



# ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA.

**Sergio Andrés Tafur García**

**Universidad Magdalena**

Facultad, (Ingeniería)

Programa (Ingeniería Ambiental y Sanitaria)

Santa Marta, Colombia

2022



**ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS  
ANALÍTICAS PARA EL LABORATORIO DE CALIDAD DE  
AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA.**

**Sergio Andrés Tafur García**

Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Ingeniero Ambiental y Sanitario**

Director (a):

M.Sc. Isaac Manuel Romero Borja

Codirector (a):

Biólogo Carlos Samuel España Rangel

Línea de Investigación:

Calidad Ambiental

Grupo de Investigación:

Suelo Ambiente y Sociedad

Universidad del Magdalena

Facultad, (Ingeniería)

Programa (Ingeniería Ambiental y Sanitaria)

Santa Marta, Colombia

2022

---

**Nota de aceptación:**

**Aprobado por el Consejo de Programa en cumplimiento de los requisitos exigidos por el Acuerdo Superior N° 11 de 2017 y Acuerdo Académico N° 41 de 2017 para optar al título de (Ingeniero Ambiental y Sanitario)**

---

**Jurado**

---

**Jurado**

**Santa Marta, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_**

---

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

---

*Dedicatoria*

*Principalmente a Dios por haberme  
brindado la sabiduría y la fortaleza para  
alcanzar este nuevo logro.*

*A mi madre y mi hermano que gracias a su  
esfuerzo y lucha diaria lograron este triunfo,  
esto es totalmente de ustedes.*

*A mi Padre (QEPD); desde el cielo sé que  
estarás orgulloso de ver a tu hijo convertido  
en profesional.*

*A toda mi familia por ese apoyo que me  
brindaron en este gran proyecto de vida, en  
especial a mi preciosa sobrina, son una  
parte fundamental en mi vida.*

*A mi novia; por su amor, apoyo  
incondicional, compañía desinteresada y fiel  
en todo momento.*

*A mis amigos, ellos también han sido  
testigos de este gran esfuerzo, Gracias por  
estar siempre en esos momentos de altos y  
bajos que nos brinda la vida.*

---

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad del Magdalena, principalmente a Vicerrectoría de Investigación quien me apoyó en el desarrollo del proyecto de investigación, al laboratorio de Calidad de Aguas de la Universidad Del Magdalena, por permitirme hacer parte de esta familia y poder desarrollar este proyecto.

Agradezco a mi director de trabajo de investigación M.Sc. Isaac Manuel Romero Borja, quien con su experiencia, conocimiento y motivación me orientó en la investigación y al personal del Laboratorio de calidad de aguas por su apoyo y colaboración.

A Carlos Samuel España Rangel, por brindarme su apoyo y experiencia durante la realización de ensayos de laboratorio.

Al programa de Ingeniería Ambiental y Sanitaria por brindarme este título como profesional. Al Grupo de Investigación Suelo, Ambiente y Sociedad; por permitirme vincularme a su grupo de investigación.

A mi familia, Novia, amigos y todas las personas que de una u otra forma aportaron su granito de arena, para convertirme en profesional.

---

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

---

**Contenido**

<u>Pág.</u>	
Contenido.....	VI
Resumen.....	XII
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas.....	XV
Lista símbolos.....	XVII
1. ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA. .....	3
1.1. JUSTIFICACIÓN. ....	3
1.1.1 HIPOTESIS. ....	3
1.2. Objetivos. ....	4
1.2.1. General. ....	4
1.2.2. Específicos. ....	4
1.3. Marco Conceptual. ....	5
1.3.1. Nitrógeno (N).....	5
1.3.2. Nitrógeno Amoniacal (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ). ....	6
1.3.3. Nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ). ....	7
1.3.4. Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ). ....	7
1.3.5. Fósforo (P). ....	8
1.3.6. Fósforo Reactivo (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ).....	9
1.4. Espectrofotometría. ....	10
1.5. Validación de método analítico. ....	11
1.5.1. Linealidad. ....	12

---

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

---

1.5.2. Sensibilidad.....	13
1.5.3. Límite de detección del método.....	13
1.5.4. Blanco reactivo.....	13
1.5.5. Límite de cuantificación del método (LCM).....	13
1.5.6. Intervalo de trabajo.....	15
1.5.7. Veracidad.....	16
1.5.8. Precisión.....	16
1.6. Incertidumbre.....	17
1.6.1. Clasificación de la incertidumbre.....	17
1.6.2. Incertidumbre de medida.....	18
1.6.3. Incertidumbre expandida (TIPO A).....	18
1.6.4. Factor de cobertura (K=2).....	18
1.6.5. Incertidumbre debida al patrón o instrumento calibrado (TIPO B).....	18
1.6.6. Incertidumbre debida a la resolución (TIPO B).....	19
1.6.7. Incertidumbre debida a la deriva del patrón (TIPO B).....	19
1.7. Cartas Control Analítico.....	19
1.8. Elaboración de procedimientos y hojas de cálculo.....	19
1.9. Importancia social y ecosistémica de las variables objeto de medición frente a los requerimientos de la Norma Colombiana.....	20
2. METODOLOGÍA.....	23
Esquema generalizado para el alcance de los objetivos.....	23
2.1. Fase de Campo.....	24
2.2. Fase de laboratorio.....	25
2.3. Equipos, Materiales y Reactivos.....	25
2.3.1. Equipos y materiales del laboratorio.....	25

