de tipo rectangular:

$$U_{c4} = \frac{0,0001}{\sqrt{3}} = 5,77 \times 10^{-5}$$

La incertidumbre estándar relativa se obtiene dividiendo la incertidumbre combinada entre la fracción másica que es igual a 0,99, por lo tanto:

$$IER4 = \frac{5,77 \times 10^{-5}}{0,99} = 5,83 \times 10^{-5}$$

### **INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA MASA**

Para la glucosa:

Tabla 13. Valores de incertidumbre estándar para los pesos atómicos de los elementos constituyentes de la glucosa, la U atómica ya se encuentra multiplicada por el número de átomos en la molécula.

<b>ELEMENTO</b>	<b>NÚMERO DE ÁTOMOS</b>	<b>U ATÓMICA</b>

C	6	$2,77 \times 10^{-3}$
H	12	$4,85 \times 10^{-4}$
O	6	$1,04 \times 10^{-3}$

Se calcula la incertidumbre estándar combinada como:

$$U_{c5} = \sqrt{(U_C)^2 + (U_H)^2 + (U_O)^2}$$

$$U_{c5} = \sqrt{(2,77 \times 10^{-3})^2 + (4,85 \times 10^{-4})^2 + (1,04 \times 10^{-3})^2} = 3,00 \times 10^{-3}$$

Se calcula la incertidumbre estándar relativa al peso atómico (**IER5**):

$$IER5 = \frac{3,00 \times 10^{-3}}{180,16} = 1,66 \times 10^{-5}$$

Para el ácido glutámico:

Tabla 14. Valores de incertidumbre estándar para los pesos atómicos de los elementos constituyentes del ácido glutámico, la U atómica ya se encuentra multiplicada por el número de átomos en la molécula.

ELEMENTO	NÚMERO DE ÁTOMOS	U ATÓMICA
C	5	$2,31 \times 10^{-3}$
H	9	$3,64 \times 10^{-4}$
O	4	$6,93 \times 10^{-4}$
N	1	$4,04 \times 10^{-5}$

Se calcula la incertidumbre estándar combinada como:

$$U_{c6} = \sqrt{(U_C)^2 + (U_H)^2 + (U_O)^2 + (U_N)^2}$$

$$U_{c6} = \sqrt{(2,31 \times 10^{-3})^2 + (3,64 \times 10^{-4})^2 + (6,93 \times 10^{-4})^2 + (4,04 \times 10^{-5})^2} = 2,44 \times 10^{-3}$$

Se calcula la incertidumbre estándar relativa al peso atómico (**IER6**):

$$IER6 = \frac{2,44 \times 10^{-3}}{147,13} = 1,66 \times 10^{-5}$$

### INCERTIDUMBRE POR LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR

Para el balón de 1000 mL la tolerancia reportada es de 0,4; La incertidumbre asociada a la desviación estándar (**U<sub>S</sub>**) reportada en el certificado de calibración tiene un valor de 0,0596.

De esta forma:

$$U_T = \frac{0,4}{\sqrt{3}} = 0,2309$$

Y:

$$U_A = \frac{1000 \times 5 \times 0,000207}{\sqrt{3}} = 0,5976$$

Se calcula la incertidumbre estándar combinada como:

$$U_{c7} = \sqrt{(U_T)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$

Reemplazando obtenemos:

$$U_{c7} = \sqrt{(0,2309)^2 + (0,5976)^2 + (0,0596)^2} = 0,643$$

Se calcula la incertidumbre estándar relativa (**IER7**) como el cociente entre la incertidumbre estándar combinada (**U<sub>c7</sub>**) y el volumen del balón volumétrico

$$IER7 = \frac{0,643}{1000} = 6,43 \times 10^{-4}$$

### INCERTIDUMBRE DE PATRONES DE CONTROL

Esta etapa toma a consideración los siguientes aportes a la incertidumbre de la medición:

- incertidumbre del delta de oxígeno leído con la sonda de luminiscencia.
- Incertidumbre en la medición de la alícuota de análisis para P200.
- Incertidumbre en la medición de la alícuota para dilución de P200 a LCM.
- Incertidumbre en el aforo de los patrones de control LCM.
- Incertidumbre en la reproducibilidad de los resultados para los patrones de control.

## INCERTIDUMBRE DEL OXÍMETRO PARA LOS PATRONES DE CONTROL

La incertidumbre proviene de las características de tolerancia del equipo, la cual es reportada por el fabricante, con un valor igual a 0,1.

Tabla 15. Valores de delta de oxígeno disuelto obtenidas para los patrones de control.

<b>ΔO LCM</b>	<b>ΔO P200</b>
1,86	4,64
1,55	4,59
2,33	4,59
1,67	4,58
1,67	4,16
2,23	4,11
1,83	
2,25	
1,66	3,87
1,53	4,04
2,02	4,38
1,62	4,00
<b>PROMEDIO ΔO LCM</b>	<b>PROMEDIO ΔO P200</b>
1,85	4,30

Se determina la incertidumbre combinada para la resolución del oxímetro usado para las medidas analíticas de los patrones de control ( $U_{C8}$  y  $U_{C9}$ ), considerando una distribución de tipo rectangular.

Se calcula la incertidumbre estándar combinada del equipo para medición de oxígeno disuelto, teniendo en cuenta que  $U_{C8} = U_{C9}$ :

$$U_{C8 \text{ y } 9} = \frac{0,1}{\sqrt{3}} = 5,77 \times 10^{-2}$$

Incertidumbre estándar relativa para los límites de cuantificación del método LCM (**IER8**):

$$IER_8 = \frac{5,77 \times 10^{-2}}{1,85} = 3,12 \times 10^{-2}$$

Incertidumbre estándar relativa para los patrones de control P200 (**IER<sub>9</sub>**)

$$IER_9 = \frac{5,77 \times 10^{-2}}{4,30} = 1,34 \times 10^{-2}$$

### INCERTIDUMBRE EN LA MEDICIÓN DE LA ALÍCUOTA DE ANÁLISIS PARA P200

Las alícuotas de análisis de 6 mL se midieron usando una transferpipeta de 10 mL de volumen variable, los datos de incertidumbre de la resolución y desviación estándar (tabla 4 de anexos) se calcularon en el anexo 1.

Se calcula la incertidumbre estándar aportada por la resolución de la transferpipeta:

$$U_R = \frac{0,01}{\sqrt{3}} = 5,77 \times 10^{-3}$$

Ahora se calcula la incertidumbre debida a la alícuota de análisis tomada con la transferpipeta (**U<sub>A</sub>**):

$$U_A = \frac{6 \times 5 \times 0,00018}{\sqrt{3}} = 3,12 \times 10^{-3}$$

Seguido se calcula la incertidumbre aportada por la desviación estándar del instrumento (tabla 4) (**U<sub>S</sub>**):

$$U_S = \frac{0,1551}{\sqrt{7}} = 5,86 \times 10^{-2}$$

Ahora se estima la incertidumbre estándar combinada (**U<sub>c10</sub>**) para la alícuota:

$$U_{c10} = \sqrt{(U_R)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$

$$U_{c10} = \sqrt{(5,77 \times 10^{-3})^2 + (3,12 \times 10^{-3})^2 + (5,86 \times 10^{-2})^2}$$

$$U_{c10} = 5,90 \times 10^{-2}$$

A partir de **U<sub>c10</sub>** se calcula la incertidumbre estándar relativa debida a la alícuota para la preparación del patrón **P200**:

$$IER_{10} = \frac{5,90 \times 10^{-2}}{6} = 9,83 \times 10^{-3}$$

## INCERTIDUMBRE EN LA MEDICIÓN DE LA ALÍCUOTA PARA DILUCIÓN DE P200 A LCM

Las alícuotas de análisis de 2,5 mL se midieron usando la misma transferpipeta de 10 mL de volumen variable.

Solo varía la incertidumbre debido a la alícuota de análisis tomada con la transferpipeta ( $U_A$ ):

$$U_A = \frac{2,5 \times 5 \times 0,00018}{\sqrt{3}} = 1,30 \times 10^{-3}$$

Con esto se halla ( $U_{c11}$ ) para la alícuota de dilución del patrón de 200 mg  $O_2/L$  a 2 mg  $O_2/L$ :

$$U_{c11} = \sqrt{(U_R)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$
$$U_{c11} = \sqrt{(5,77 \times 10^{-3})^2 + (1,30 \times 10^{-3})^2 + (5,86 \times 10^{-2})^2}$$
$$U_{c11} = 5,89 \times 10^{-2}$$

Ahora:

$$IER_{11} = \frac{5,89 \times 10^{-2}}{2,5} = 2,36 \times 10^{-2}$$

## INCERTIDUMBRE EN EL AFORO DE LOS PATRONES DE CONTROL LCM.

La tolerancia para el balón de 250 mL es de 0,15 y la desviación estándar de 0,0146:

$$U_T = \frac{0,15}{\sqrt{3}} = 0,0866$$

Y:

$$U_A = \frac{250 \times 5 \times 0,000207}{\sqrt{3}} = 0,149$$

Se calcula la incertidumbre estándar combinada como:

$$U_{c12} = \sqrt{(U_T)^2 + (U_A)^2 + (U_S)^2}$$

Reemplazando obtenemos:

$$U_{c12} = \sqrt{(0,0866)^2 + (0,149)^2 + (0,0146)^2} = 0,173$$

Se calcula la incertidumbre estándar relativa (**IER12**) como el cociente entre la incertidumbre estándar combinada ( $U_{c12}$ ) y el volumen del balón volumétrico

$$IER12 = \frac{0,173}{250} = 6,93 \times 10^{-4}$$

### **INCERTIDUMBRE EN LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS PARA LOS PATRONES DE CONTROL.**

Los resultados de reproducibilidad para los patrones de control se muestran en la tabla 16:

Tabla 16. Resultados y desviación estándar obtenidos para los límites de cuantificación y patrones P200.

<b>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN 2 mg O<sub>2</sub>/L</b>	<b>P200 200 mg O<sub>2</sub>/L</b>
2,23	231,98
1,86	229,48
2,80	229,47
2,00	228,97
2,00	207,98
2,68	205,48
2,20	
2,70	
1,99	193,48
1,84	201,98
2,42	218,98
1,94	199,98
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>	
0,345	14,590

Incertidumbre estándar aportada por la desviación estándar para los límites de cuantificación ( $U_S$ ), considerando una distribución normal:

$$U_S = \frac{0,345}{\sqrt{12}} = 9,97 \times 10^{-2}$$

Ahora se calcula la incertidumbre estándar combinada para la desviación estándar de los límites de cuantificación ( $U_{c13}$ ):

$$U_{c13} = \sqrt{(U_S)^2}$$

$$U_{c13} = \sqrt{(9,97 \times 10^{-2})^2} = 9,97 \times 10^{-2}$$

Incertidumbre estándar relativa de los límites de cuantificación ( $IER_{13}$ )

$$IER_{13} = \frac{9,97 \times 10^{-2}}{2} = 4,98 \times 10^{-2}$$

Se procede de igual forma con los resultados obtenidos para los **P200**, se inicia calculando la incertidumbre estándar ( $U_S$ ):

$$U_S = \frac{14,59}{\sqrt{10}} = 4,614$$

Ahora se calcula la incertidumbre combinada ( $U_{c15}$ ), para los patrones de rango alto:

$$U_{c14} = \sqrt{(4,614)^2} = 4,614$$

Incertidumbre estándar relativa de los patrones **P200** ( $IER_{14}$ ):

$$IER_{14} = \frac{4,614}{198} = 2,33 \times 10^{-2}$$

Ahora:

Tabla 17. Incertidumbres estándar relativas para el límite de cuantificación del método para la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno.