---

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

---

2.3.2. Material de vidrio volumétrico.....	25
2.3.3. Reactivos.....	26
2.3.4. Manejo y disponibilidad de residuos.....	29
2.4. Verificación de los procedimientos utilizados para los procesos de estandarización y validación.....	29
2.5. Parámetros de desempeño.....	31
2.5.1. Linealidad.....	32
2.5.2. Sensibilidad.....	32
2.5.3. Límite de detección del método (LDM).....	33
2.5.4. Límite de cuantificación del método (LCM).....	34
2.5.5. Intervalo de trabajo.....	34
2.5.6. Verificación del método.....	34
2.5.7. Veracidad.....	35
2.5.8. Precisión.....	35
2.5.8.1. Repetibilidad.....	35
2.5.9. Estimación de la incertidumbre del método.....	35
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	36
3.1. Validación de Nitrógeno Amoniacal $\text{NH}_4^+$ .....	37
3.1.1. Intervalo Lineal - $\text{NH}_4^+$ .....	37
3.1.1.1. Datos de la curva de calibración - $\text{NH}_4^+$ .....	40
3.1.2. Sensibilidad - $\text{NH}_4^+$ .....	40
3.1.3. Estimación del Límite de Detección del Método (LDM) y Límite de Cuantificación del Método (LCM) - $\text{NH}_4^+$ .....	41
3.1.4. Intervalo de trabajo - $\text{NH}_4^+$ .....	44
3.1.5. Verificación del método - $\text{NH}_4^+$ .....	46

---

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

---

3.1.6. Veracidad – $\text{NH}_4^+$ .....	48
3.1.7. Precisión - $\text{NH}_4^+$ .....	48
3.1.7.1. Repetibilidad - $\text{NH}_4^+$ .....	48
3.1.8. Estimación de la incertidumbre del método - $\text{NH}_4^+$ .....	49
3.1.9. Declaración de aptitud del método - $\text{NH}_4^+$ .....	50
3.2. Validación de Nitritos $\text{NO}_2^-$ .....	51
3.2.1. Intervalo Lineal - $\text{NO}_2^-$ .....	51
3.2.1.1. Datos de la curva de calibración - $\text{NO}_2^-$ .....	53
3.2.2. Sensibilidad - $\text{NO}_2^-$ .....	54
3.2.3. Estimación del límite de detección del método (LDM) y límite de cuantificación del método (LCM) - $\text{NO}_2^-$ .....	54
3.2.4. Intervalo de trabajo - $\text{NO}_2^-$ .....	57
3.2.5. Verificación del método - $\text{NO}_2^-$ .....	59
3.2.6. Veracidad - $\text{NO}_2^-$ .....	61
3.2.7. Precisión - $\text{NO}_2^-$ .....	62
3.2.7.1. Repetibilidad - $\text{NO}_2^-$ .....	62
3.2.8. Estimación de la incertidumbre del método - $\text{NO}_2^-$ .....	63
3.2.9. Declaración de aptitud del método - $\text{NO}_2^-$ .....	64
3.3. Validación de Nitratos $\text{NO}_3^-$ .....	64
3.3.1. Intervalo Lineal - $\text{NO}_3^-$ .....	64
3.3.1.1. Datos de la curva de calibración - $\text{NO}_3^-$ .....	66
3.3.2. Sensibilidad - $\text{NO}_3^-$ .....	67

---

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

---

3.3.3. Estimación del límite de detección del método (LDM) y límite de cuantificación del método (LCM) - $\text{NO}_3^-$ .....	68
3.3.4. Intervalo de trabajo - $\text{NO}_3^-$ .....	71
3.3.5. Verificación del método - $\text{NO}_3^-$ .....	72
3.3.6. Veracidad - $\text{NO}_3^-$ .....	74
3.3.7. Precisión - $\text{NO}_3^-$ .....	75
3.3.7.1. Repetibilidad - $\text{NO}_3^-$ .....	75
3.3.8. Estimación de la incertidumbre del método - $\text{NO}_3^-$ .....	76
3.3.9. Declaración de aptitud del método - $\text{NO}_3^-$ .....	77
3.4. Validación de Fosforo Reactivo ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).....	77
3.4.1. Intervalo Lineal ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).....	78
3.4.1.1. Datos de la curva de calibración - $\text{PO}_4^{3-}$ .....	80
3.4.2. Sensibilidad - $\text{PO}_4^{3-}$ .....	81
3.4.3. Estimación del límite de detección del método (LDM) y límite de cuantificación del método (LCM) - $\text{PO}_4^{3-}$ .....	81
3.4.4. Intervalo de trabajo - $\text{PO}_4^{3-}$ .....	84
3.4.5. Verificación del método - $\text{PO}_4^{3-}$ .....	86
3.4.6. Veracidad - $\text{PO}_4^{3-}$ .....	88
3.4.7. Precisión - $\text{PO}_4^{3-}$ .....	88
3.4.7.1. Repetibilidad - $\text{PO}_4^{3-}$ .....	88
3.4.8. Estimación de la incertidumbre del método - $\text{PO}_4^{3-}$ .....	89
3.4.9. Declaración de aptitud del método - $\text{PO}_4^{3-}$ .....	90

---

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

---

3.5. Diseño del Manual de procedimientos.....	91
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	93
4.1. Conclusiones.....	93
4.2. Recomendaciones.....	94
5. BIBLIOGRAFIA.....	95
ANEXOS.....	98
Anexo 1. Procedimientos de los métodos de ensayo.....	98
Anexo 2. Planes de validaciones.....	98
Anexo 3. Informes de validaciones.....	98
Anexo 4. Cartas Controles de los métodos de ensayo.....	98
Anexo 5. Formatos de captura de datos de los métodos de ensayo.....	98
Anexo 6. Instructivos.....	98
Anexo 7. Verificación del material volumétrico (IN, EX).....	98
Anexo 8. Diagnóstico del Laboratorio.....	98

---

## RESUMEN

En el presente trabajo se validó y estandarizó los métodos para la determinación de Amonio, Nitritos, Nitratos y Fósforo como ortofosfatos en la matriz de agua superficial continental y marina, tomando como referencia el Standard Methods edición 23 del 2017, el manual práctico de análisis del agua de mar (Strickland & Parsons, 1972) y la "Guía de Estandarización del IDEAM". Para su aplicación en el laboratorio de Calidad de Agua de la Universidad del Magdalena., cumpliendo con los criterios de la norma ISO/IEC 17025/2017.