FUENTE DE INCERTIDUMBRE	INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR RELATIVA
Incertidumbre del peso de la glucosa	6,09E-04
Incertidumbre del peso del ácido glutámico	6,09E-04



Incertidumbre pureza glucosa	2,89E-04
Incertidumbre pureza ácido glutámico	5,83E-05
Incertidumbre peso molecular glucosa	1,66E-05
Incertidumbre peso molecular ácido glutámico	1,66E-05
Incertidumbre dilución solución patrón	6,43E-04
Incertidumbre del oxímetro para los patrones de control	3,12E-02
Incertidumbre en la medición de la alícuota para dilución de P200 a LCM	2,36E-02
Incertidumbre en el aforo de los patrones de control LCM	6,93E-04
Incertidumbre reproducibilidad LCM	4,98E-02

Se calcula la incertidumbre combinada total como:

$$U_c = \sqrt{\sum_{j=1}^n (IER_j)^2}$$

$$U_c = 6,33E-02$$

Se calcula la incertidumbre expandida así:

$$U = 6,33 \times 10^{-2} \times 2 \times 2$$

$$U = 0,25$$

Con esto estimamos el porcentaje de incertidumbre en los resultados obtenidos para los patrones de control de rango bajo:

$$\frac{0,25}{2} \times 100 \% = 12,67 \%$$

Los resultados se expresan como:  $2 \pm 0,25 \text{ mg O}_2/\text{L}$ .

Tabla 18. Incertidumbres estándar relativas para el patrón de control P200.

FUENTE DE INCERTIDUMBRE	INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR
-------------------------	------------------------

	<b>RELATIVA</b>
Incertidumbre del peso de la glucosa	6,09E-04
Incertidumbre del peso del ácido glutámico	6,09E-04
Incertidumbre pureza glucosa	2,89E-04
Incertidumbre pureza ácido glutámico	5,83E-05
Incertidumbre peso molecular glucosa	1,66E-05
Incertidumbre peso molecular ácido glutámico	1,66E-05
Incertidumbre dilución solución patrón	6,43E-04
Incertidumbre del oxímetro para los patrones de control	1,34E-02
Incertidumbre en la medición de la alícuota de análisis para P200	9,83E-03
Incertidumbre reproducibilidad P200	2,33E-02

Incertidumbre combinada total para los patrones de control P200:

$$U_c = 2,87E-02$$

Se calcula la incertidumbre expandida así:

$$U = 2,87 \times 10^{-2} \times 2 \times 198$$

$$U = 11,35$$

Con esto se estima el porcentaje de incertidumbre en los resultados obtenidos para los patrones de control:

$$\frac{11,35}{198} \times 100 \% = 5,73 \%$$

Los resultados se expresan como:  $198 \pm 11,35 \text{ mg O}_2/\text{L}$ .

**ANEXO 4**  
**RESULTADOS DE PRUEBAS INTERLABORATORIOS**

## PERFORMANCE EVALUATION



Scheduled Study

**QT-0006663**

23-May-2017 Through 13-Jun-2017

**49837508Z**

RTC Labcode

EPA Labcode

### Participating Laboratory:

AMBILAB SAS  
Cenayda Lopez  
Calle 1A N° 4-50  
Pitalito Huila 417030 CO

Thank you for participating in study QT-0006663. Additional information about this study may be found online at [www.sigmaaldrich.com/pt](http://www.sigmaaldrich.com/pt).

Sigma-Aldrich RTC Inc.  
2931 Soldier Springs Road  
Laramie, WY 82070 USA  
1-307-742-5452  
[www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

This report shall not be reproduced except in full, without written approval of the laboratory. The data and results reported in this document are the property of the participating laboratory and are confidential. If you wish to appeal an evaluation listed in this report, please call our QA Supervisor at (307) 742-5452 or email [RTCreports@sial.com](mailto:RTCreports@sial.com)

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jennifer Duhon".

Jennifer Duhon  
Proficiency Testing Supervisor



QT-0006663  
 Concluded 06/13/2017  
 Final Report

## Sample Information

### SIMPLE NUTRIENTS - WP

PE1195-20ML / Lot LRAB3093

Analytes	Units	Gravimetric Value	Study Mean	Study Std. Dev.
Ammonia as N <sup>1,2</sup> 1515 Nutrients	mg/L	10.5±0.051	0	0
Nitrate as N <sup>1,2</sup> 1810 Nutrients	mg/L	9.06±0.046	0	0
Nitrate+nitrite as N <sup>1,2</sup> 1820 Nutrients	mg/L	9.06±0.046	0	0
Orthophosphate as P <sup>1,2</sup> 1870 Nutrients	mg/L	3.02±0.015	3.07	0.14
Ammonia as N <sup>1,2</sup> 1515	mg/L	10.5±0.051	0	0
Nitrate as N <sup>1,2</sup> 1810	mg/L	9.06±0.046	0	0
Nitrate+nitrite as N <sup>1,2</sup> 1820	mg/L	9.06±0.046	0	0
Orthophosphate as P <sup>1,2</sup> 1870	mg/L	3.02±0.015	3.07	0.14



INFORME DE RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EVALUACION DE DESEMPEÑO - AÑO 2015