Se analizaron los diferentes criterios de aceptación como: linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, intervalo de trabajo, exactitud, precisión, recuperación, incertidumbre y se realizó el diseño experimental en relación a la repetibilidad y reproducibilidad, por medio del tratamiento estadístico se determinaron coeficientes de variación (CV) <15%, porcentaje de error (20%<50), veracidad (90%R<110) e incertidumbre <15% de acuerdo a cada método, demostrando el cumplimiento de los criterios de aceptación de cada parámetro analizado en sus diferentes niveles de concentración, declarando la validez y aplicabilidad de los métodos en el laboratorio, siendo aptos para participar en el proceso de acreditación.

Se logró el proceso de validación y estandarización de los parámetros de amonio, nitritos, nitratos y fósforo reactivo en el laboratorio de Calidad de Aguas de la Universidad del Magdalena lo que permitirá mejorar la confiabilidad en las determinaciones de este tipo de variables en el desarrollo de las prácticas académicas, trabajos de investigación, así mismo mejorará las condiciones para futuro procesos de acreditación del Laboratorio con fines para la prestación de ventas de servicios.

**Palabras Claves:** Métodos analíticos, Procedimiento de operación estándar, Análisis colorimétricos, Aguas superficiales.

---

## **Abstract**

In the present work, the methods for the determination of Ammonium, Nitrites, Nitrates and Phosphorus as orthophosphates in the matrix of continental and marine surface water were validated and standardized, taking as reference the Standard Methods edition 23 of 2017, the practical manual of seawater analysis (Strickland & Parsons, 1972) and the "Standardization Guide of IDEAM". For its application in the Water Quality laboratory of the Universidad del Magdalena - Hangar D., complying with the criteria of the ISO/IEC 17025/2017 standard. And financed by the Vice Rector's Office of Research.

The different acceptance criteria were analyzed, such as: linearity, sensitivity, detection limit, quantification limit, working range, accuracy, precision, recovery, uncertainty and the experimental design was performed in relation to repeatability and reproducibility, by means of statistical treatment coefficients of variation (CV) < 15%, percentage error (20% < 50) were determined, veracity (90% < R < 110) and uncertainty < 15% according to each method, demonstrating compliance with the acceptance criteria for each parameter analyzed in its different concentration levels, declaring the validity and applicability of the methods in the laboratory, being apt to participate in the accreditation process.

In conclusion, these processes that were advanced in the Water Quality Laboratory of the Universidad del Magdalena serve as a purpose to improve academic practices and conditions to provide a recognized space for professional use where analyses are performed providing credible results.

**Key words:** Analytical methods, Standard operating procedure, Colorimetric analysis, Ammonium, Nitrate, Nitrite, Phosphate.

---

## Lista de Figuras.

	<b>Pág.</b>
Figura 1- 1: Esquema general del ciclo del nitrógeno tomada de en los ecosistemas acuáticos, y los principales problemas medioambientales derivados de la contaminación. Tomado de (Camargo & Alonso, 2007). .....	6
Figura 1-2:Esquema general del ciclo del fósforo. Tomado de (Pabón & Chaparro, 1998)...	9

## Lista de Tablas.

Pág.

Tabla 1- 1:Clasificación del ICAM propuesto por INVEMAR 2014. Calidad de agua de Colombia. ....	22
Tabla 2- 1:Reactivos y estándares de validación para Nitritos en agua superficial	26
Tabla 2- 2:Reactivos y estándares de validación para Amonio en agua superficial.....	27
Tabla 2- 3:Reactivos y estándar de validación para Nitratos en agua superficial.....	27
Tabla 2- 4:Reactivos y estándar de validación para Fosforo reactivo en agua superficial ...	27
Tabla 2-5:Métodos de referencia para la validación y estandarización de Nitrógeno amoniacal en agua superficial. ....	30
Tabla 2-6:Métodos de referencia para la validación y estandarización de Nitritos en agua superficial.....	30
Tabla 2-7:Métodos de referencia para la validación y estandarización de Nitratos en agua superficial.....	30
Tabla 2-8:Métodos de referencia para la validación y estandarización de Fosforo reactivo en agua superficial.....	31
Tabla 2-9:Pruebas de méritos para la validación de métodos analíticos. ....	31
Tabla 2-10: Limite de Confianza.....	33
Tabla 3- 1: Preparación de la curva de Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). ....	38
Tabla 3-2:Datos obtenidos para las curvas de calibración $\text{NH}_4^+$ .....	38
Tabla 3-3:Recalculo de los estándares utilizando los valores promedio de las curvas de calibración de $\text{NH}_4^+$ evaluadas para agua Continental y marina y evaluación del porcentaje de error calculado .....	40
Tabla 3-4:Sensibilidad en la curva para la cuantificación de Amonio en agua Continental.	41
Tabla 3- 5: Cálculo del límite de detección del método LDM- $\text{NH}_4^+$ .....	41
Tabla 3-6:Datos obtenidos en la determinación del Límite de cuantificación del método $\text{NH}_4^+$ .....	43
Tabla 3-7:Intervalo de trabajo $\text{NH}_4^+$ .....	45
Tabla 3-8:Resultados obtenidos en la cuantificación del set de muestra - $\text{NH}_4^+$ .....	46
Tabla 3-9:Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de validación de $\text{NH}_4^+$ .....	48
Tabla 3-10:resultados de la Repetibilidad - $\text{NH}_4^+$ .....	49
Tabla 3- 11:Fuentes de incertidumbre para la determinación amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en agua Continental y marina. ....	49
Tabla 3- 12:Preparación de la curva de Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).....	51
Tabla 3-13:Datos obtenidos para las curvas de calibración $\text{NO}_2^-$ .....	52
Tabla 3-14:Recalculo de los estándares utilizando los valores promedio de las curvas de calibración de $\text{NO}_2^-$ evaluadas para agua Continental y evaluación del porcentaje de error calculado. ....	53
Tabla 3-15:Sensibilidad en la curva para la cuantificación de Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) en agua Continental. ....	54

---

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

---

Tabla 3-16: Cálculo del límite de detección del método $\text{NO}_2^-$ .....	55
Tabla 3-17: Datos obtenidos en la determinación del Límite de cuantificación del método $\text{NO}_2^-$ .....	56
Tabla 3-18: Intervalo de trabajo $\text{NO}_2^-$ .....	58
Tabla 3-19: Resultados obtenidos en la cuantificación del set de muestra - $\text{NO}_2^-$ .....	60
Tabla 3-20: Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de validación de $\text{NO}_2^-$ .....	62
Tabla 3-21: Resultados de la Repetibilidad - $\text{NO}_2^-$ .....	62
Tabla 3-22: Fuentes de incertidumbre para la determinación Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) en agua Continental y marina. ....	63
Tabla 3- 23: Preparación de la curva de Nitratos $\text{NO}_3^-$ .....	65
Tabla 3-24: Datos obtenidos para las curvas de calibración $\text{NO}_3^-$ .....	65
Tabla 3-25: Recalculo de los estándares utilizando los valores promedio de las curvas de calibración de $\text{NO}_3^-$ evaluadas para agua Continental y marina y evaluación del porcentaje de error calculado .....	67
Tabla 3-26: Sensibilidad en la curva para la cuantificación de Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en agua Continental y marina. ....	68
Tabla 3-27: Datos obtenidos en el cálculo del límite de detección del método $\text{NO}_3^-$ .....	68
Tabla 3-28: Datos obtenidos en la determinación del Límite de cuantificación del método $\text{NO}_3^-$ .....	70
Tabla 3-29: Intervalo de trabajo $\text{NO}_3^-$ .....	71
Tabla 3-30: Resultados obtenidos en la cuantificación del set de muestra – $\text{NO}_3^-$ .....	73
Tabla 3-31: Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de validación de $\text{NO}_3^-$ .....	75
Tabla 3-32: Resultados de la repetibilidad - $\text{NO}_3^-$ .....	76
Tabla 3-33: Fuentes de incertidumbre para la determinación Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) en agua Continental y Marina. ....	76
Tabla 3-34: Preparación de la curva de fósforo reactivo $\text{PO}_4^{3-}$ .....	78
Tabla 3-35: Datos obtenidos para las curvas de calibración $\text{PO}_4^{3-}$ .....	79
Tabla 3-36: Recalculo de los estándares utilizando los valores promedio de las curvas de calibración evaluadas para $\text{PO}_4^{3-}$ agua Continental y marina y evaluación del porcentaje de error calculado. ....	80
Tabla 3-37: Sensibilidad en la curva para la cuantificación de fósforo reactivo ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en agua Continental y marina. ....	81
Tabla 3-38: Datos obtenidos en el cálculo del límite de detección del método $\text{PO}_4^{3-}$ .....	82
Tabla 3-39: Datos obtenidos en la determinación del Límite de cuantificación del método $\text{PO}_4^{3-}$ .....	83
Tabla 3-40: Intervalo de trabajo $\text{PO}_4^{3-}$ .....	85
Tabla 3-41: Resultados obtenidos en la cuantificación del set de muestra - $\text{PO}_4^{3-}$ .....	86
Tabla 3-42: Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de validación $\text{PO}_4^{3-}$ .....	88
Tabla 3-43: Resultados de la Repetibilidad - $\text{PO}_4^{3-}$ .....	89
Tabla 3- 44: Fuentes de incertidumbre para la determinación de fosforo reactivo ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en agua Continental y marina. ....	90

---

**LISTA DE SÍMBOLOS.**

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>
<b>ABS</b>	Absorbancia
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>IDEAM</b>	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales
<b>ISO</b>	Organización internacional para la estandarización
<b>L</b>	Litro
<b>LC</b>	Límite de cuantificación
<b>LCM</b>	Límite de cuantificación del método
<b>LDM</b>	Límite de detección del método
<b>mg</b>	miligramo
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Ion nitrito
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Ion nitrato
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Ion Amonio
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	Ion Fosfato
<b>r</b>	Coefficiente de correlación
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>S</b>	Desviación Estándar
<b>%E</b>	Porcentaje de error
<b>%R</b>	Porcentaje de recuperación
<b>VIS</b>	Visible
<b>λ</b>	Longitud de onda
<b>nm</b>	Nanómetro

---

## INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los recursos naturales más afectados por el ser humano, las principales fuentes que contribuyen con el deterioro de este preciado líquido son originadas por diferentes actividades como: minería, residuos sólidos, residuos químicos, agrícolas y ganaderas (uso de plaguicidas, herbicidas y residuos animales), así como aguas residuales domésticas e industriales. De acuerdo a lo anterior es importante el monitoreo del estado y las características de las aguas superficiales con el fin de asegurar la sostenibilidad de los ambientes acuáticos (Blanco et al., 2012; Primost et al., 2019).