Código: M-AC-EA-FH13

Versión: 02

Fecha: 01/11/2016

Página: 1 de 2

NOMBRE DEL PARTICIPANTE

AMBILAB SAS

CÓDIGO: 4216654

FECHA DE EMISIÓN

01 de noviembre de 2016

E-MAIL: comercial@ambilab.co; gerencia@ambilab.co

Matriz	Grupo	Variables/Métodos	Lote de la Muestra	Valor Asignado	Incertidumbre del valor asignado	Valor de referencia Certificado	Incertidumbre del Valor de Referencia Certificado	Promedio Robusto	Desviación Estándar Robusta	Límite Inferior	Límite Superior	Unidades	Valor Reportado	Z Score	Desempeño
	1. Iones Principales o Minerales	Alcalinidad total SM 2320 B (Potenci)	LRAA9793	33,26	0,17	30,4	0,578	33,26	1,67	29,92	36,60	mg CaCO3/L	36	1,54	SATISFACTORIO
	1. Iones Principales o Minerales	Calcio Disuelto SM 3500-Ca B	LRAA9791/92	12,27	0,06	12,4	0,223	12,27	0,52	11,22	13,31	mg Ca+2/L	14,8	4,83	INSATISFACTORIO
	1. Iones Principales o Minerales	Cloruro SM 4500-Cl B	LRAA9791/92	53,53	0,16	54,20	0,97	53,53	1,59	50,35	56,72	mg Cl/L	53,3	-0,15	SATISFACTORIO
	1. Iones Principales o Minerales	Conductividad Eléctrica a 25 °C SM 2510 B	LRAA9791/92	352,92	0,61	345,00	5,50	352,92	5,73	341,45	364,39	µS/cm	349,2	-0,65	SATISFACTORIO
	1. Iones Principales o Minerales	Dureza Cálcica SM 3500-Ca B	LRAA9791/92	30,67	0,11	30,90	0,55	30,67	0,99	28,70	32,64	mg CaCO3/L	37,0	6,42	INSATISFACTORIO
	1. Iones Principales o Minerales	Dureza total SM 2340 C	LRAA9791/92	75,65	0,23	75,3	1,39	75,65	2,31	71,03	80,27	mg CaCO3/L	66,5	-3,96	INSATISFACTORIO
	1. Iones Principales o Minerales	Magnesio Disuelto SM 3500-Mg B	LRAA9791/92	10,88	0,07	11	0,203	10,88	0,61	9,67	12,09	mg Mg+2/L	7,3	-5,90	INSATISFACTORIO
	1. Iones Principales o Minerales	Sulfato SM 4500-SO4-2 E	LRAA9791/92	34,23	0,29	34,30	0,61	34,23	2,75	28,73	39,73	mg SO4-2/L	36,4	0,79	SATISFACTORIO
	4. Acidez	Acidez SM 2310 B	LRAA9863	10,22	0,22	10,00	0,18	10,22	1,31	7,61	12,83	mg CaCO3/L	24	10,55	INSATISFACTORIO
	5. Nutrientes Simples	Nitrato como N Salicilato de Sodio - Rodier	LRAA9862	1,19	0,01	1,20	0,02	1,19	0,09	1,00	1,38	mg N/L	1,333	1,47	SATISFACTORIO
	5. Nutrientes Simples	Ortofosfato como P SM 4500-P D	LRAA9862	0,65	0,00	0,64	0,01	0,65	0,03	0,60	0,70	mg P/L	1,045	15,42	INSATISFACTORIO
	6. Nutrientes Complejos	Fosforo total SM 4500-P B, D	LRAA0013	1,81	0,04	1,99	0,04	1,81	0,31	1,18	2,43	mg P/L	1,80	-0,03	SATISFACTORIO
	7. Nitró.	Nitrato como N SM 4500-NO2- B	LRAA9761	0,0048	0,0008	0,12	0,0021	0,0048	0,0022	0,0005	0,01	mg N/L	-0,008		SATISFACTORIO
	8. pH	pH SM 4500-H+ B	LRAA9863	7,99	0,01	7,95	0,14	7,99	0,06	7,87	8,11	unidades de pH	8,2	3,44	INSATISFACTORIO
	9. Sólidos o residuos	Sólidos Disueltos Totales Cálculo	LRAA9803	66,51	0,33	65,10	1,16	66,51	3,43	59,66	73,37	mg/L	63,0	-1,02	SATISFACTORIO
	9. Sólidos o residuos	Sólidos Suspendidos Totales SM 2540 D	LRAA9803	11,04	0,13	12,00	0,21	11,04	1,23	8,58	13,50	mg/L	8	-2,47	CUESTIONABLE

1. Agua

	9. Sólidos o residuos	Sólidos Totales SM 2540 B	LRAA9803	78,13	0,33	77,00	1,38	78,13	3,30	71,52	84,73	mg/L	71	-2,16	CUESTIONABLE
	10. Sólidos Sedimentables	Sólidos sedimentables SM 2540 F	LRAA9760	1,05	0,01	1,00	0,02	1,05	0,06	0,93	1,17	mL/L	1	-0,84	SATISFACTORIO
	12. Turbidez	Turbidez SM 2130 B	LRAA9763	2,33	0,03	2,20	0,04	2,33	0,24	1,85	2,81	NTU	2,4	0,30	SATISFACTORIO
	15. Metales traza	Aluminio SM 3500-Al B	LRAA9784	10976,93	134,60	11379,00	203,00	10976,93	1060,49	8855,95	13097,91	µg/L	9,20	-10,34	INSATISFACTORIO
	15. Metales traza	Cobre SM 3500-Cu B	LRAA9784	369,98	2,53	372,00	6,65	369,98	19,90	329,77	409,39	µg/L	0,32	-18,55	INSATISFACTORIO
	15. Metales traza	Cromo SM 3500-Cr B	LRAA9784	1082,37	14,75	1138,00	20,3	1082,37	116,24	849,89	1314,86	µg/L	0,57	-9,31	INSATISFACTORIO
	15. Metales traza	Hierro SM 3500-Fe B	LRAA9784	828,67	9,67	828,00	14,80	828,67	77,39	673,90	983,45	µg/L	0,94	-10,70	INSATISFACTORIO
	15. Metales traza	Zinc SM 3500-Zn B	LRAA9784	1025,00	9,05	1014,00	18,1	1025,00	71,34	882,32	1167,68	µg/L	1,51	-14,35	INSATISFACTORIO
	20. Demandas	DBO (5 días) SM 5210 B, ASTM D888-09/Método C	LRAA9769	27,61	0,30	30,10	1,05	27,61	3,23	21,16	34,06	mg/L	23,8	-1,18	SATISFACTORIO
	20. Demandas	DDO SM 6220 D	LRAA9769	48,01	0,37	48,20	1,69	48,01	3,75	40,51	55,52	mg/L	54,9	1,84	SATISFACTORIO
	22. TPH - Hidrocarburos Totales de Petróleo	TPH SM 5520 B, F	LRAA9857	218,77	13,02	210,00	7,35	218,77	84,61	49,56	387,98	mg/L	114,0	-1,24	SATISFACTORIO
	23. Fenoles totales	Fenoles totales SM 5530 B, D	LRAA9801	1,29	0,02	0,96	0,03	1,29	0,17	0,95	1,62	mg/L	1,345	0,35	SATISFACTORIO
	24. Detergentes	Detergentes SM 5540 C	LRAA9764	1,95	0,03	2,80	0,05	1,95	0,26	1,44	2,46	mg/L	1,2	-2,95	CUESTIONABLE
	27. Microbiología 1.	Coliformes fecales SM 9221 E	LRAA1150	184,26	12,54	170,00	5,95	184,26	72,32	19,61	308,91	MPN/100 mL	194	0,41	SATISFACTORIO
	27. Microbiología 1.	Coliformes Totales SM 9222 B	LRAA1150	184,60	9,93	170,00	5,95	184,60	58,39	47,82	281,38	CFU/100 mL	152	-0,22	SATISFACTORIO
	27. Microbiología 1.	E coli SM 9222 D	LRAA1150	157,32	10,60	170,00	5,95	157,32	62,31	32,71	281,93	CFU/100 mL	152	-0,09	SATISFACTORIO
	27. Microbiología 1.	Coliformes fecales SM 9222 D	LRAA1150	134,58	19,64	170,00	5,95	134,58	80,11	0,00	294,79	CFU/100 mL	152	0,22	SATISFACTORIO
	21. Aceites y Grasas	Aceites y Grasas SM 5520 B	LRAA9864	26,92	0,34	27,30	0,49	26,92	3,26	20,41	33,43	mg/L	23,9	-0,93	SATISFACTORIO