En Colombia, El deterioro de los recursos hídricos es uno de los problemas ambientales más relevantes, debido a las diferentes actividades antrópicas que se realizan en nuestro país. Los ecosistemas se vuelven vulnerables principalmente por su gran capacidad para disolver y transportar diversos desechos, los cuales llegan a los cuerpos de agua a través de diversas trayectorias donde interactúan con la atmósfera y el suelo (Pabón & Chaparro, 1998).

El estado ecológico y químico de las aguas superficiales ha despertado un gran interés por el estudio, especialmente por el enriquecimiento generados de los nutrientes (iones) nitrógeno (N) y fósforo (P) provenientes de fuentes difusas (como la agricultura o la ganadería), o de fuentes puntuales (como efluentes urbanos e industriales) (Primost, 2019).

Este aporte de nutrientes generado por fuentes difusas y puntuales provoca el proceso de eutrofización, estimulando el crecimiento de algas y otras formas de vida acuática,

perturbando el equilibrio natural de los ecosistemas afectando la calidad del agua. El exceso de estos nutrientes además altera drásticamente las redes tróficas de los lagos, ríos y ecosistemas costeros. Los cuales generan un crecimiento de fitoplancton, microalgas bentónicas y perifíticas que pueden afectar la supervivencia de algunas especies por falta de oxígeno (Moreta, 2011).

El monitoreo del estado de los recursos hídricos es importante para determinar la estabilidad y funcionamiento adecuado de los mismo, sin embargo, para poder dictaminar la salud de los sistemas hídricos es necesario garantizar los resultados de los análisis del laboratorio que permitan conocer el comportamiento y tendencias de las diferentes variables fisicoquímicas; siendo importante tener en cuenta los procesos de validación y estandarización de las técnicas de análisis con la finalidad de tener resultados confiables (Primost, 2019).

Es por ello, de la importancia que las instituciones de educación superior cuenten con laboratorios acreditados que generen confianza en términos de investigación, académicos y extensión. Frente a esto la validación y estandarización de los métodos analíticos de Amonio, Nitritos, Nitratos y, Fósforo como ortofosfatos , resulta un tema de interés institucional que debe ser abordado desde las condiciones ambientales del laboratorio de Calidad de Aguas de la Universidad del Magdalena donde se determine las siguientes figuras de merito como la linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, Intervalo de trabajo, veracidad, precisión e incertidumbre para cada uno de estos métodos (Primost, 2019).

El presente trabajo tiene como propósito entregar herramientas válidas y confiables que demuestren el desempeño y confiabilidad de los resultados con miras a mejorar las condiciones para el desarrollo de prácticas académicas, desarrollo de investigación y proceso de acreditación del laboratorio.

## **1. ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA.**

### **1.1. JUSTIFICACIÓN.**

Para la Universidad del Magdalena es de vital importancia contar con laboratorios y ensayos acreditados, para la prestación de servicios académicos, investigativos y extensión a personas tanto naturales como jurídicas. El presente proyecto proporcionó un mecanismo para construir credibilidad, confianza y obtener buenos niveles de calidad académica, investigativa y servicios de extensión.

El propósito de este trabajo es la implementación de la documentación y validación de métodos analíticos de los parámetros fisicoquímicos por métodos espectrofotométricos [Nutrientes ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ )] donde se realizaron pruebas ambientales obteniendo resultados confiables y con estándares internacionales como los protocolos del Standard Methods.

Aportar bases para la implementación de un sistema de gestión de calidad basado en la norma ISO 17025 (ensayo de laboratorios) que permita a futuro una acreditación frente a organismos nacionales de acreditación.

#### **1.1.1 HIPOTESIS.**

Son las técnicas colorimétricos y reducción de cadmio y cobre métodos adecuados para la cuantificación de análisis de nutrientes en muestras de agua marinas y superficiales bajo condiciones ambientales no controladas.

La logística física e infraestructura del laboratorio de calidad de agua son adecuadas para la realización de los ensayos de validación para la determinación de nutrientes en aguas continentales superficiales y en aguas marinas.

## **1.2. Objetivos.**

### **1.2.1. General.**

Estandarizar y validar las técnicas analíticas de variables fisicoquímicas ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ) en aguas superficiales continentales y marinas, para el laboratorio de Calidad de agua de la Universidad del Magdalena.

### **1.2.2. Específicos.**

1. Realizar un diagnóstico del estado actual del laboratorio con el fin de mejorar la calidad en los distintos procesos que se ejecuten.
2. Determinar experimentalmente los criterios de confianza para la determinación y validación de ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  Y  $\text{PO}_4^{3-}$ ).
3. Validar por métodos de estadísticos, la confiabilidad y trazabilidad de los resultados obtenidos en las pruebas y ensayos de desempeño de ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ )

### **1.3. Marco Conceptual.**

El agua es un recurso natural escaso y vital para el desarrollo de la vida en el planeta. El 97,2% del agua de la tierra es agua salada y solo el 2,5% corresponde a agua dulce; de este 2,5%, el 30% está bajo tierra, el 68% está en glaciares y otras capas de nieve, y solo el 1,2% es superficial en ríos, lagos y otras formas de agua superficial. El desarrollo humano, económico e industrial ha traído consigo un uso inadecuado, el cual ha causado un deterioro del preciado líquido. América del sur, es la segunda región con la mayor parte del agua dulce y el primero en relación porcentaje de agua / número de habitantes, sus principales usos incluyen consumo humano, riego, procesos industriales, producción de energía. Primordialmente este tipo de actividades generan contaminación en grandes cantidades de elementos como N (nitrógeno) y P (fosforo) (Pretelt & Socarrás, 2020).

#### **1.3.1. Nitrógeno (N).**

El nitrógeno es un elemento importante que actúa como nutriente en diferentes procesos desarrollados en la biósfera. Este elemento forma parte de los aminoácidos que constituyen las proteínas y el DNA, moléculas esenciales de la vida. Es abundante en la atmósfera en comparación con otros elementos. Se presenta en estado gaseoso como compuesto diatómico, constituyendo el 79% del aire. En esta forma, el nitrógeno no puede ser utilizado por las plantas y los animales: es necesario que se forme inicialmente el compuesto amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) para que después de reaccionar con el agua, se formen los iones nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Este último, al ser utilizado por las plantas, incorpora el nitrógeno a las cadenas alimentarias, realizando el proceso de conversión del nitrógeno atmosférico en compuestos nitrosos disponibles para las plantas en el suelo, este proceso se conoce como fijación del nitrógeno y en el juegan un papel importante las bacterias Azobacter (Pabón & Chaparro, 1998).

Las formas iónicas (reactivas) de nitrógeno inorgánico más comunes en los ecosistemas acuáticos son el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Estos iones pueden estar presentes de manera natural en el medio acuático como consecuencia de la deposición atmosférica, la escorrentía superficial y subterránea, la disolución de depósitos geológicos ricos en nitrógeno, la descomposición biológica de la materia orgánica, y la fijación de nitrógeno por ciertos procariotas (Figura 1) (Camargo & Alonso, 2007).

Figura 1- 1: Esquema general del ciclo del nitrógeno tomada de en los ecosistemas acuáticos, y los principales problemas medioambientales derivados de la contaminación. Tomado de (Camargo & Alonso, 2007).



### 1.3.2. Nitrógeno Amoniaco ( $\text{NH}_4^+$ ).

El amoniaco ionizado o ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) resulta de la reducción de nitratos u oxidación de materia orgánica, sin embargo, dependiendo del pH del medio, sus

concentraciones pueden variar transformándose en amoníaco, lo cual quiere decir, que, a pH superiores, el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) tiende a incrementar, pero el amonio disminuye, mientras que, a pH menores el amonio aumenta y el amoníaco disminuye (Pacheco & Ramos, 2018).

El método de Fenato conocido también como la técnica colorimétrica de amonio (azul de indofenol), se basa en que un compuesto de color azul intenso, indofenol, se forma por la reacción del amonio, con el fenol favorecido por el ion hipoclorito en condiciones alcalinas, catalizada por el nitroprusiato de sodio el cual favorece la intensidad del color en la reacción, y puede ser leída a 640 nm (Eugene et al., 2017).

### **1.3.3. Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).**

Los nitritos son compuestos contaminantes del agua, el cual tienen presencia en el ciclo del nitrógeno, su desarrollo está dado por el proceso de nitrificación o desnitrificación, la cual es realizado por bacterias pertenecientes a la familia *Nitrobacteriaceae*. Las fuentes ambientales más importantes son el uso de fertilizantes nitrogenados, la disposición de desechos municipales e industriales (Pretelt & Socarrás, 2020).

Los iones nitritos son considerados los principales responsables de la toxicidad para los animales. La acción tóxica de  $\text{NO}_2^-$  es debida fundamentalmente a la conversión de los pigmentos respiratorios (hemoglobina, hemocianina) en formas que son incapaces de transportar y liberar oxígeno (meta-hemoglobina, meta-hemocianina), lo cual puede causar asfixia y en último término la muerte (Camargo & Alonso, 2007).

### **1.3.4. Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ).**

De igual forma que en el caso del nitrito, la acción tóxica de  $\text{NO}_3^-$  es debida básicamente a la conversión de los pigmentos respiratorios en formas que son

incapaces de transportar y liberar oxígeno. Para ello, el nitrato ha de convertirse previamente en nitrito bajo las condiciones internas del animal. Sin embargo, el nitrato presenta una menor toxicidad que el nitrito y el amoníaco como resultado de su baja permeabilidad branquial en los peces, lo cual hace que su absorción a través de las branquias sea más limitada (Camargo & Alonso, 2007).