## ANEXO 5

### RESOLUCIÓN ACREDITACIÓN IDEAM A LABORATORIO AMBILAB SAS



RESOLUCIÓN N° 2 5 9 7

"Por la cual se otorga la acreditación a la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, para producir información cuantitativa física, para los estudios o análisis ambientales requeridos por las Autoridades Ambientales competentes y de carácter oficial, relacionada con la calidad del medio ambiente y de los recursos naturales renovables"

**EL DIRECTOR GENERAL DEL INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES - IDEAM -**

En uso de sus facultades legales y en especial las conferidas por los numerales 1 y 2 del artículo 5 del Decreto 291 de 2004; el artículo 2.2.8.9.1.5 del Decreto 1076 de 2015, y la Resolución No. 0268 del 06 de marzo de 2015 y,

#### CONSIDERANDO:

Que mediante oficio con radicado número 20169910101952 del 02 de septiembre de 2016 el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM recibió por parte de la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, identificada con el NIT 900.813.726-2, con domicilio según certificado de cámara y comercio adjunto a la solicitud, en la calle 1A N° 4 – 50 del municipio de Pitalito, Departamento de Huila, comunicación junto con el formulario único de solicitud de acreditación para la visita inicial.

Que mediante auto de inicio No. 0044 del 03 de octubre de 2016, el IDEAM dio inicio al trámite de acreditación inicial de la sociedad **AMBILAB S.A.S.** en la matriz Agua para producir información cuantitativa física y química para los estudios o análisis ambientales requeridos por las autoridades ambientales competentes.

Que el IDEAM, mediante oficio con radicado N° 20166010022161 del 24 de Octubre de 2016 envió a la sociedad **AMBILAB S.A.S.** la cotización y orden de consignación N° 38116 para la visita de acreditación inicial ante este Instituto.

Que mediante oficio con radicado número 20176010003481 del 10 de marzo de 2017, el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM, envió a la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, la confirmación de las fechas para la visita de evaluación para la acreditación inicial en la matriz agua.

Que el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM, mediante comunicación electrónica con radicado N° 20176010005681 del 11 de abril de 2017 envió por correo

Página 1 de 7

Calle 25D No. 96B - 70 Bogotá D.C. PBX (571) 3527160  
Fax Server: 3527110  
Línea Nacional 018000110012 - Pronóstico y Alertas (571) 3527180  
Sede Puente Aranda: Calle 12 No 42B - 44 Bogotá D.C. PBX: 2681070  
[www.ideam.gov.co](http://www.ideam.gov.co)



\*



Libertad y Orden  
Ministerio de Ambiente y  
Desarrollo Sostenible  
República de Colombia



Instituto de Hidrología,  
Meteorología y  
Estudios Ambientales

## INSTITUTO DE HIDROLOGÍA METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES - IDEAM

RESOLUCIÓN N°. 2597 DE 31 OCT 2017

electrónico a la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, los documentos plan y cronograma de auditoría, correspondiente a la visita de evaluación para la acreditación inicial.

Que conforme los antecedentes obrantes en el expediente número 2015601010400016E perteneciente a la Subdirección de Estudios Ambientales, la visita de evaluación para la acreditación inicial a la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, se llevó a cabo por parte del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM, en el periodo comprendido entre el 17 de abril de 2017 al 21 de abril de 2017.

Que durante la visita de acreditación inicial, la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, solicitó el retiro de las siguientes variables objeto de acreditación inicial bajo el radicado N° 20179910056762 del 02 de mayo de 2017.

### MATRIZ AGUA

1. **Fósforo Total:** Espectrofotométrico – Digestión Persulfato y Determinación con Cloruro Estañoso, SM 4500 – P, B, D
2. **Surfactantes aniónicos:** Espectrofotométrico Surfactantes Aniónicos como SAAM, SM 5540 C
3. **Grasas y Aceites:** Extracción Líquido – Líquido por Gravimetría, SM 5520 B
4. **Hidrocarburos:** Extracción Líquido – Líquido por Gravimetría, SM 5520 B, F.

Que el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM, elaboró el informe de evaluación In Situ correspondiente a la visita de acreditación inicial de la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, enviándolo mediante oficio con radicado N° 20176010006821 del 02 de mayo de 2017.

Que el 06 de junio de 2017, el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM envió mediante comunicación electrónica a la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, el plan de acciones correctivas revisado con las observaciones del equipo evaluador bajo radicado N° 20176010015861 del 26 de julio de 2017.

Que mediante radicado número 20179910093192 del 19 de julio de 2017, el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM recibió por parte de la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, las evidencias para dar tratamiento a las no conformidades de la visita de acreditación inicial.