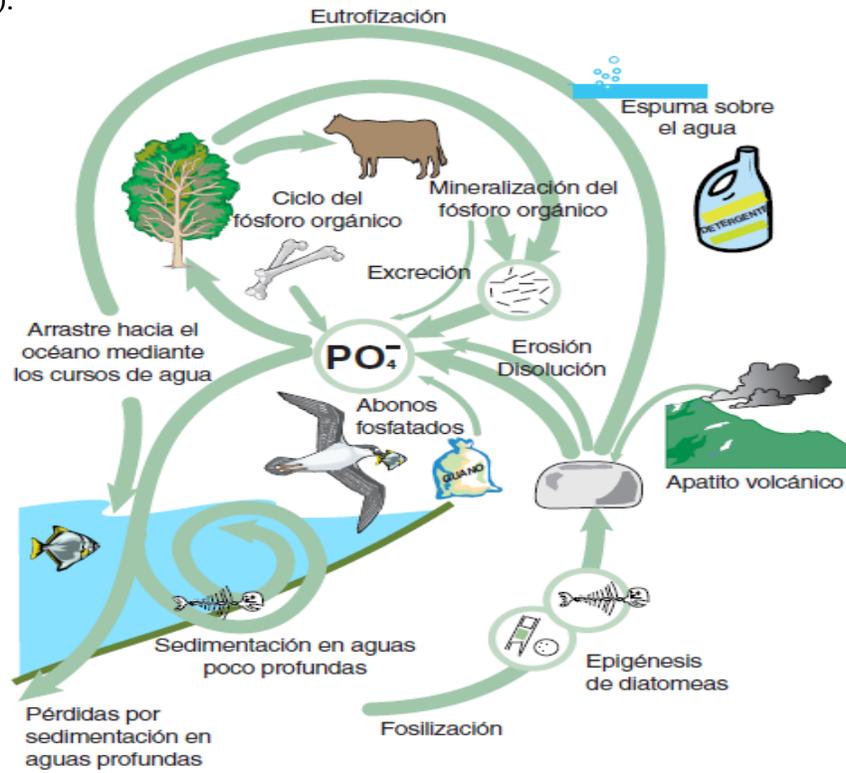
### **1.3.5. Fósforo (P).**

El fósforo es un constituyente esencial del protoplasma, de los nucleótidos, de los ácidos nucleicos y, por ende, de los seres vivos. Este elemento se encuentra en los tejidos y huesos de los organismos, como fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), y en la corteza terrestre (litósfera). A diferencia del oxígeno, el carbono, el nitrógeno y el azufre, el fósforo no se encuentra en forma gaseosa. Por ello, no está disponible en la atmósfera, sino que existe en pequeñas cantidades en la corteza terrestre (Pabón & Chaparro, 1998).

La concentración de fosfato en los cuerpos de agua superficiales es un problema debido a la reproducción geométrica de los organismos unicelulares que dependen del fósforo como fuente de alimento. Este elemento se encuentra en aguas naturales y residuales, los cuales se dividen en ortofosfatos, fosfatos condensados (pirofosfatos, metafosfatos y otras polifosfatos) y fosfatos ligados orgánicamente. Además, existe en solución, en partículas, fragmentos o en organismos acuáticos provenientes de varias fuentes. Entre las cuales encontramos fósforo de origen natural (sedimentos y rocas fosfóricas), que se liberan por erosión, principalmente en forma de ortofosfato o por fuentes puntuales y difusas (figura 1-2) (Sierra et al., 2013).

La descarga de aguas residuales estimula el crecimiento de micro y macroorganismos acuáticos fotosintéticos en grandes cantidades, lo cual puede alterar el balance de la vida en este medio (Romero, 2009).

Figura 1-2: Esquema general del ciclo del fósforo. Tomado de (Pabón & Chaparro, 1998).



### 1.3.6. Fósforo Reactivo ( $PO_4^{3-}$ ).

El análisis del fósforo total incluye dos pasos principales en los métodos; inicialmente la conversión de otras formas de fósforo (polifosfatos y fosfatos orgánicos) en ortofosfato disuelto e hidrólisis ácida y digestión oxidante de la materia orgánica. Hay tres métodos de digestión principales: con ácido perclórico, el más drástico y lento, recomendado sólo para muestras difíciles, como las de sedimentos; con ácidos nítrico y sulfúrico, recomendado para la mayoría de las muestras, la hidrólisis y la digestión se realizan simultáneamente; y con persulfato de amonio o potasio, siendo este el más sencillo (Pérez et al., 2013).

La determinación colorimétrica del ortofosfato disuelto, estos en medio ácido al reaccionar con molibdato de amonio y tartrato de potasio y antimonio, dan un complejo fosfomolibdico, el cual es reducido por ácido ascórbico a azul de molibdeno,

de color azul. La absorbancia del complejo se mide a una longitud de onda de 880 nm, la cual resulta proporcional a la concentración de ortofosfatos en la muestra. Los fosfatos que responden a la determinación colorimétrica se consideran "fósforo reactivo", el cual da una medida fundamentalmente del ortofosfato, sin excluir una pequeña fracción de fosfato condensado que puede hidrolizarse durante el análisis (Sierra et al., 2012; Sierra et al., 2013).

#### **1.4. Espectrofotometría.**

La espectrofotometría es una técnica ampliamente utilizada en los laboratorios para el análisis cuantitativo de numerosos compuestos en donde se puede determinar los nutrientes como el nitrógeno amoniacal, nitritos, nitratos y fósforo reactivo, el cual consiste en determinar la concentración de un compuesto en solución. Su fundamento se debe a que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración (Díaz et al., 2010; Azcarate et al., 2011)

La base de la espectrometría de UV-Vis y su uso en el análisis cuantitativo están dados por la relación conocida como ley de Lambert Beer, que establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de analito en esa solución. Por lo tanto, puede emplearse para determinar la concentración de un compuesto en una solución. La longitud de onda  $\lambda$  de absorción de la luz es específica de cada cromóforo. (Díaz et al., 2010).

Cuando una luz de radiación UV-Vis atraviesa una solución que contiene un analito absorbente, la intensidad (I), que atraviesa la muestra es menor que la del haz incidente (I<sub>0</sub>). La fracción de radiación que ha traspasado la muestra se denomina transmitancia (T= I/I<sub>0</sub>) (Díaz et al., 2010). La transmitancia T está relacionada con la absorbancia (A) de acuerdo a la siguiente expresión:

$$A = -\log T = -\log (I/I_0)$$

Por aspectos prácticos, para las mediciones se usa la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia (T), debido a que, de acuerdo a la ley de Lambert –Beer, A está linealmente relacionada con la concentración del analito absorbente a una determinada longitud de onda:

$$A = -\log_{10} (I/I_0) = \epsilon cl$$

Dónde:

A: absorbancia medida.

I: intensidad de la luz transmitida.

I<sub>0</sub>: intensidad de la luz incidente.

$\epsilon$ : coeficiente de absorción molar, característico de cada sustancia absorbente a cada longitud de onda.

l: longitud del camino óptico (distancia que atraviesa la luz dentro de la muestra).

C: concentración de la sustancia absorbente (mol/L).