Una vez verificadas las acciones correctivas implementadas por la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, y conforme con los informes técnicos realizados por los profesionales del Grupo de Acreditación del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM, las variables para las cuales hubo conformidad fueron:

### Matriz Agua:

1. **Alcalinidad Total:** Volumétrico, SM 2320 B
2. **Acidez Total:** Volumétrico / Potenciométrico - SM 2310 B
3. **Cloruro:** Argentométrico - SM 4500 Cl- B.
4. **Dureza Total:** Volumétrico, EDTA, SM 2340 C

Página 2 de 7





Libertad y Orden  
Ministerio de Ambiente y  
Desarrollo Sostenible  
República de Colombia



Instituto de Hidrología,  
Meteorología y  
Estudios Ambientales

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES - IDEAM

RESOLUCIÓN N° **2 5 9 7** DE 3 1 OCT 2017

5. **Dureza Cálcica:** Volumétrico, EDTA, SM 3500 – Ca, B
6. **Sulfatos:** Tubidimétrico, SM 4500  $SO_4^{2-}$ , E
7. **Nitrato:** Salicilato Sódico, J. Rodier, 9a del año 2011.
8. **Nitrito:** Colorimétrico, SM 4500 –  $NO_2$ , B
9. **Fosforo Reactivo Soluble (Leído como Ortofosfato):** Espectrofotométrico – Cloruro Estañoso, SM 4500 – P, B, D.
10. **Sólidos Suspendidos Totales:** Gravimétrico – Secado a  $103^{\circ}C$  –  $105^{\circ}C$ , SM 2540 D
11. **Demanda Bioquímica de Oxígeno – DBO<sub>5</sub>:** Incubación a 5 días - Electrodo de Luminiscencia, SM 5210 B - ASTM D888 -12 e1 Método C.
12. **Demanda Química de Oxígeno – DQO:** Reflujo Cerrado, Colorimétrico, SM 5220 D
13. **Color Real:** Espectrofotométrico – UNE-EN-ISO 7887. Sept/2012, Método B
14. **Toma de muestra simple:** pH (SM 4500-H+ B), **Conductividad eléctrica** (SM 2510 B), **Temperatura** (SM 2550 B), **Oxígeno Disuelto** (ASTM D888 -12 e1 Método C), **Sólidos Sedimentables** (SM 2540 F), Caudal.
15. **Toma de muestra compuesta:** pH (SM 4500-H+ B), **Conductividad eléctrica** (SM 2510 B), **Temperatura** (SM 2550 B), **Oxígeno Disuelto** (ASTM D888 -12 e1 Método C), **Sólidos Sedimentables** (SM 2540 F), Caudal.
16. **Toma de muestra Integrada en Cuerpo Lótico:** pH (SM 4500-H+ B), **Conductividad eléctrica** (SM 2510 B), **Temperatura** (SM 2550 B), **Oxígeno Disuelto** (ASTM D888 -12 e1 Método C), **Sólidos Sedimentables** (SM 2540 F), Caudal.
17. **Toma de muestra Integrada en Cuerpo Léntico:** pH (SM 4500-H+ B), **Conductividad eléctrica** (SM 2510 B), **Temperatura** (SM 2550 B), **Oxígeno Disuelto** (ASTM D888 -12 e1 Método C), **Sólidos Sedimentables** (SM 2540 F)

Los métodos relacionados anteriormente tienen como referencia el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA – AWWA - WEF, 22<sup>nd</sup> edition 2012, salvo en los casos en que se especifique directamente otra referencia bibliográfica.

Una vez revisados los resultados correspondientes a la Prueba de Evaluación de Desempeño, se evidenció que la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, no obtuvo resultados satisfactorios para las siguientes variables.

**Matriz Agua:**

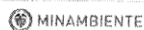
1. **Dureza Total:** Volumétrico, EDTA, SM 2340 C
2. **Dureza Cálcica:** Volumétrico, EDTA, SM 3500 – Ca, B
3. **Sólidos Suspendidos Totales:** Gravimétrico – Secado a  $103^{\circ}C$  –  $105^{\circ}C$ , SM 2540 D

Que según la información remitida, la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, cumplió con todas las etapas y requisitos establecidos en la Resolución N° 0268 del 06 de marzo de 2015, proferida por el IDEAM para la acreditación inicial.

Que en constancia de lo consignado en la relación de antecedentes que motivan el presente acto administrativo, los documentos de la solicitud y anexos que hacen parte integral del proceso Administrativo de Acreditación cuya titularidad es de la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, reposan en la dependencia del Grupo de Acreditación de la Subdirección de Estudios Ambientales del IDEAM, en el expediente N° 2015601010400016E

Página 3 de 7

Calle 25D No. 96B - 70 Bogotá D.C. PBX (571) 352 7160  
Fax Server: 352 7110  
Línea Nacional 018000110012 - Pronóstico y Alertas (571) 352 7180  
Sede Puente Aranda: Calle 12 No 42B - 44 Bogotá D.C. PBX: 268 1070  
[www.ideam.gov.co](http://www.ideam.gov.co)





INSTITUTO DE HIDROLOGÍA METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES - IDEAM

RESOLUCIÓN N.º 2597 DE 31 OCT 2017

Que en cumplimiento a lo dispuesto en el Artículo 29 de la Resolución N.º 0268 del 06 de marzo de 2015 "Por medio de la cual modificó la Resolución No. 0176 de 2003 y 1754 de 2008, y se establecieron los requisitos y el procedimiento de acreditación de organismos de evaluación de la conformidad en matrices ambientales, bajo la norma NTC-ISO/EC 17025", y de acuerdo con el informe emitido de evaluación *in situ*, por el Grupo de Acreditación de la Subdirección de Estudios Ambientales, del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM, se procederá a expedir el presente acto administrativo.

FUNDAMENTOS LEGALES

De conformidad con lo dispuesto en el artículo 17 de la Ley 99 del 22 de diciembre de 1993, el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales - IDEAM, es un establecimiento público de carácter nacional adscrito al Ministerio del Medio Ambiente, con autonomía administrativa, personería jurídica y patrimonio independiente, encargado del levantamiento y manejo de la información científica y técnica sobre los ecosistemas que forman parte del patrimonio ambiental del país, así como de establecer las bases técnicas para clasificar y zonificar el uso del territorio nacional para los fines de la planificación y el ordenamiento del territorio.

En razón a lo dispuesto por la Ley 99 del 22 de diciembre de 1993, a través del Decreto 1076 del 26 de mayo de 2015, "Por medio del cual se expide el Decreto Único Reglamentario del Sector Ambiente y Desarrollo Sostenible." expedido por el Gobierno Nacional como un cuerpo jurídico compilatorio de la regulación normativa ambiental Colombiana, se estableció en el Artículo 2.2.8.9.1.5, que el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM, es la Entidad competente para establecer los sistemas de referencia para la acreditación e inter calibración analítica de los laboratorios cuya actividad esté relacionada con la producción de datos e información de carácter físico, químico y biótico de la calidad del medio ambiente de la República de Colombia.

En consecuencia, según las previsiones hechas por el parágrafo 2 del 2.2.8.9.1.5 del Decreto arriba mencionado, los laboratorios que produzcan información cuantitativa, física y biótica para los estudios o análisis ambientales requeridos por las Autoridades Ambientales competentes, y los demás que produzcan información de carácter oficial relacionada con la calidad del medio ambiente y de los recursos naturales renovables, deberán poseer certificado de acreditación correspondiente otorgado mediante acto administrativo expedido por el IDEAM.

Que es así, como en desarrollo de esta competencia el Instituto de Hidrología, Meteorología, y Estudios Ambientales – IDEAM a través de la Subdirección de Estudios Ambientales, según las competencias asignadas por el numeral 13 del Artículo Décimo Quinto del Decreto 291 del 29 de enero de 2004, expidió la Resolución N.º 0268 del 06 de marzo de 2015, "Por la cual se modifica la Resoluciones N.º 176 de 2003 y 1754 de 2008, y se establecen los requisitos y el procedimiento de acreditación de organismos de evaluación de la conformidad en matrices ambientales, bajo la norma NTC-ISO/IEC 17025 en Colombia", determinando el procedimiento administrativo especial, para acreditar los laboratorios ambientales del sector público y privado que produzcan información física, química y biótica para los estudios o análisis ambientales, relacionada con la calidad del medio ambiente y de los recursos naturales renovables.

Página 4 de 7



Orden y Ocio  
Ministerio de Ambiente y  
Desarrollo Sostenible  
República de Colombia



IDEAM Instituto de Hidrología,  
Meteorología y  
Estudios Ambientales

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES - IDEAM

RESOLUCIÓN N° 2597 DE 31 OCT 2017

En mérito de lo expuesto,

**RESUELVE:**

**ARTÍCULO 1°.** Otorgar la acreditación para producir información cuantitativa física, para los estudios o análisis ambientales requeridos por las autoridades ambientales competentes y de carácter oficial, relacionada con la calidad del medio ambiente y de los recursos naturales renovables a la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, identificada con NIT 900.813.726-2, con domicilio en la calle 1A N° 4 – 50, en el municipio de Pitalito, Departamento de Huila, para las siguientes variables bajo los lineamientos de la norma NTC-ISO/IEC 17025 "Requisitos Generales de Competencia de Laboratorios de Ensayo y Calibración", versión 2005:

**Matriz Agua:**

1. **Alcalinidad Total:** Volumétrico, SM 2320 B
2. **Acidez Total:** Volumétrico / Potenciométrico - SM 2310 B
3. **Cloruro:** Argentométrico - SM 4500 Cl- B
4. **Sulfatos:** Tubidimétrico, SM 4500 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, E
5. **Nitrato:** Salicilato Sódico, J. Rodier, 9a del año 2011.
6. **Nitrito:** Colorimétrico, SM 4500 – NO<sub>2</sub> B
7. **Fosforo Reactivo Soluble (Leído como Ortofosfato):** Espectrofotométrico – Cloruro Estañoso, SM 4500 – P, B, D.
8. **Demanda Bioquímica de Oxígeno – DBO<sub>5</sub>:** Incubación a 5 días - Electrodo de Luminiscencia, SM 5210 B - ASTM D888 -12 e1 Método C.
9. **Demanda Química de Oxígeno – DQO:** Reflujo Cerrado, Colorimétrico, SM 5220 D
10. **Color Real:** Espectrofotométrico – UNE-EN-ISO 7887. Sept/2012, Método B
11. **Toma de muestra simple:** pH (SM 4500-H+ B), **Conductividad eléctrica** (SM 2510 B), **Temperatura** (SM 2550 B), **Oxígeno Disuelto** (ASTM D888 -12 e1 Método C), **Sólidos Sedimentables** (SM 2540 F), **Caudal**.
12. **Toma de muestra compuesta:** pH (SM 4500-H+ B), **Conductividad eléctrica** (SM 2510 B), **Temperatura** (SM 2550 B), **Oxígeno Disuelto** (ASTM D888 -12 e1 Método C), **Sólidos Sedimentables** (SM 2540 F), **Caudal**.
13. **Toma de muestra Integrada en Cuerpo Lótico:** pH (SM 4500-H+ B), **Conductividad eléctrica** (SM 2510 B), **Temperatura** (SM 2550 B), **Oxígeno Disuelto** (ASTM D888 -12 e1 Método C), **Sólidos Sedimentables** (SM 2540 F), **Caudal**.
14. **Toma de muestra Integrada en Cuerpo Léntico:** pH (SM 4500-H+ B), **Conductividad eléctrica** (SM 2510 B), **Temperatura** (SM 2550 B), **Oxígeno Disuelto** (ASTM D888 -12 e1 Método C), **Sólidos Sedimentables** (SM 2540 F)

Los métodos relacionados anteriormente tienen como referencia el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA – AWWA - WEF, 22<sup>nd</sup> edition 2012, salvo en los casos en que se especifique directamente otra referencia bibliográfica.

**ARTÍCULO 2°.** No otorgar la acreditación para producir información cuantitativa física y química, para los estudios o análisis ambientales requeridos por las autoridades ambientales competentes y de carácter oficial, relacionada con la calidad del medio ambiente y de los recursos naturales

Página 5 de 7

Calle 250 No. 96B – 70 Bogotá D.C. PBX (571) 352 7160  
Fax Server: 352 7110  
Línea Nacional 018000110012 - Pronóstico y Alertas (571) 352 7180  
Sede Puente Aranda: Calle 12 No 42B – 44 Bogotá D.C. PBX: 268 1070  
[www.ideam.gov.co](http://www.ideam.gov.co)

MINAMBIENTE





Libertad y Orden  
Ministerio de Ambiente y  
Desarrollo Sostenible  
República de Colombia



IDEAM Instituto de Hidrología,  
Meteorología y  
Estudios Ambientales

## INSTITUTO DE HIDROLOGÍA METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES - IDEAM

RESOLUCIÓN N°. **2597** DE 31 OCT 2017

renovables, a la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, para las siguientes variables en la matriz agua, bajo los lineamientos de la norma NTC-ISO/IEC 17025 "Requisitos Generales de Competencia de Laboratorios de Ensayo y Calibración", versión 2005, por no obtener resultados satisfactorios en las pruebas de evaluación de desempeño:

### Matriz Agua:

1. **Dureza Total:** Volumétrico, EDTA, SM 2340 C
2. **Dureza Cálctica:** Volumétrico, EDTA, SM 3500 – Ca, B
3. **Sólidos Suspendidos Totales:** Gravimétrico – Secado a 103°C – 105°C, SM 2540 D

**PARÁGRAFO:** La sociedad **AMBILAB S.A.S.**, una vez obtenga los resultados satisfactorios en las Pruebas de Evaluación de Desempeño de las variables que no fueron acreditadas mediante el presente acto administrativo, por las razones expuestas en la parte motiva del presente acto administrativo, podrá solicitar al IDEAM la modificación del alcance del presente acto administrativo.

**ARTÍCULO 3°.** La acreditación que se otorga a través del presente acto administrativo no ampara ningún tipo de actividad diferente a las que en él se describen, razón por lo cual la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, deberá cumplir y mantener las condiciones bajo las cuales obtuvo la acreditación.

**ARTÍCULO 4°.** La sociedad **AMBILAB S.A.S.**, para mantener la acreditación otorgada mediante la presente Resolución, deberá participar y aprobar anualmente las pruebas de evaluación y desempeño para las variables consideradas en el alcance de la acreditación, de acuerdo con lo dispuesto por la Resolución 0268 del 06 de marzo de 2015.

**ARTÍCULO 5°.** Para efectos de seguimiento de la acreditación el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM, hará una visita de verificación in situ a los veinticuatro (24) meses de haberse obtenido la acreditación, para lo cual el laboratorio deberá radicar antes del vencimiento del mes dieciocho (18) la solicitud de visita de seguimiento, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 34 de la Resolución 0268 del 06 de marzo de 2015.

**ARTÍCULO 6°.** En caso de que la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, no cumpla con los términos y condiciones que se relacionan en la presente resolución, el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM, dará por terminada mediante acto administrativo la acreditación otorgada.

**ARTÍCULO 7°.** La sociedad **AMBILAB S.A.S.**, titular del acto administrativo por medio del cual se certifica su acreditación, de continuar interesado como laboratorio en la renovación de su acreditación, deberá tramitar ante el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM, con nueve (9) meses de anticipación al vencimiento del acto administrativo que le otorga la acreditación, su solicitud de conformidad con lo dispuesto en la Resolución 0268 del 06 de marzo de 2015 o la norma que la modifique o sustituya.

**ARTÍCULO 8°.** En caso de suspensión, retiro o vencimiento de la acreditación, la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, deberá inmediatamente cesar el uso de la acreditación, así como la publicidad o logotipo de Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM, de acuerdo con lo dispuesto en el ordenamiento jurídico Colombiano.

Página 6 de 7

Calle 25D No. 96B - 70 Bogotá D.C. PBX (571) 352 7160  
Fax Server: 352 7110  
Línea Nacional 018000110012 - Pronóstico y Alertas (571) 352 7180  
Sede Puente Aranda: Calle 12 No 42B - 44 Bogotá D.C. PBX: 268 1070  
[www.ideam.gov.co](http://www.ideam.gov.co)





**INSTITUTO DE HIDROLOGÍA METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES - IDEAM**

**RESOLUCIÓN N°: 2597 DE 31 OCT 2017**

**ARTÍCULO 9°.** La sociedad **AMBILAB S.A.S.**, deberá dar cumplimiento a cada uno de los compromisos establecidos en el procedimiento del trámite de acreditación.

**ARTÍCULO 10°.** Por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, notificar personalmente o por aviso, cuando a ello hubiere lugar, el contenido del presente acto administrativo al representante legal, apoderado debidamente constituido y/o a la persona debidamente autorizada de la sociedad **AMBILAB S.A.S.**, identificada con NIT N° 900.813.726-2, con domicilio en la calle 1A N° 4 - 50, en el municipio de Pitalito, Departamento de Huila de conformidad con los artículos 67 y 69 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo.






**ARTÍCULO 11°.** En contra del presente acto administrativo procede el recurso de reposición, el cual se podrá interponer por su representante o apoderado debidamente constituido, por escrito ante el Director del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales en la diligencia de notificación personal, o dentro de los diez (10) días siguientes a ella, o a la notificación por aviso, o al vencimiento del término de publicación, según el caso, de conformidad con lo establecido en los artículos 76 y 77 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo.

**ARTÍCULO 12°.** La vigencia del presente acto administrativo será de cuatro (4) años, los cuales se contarán a partir de la ejecutoria del presente acto administrativo.

**NOTIFÍQUESE Y CÚMPLASE**

Dada en Bogotá, D.C., a los **31 OCT 2017**

  
**OMAR FRANCO TORRES**  
Director General

	Nombre	Cargo	Firma
Proyección técnica	Juan Manuel Zambrano Velosa	Contratista - Evaluador Acreditación	
Revisión Técnica	Edna Rocío Sandoval Sisa	Contratista - Grupo de Acreditación	
Revisó y ajustó	Jairo Mauricio Beltrán Ballén	Abogado - Grupo de Acreditación	
Revisó	Néstor Alejandro Gómez	Subdirector de Estudios Ambientales (E.)	
Aprobó	Gilberto Antonio Ramos	Jefe Oficina Asesora Jurídica	

*Los arriba firmantes declaramos que hemos revisado el presente documento y lo encontramos ajustado a las normas y disposiciones legales vigentes y por lo tanto bajo nuestra responsabilidad lo presentamos para la firma del Director General.*

Radicado: 20176010019671  
Expediente: 2015601010400016E

Página 7 de 7

Calle 250 No. 96B - 70 Bogotá D.C. PBX (571) 352 7160  
Fax Server: 352 7110  
Línea Nacional 018000110012 - Pronóstico y Alertas (571) 352 7180  
Sede Puente Aranda: Calle 12 No 42B - 44 Bogotá D.C. PBX: 268 1070  
[www.ideam.gov.co](http://www.ideam.gov.co)