(Gómez et al., 2019; Pretelt et al., 2020)

Del correcto desempeño de este instrumento dependerá en gran medida la calidad de los resultados obtenidos, por lo que se considera un equipo crítico en los ensayos de laboratorio y que necesariamente deberá ser verificado periódicamente (Azcarate et al., 2011).

### **1.5. Validación de método analítico.**

En química analítica es muy importante reportar resultados confiables, por lo que es necesario establecer procedimientos de validación de los métodos aplicados en el laboratorio. El proceso de validación consiste en determinar, mediante estudios de

laboratorio, las características de desempeño del método que debe cumplir con los requisitos, confirmando estadísticamente y documentando los resultados obtenidos con un alto grado de confiabilidad. Dentro de las figuras de mérito más importantes a determinar, encontramos la linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, intervalo de trabajo, veracidad, precisión e incertidumbre. (Pardo, 2020).

### **1.5.1. Linealidad.**

Es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un rango establecido. (Pardo, 2020).

Para evaluar la linealidad existen unos criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento. Dentro del intervalo establecido se recomienda estudiar al menos 5 niveles de concentración. Con los resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las concentraciones y la respuesta. La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo:

$$Y = mx + b$$

El coeficiente de correlación ( $r$ ) indica el grado de relación entre la variable  $x$  (concentración), y la variable  $Y$  (respuesta). Su valor máximo es 1, si es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre variables. El valor recomendable para el coeficiente de correlación es  $\geq 0.999$ , aunque en el caso de impurezas se admite  $\geq 0.990$ , la viabilidad del método de la curva de calibrado queda establecida por el coeficiente de determinación esta asegurar que los datos experimentales se ajustan al modelo lineal escogido, normalmente se acepta  $r^2 > 0,990$ . (Pardo, 2020).

### **1.5.2. Sensibilidad.**

Es una medida con capacidad de diferenciar pequeñas concentraciones de un analito. Cuantitativamente, la sensibilidad de calibrado de un método se define como la pendiente de la curva de calibración, es decir, la relación de la señal del método con respecto a la concentración de analito. (Blanco, 2012)

### **1.5.3. Límite de detección del método.**

Se define como la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectado, aunque no necesariamente cuantificado con precisión y exactitud. (Pardo, 2020).

### **1.5.4. Blanco reactivo.**

Agua ultra pura que no contiene, por adición deliberada, la presencia de ningún analito o sustancia por determinar, pero que contiene los mismos solventes, reactivos y se somete al mismo procedimiento analítico que la muestra (IDEAM, 2020).

### **1.5.5. Límite de cuantificación del método (LCM).**

Se define como la mínima cantidad de analito que puede determinarse cuantitativamente con una adecuada exactitud y precisión, es aquel que se considera como el primer punto de la curva realizada para cuantificación. (Pardo, 2020).

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{m}$$

Dónde:

m = es la pendiente de la curva de calibrado.

S<sub>bl</sub> = desviación estándar de las réplicas del blanco.

Y<sub>bl</sub> = promedio de las réplicas del blanco.

Para el límite de cuantificación del método se consideran otras variables estadísticas como el coeficiente de variación (CV) y el porcentaje de error (Ospina, 2001).

El CV se calcula como el cociente entre la desviación estándar y la media de los datos obtenidos

$$CV = \frac{S \text{ (desviación estándar)}}{\bar{Y} \text{ (media de los datos)}}$$

Es común considerar el coeficiente de variación como una medida de homogeneidad de los datos.

<b>% CV</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
< 15 %	Homogéneos
15 y 30%	Homogeneidad moderada
> 30 %	Heterogeneidad

Se dice que un grupo de población o muestra son homogéneo si su coeficiente de variación es menor de 15%. Valores entre 15 y 30% son asociados a una homogeneidad moderada mientras que aquellos superiores a 30% ya podrían indicar una significativa heterogeneidad en el grupo de datos (Ospina, 2001).

Los errores numéricos se generan con el uso de aproximaciones para representar las operaciones y cantidades matemáticas. Estos incluyen de truncamiento que resultan de representar aproximadamente un procedimiento matemático exacto, y los errores de redondeo, que resultan de presentar aproximadamente números exactos. Para los tipos de errores, la relación entre el resultado exacto o verdadero y el aproximado está dado por:

$$E = P^* - P$$

Bien sea una medida directa (la que da el aparato) o indirecta (utilizando una fórmula) existe un tratamiento de los errores de medida. Se puede distinguir dos tipos de errores que se utilizan en los cálculos: error absoluto y error relativo.

Error absoluto. Es la diferencia entre el valor de la medida y el valor tomado como exacto. Puede ser positivo o negativo, según si la medida es superior al valor real o inferior (la resta sale positiva o negativa). Tiene unidades, las mismas que las de la medida.

Sin embargo, para facilitar el manejo y el análisis se emplea el error absoluto definido como:

$$EA = |P^* - P|$$

Error relativo. Es el cociente (la división) entre el error absoluto y el valor exacto. Si se multiplica por 100 se obtiene el tanto por ciento (%) de error. Al igual que el error absoluto puede ser positivo o negativo (según lo sea el error absoluto) porque puede ser por exceso o por defecto. no tiene unidades.

Y el error relativo como

$$ER = |P^* - P| / P, \text{ si } P \neq 0$$

El error relativo también se puede multiplicar por el 100% para expresarlo como:

$$ERP = ER \times 100$$

### **1.5.6. Intervalo de trabajo.**

Es el intervalo en el cual el método da resultados con una incertidumbre aceptable. El límite inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación (LOQ). El extremo superior del intervalo de trabajo está dado por las concentraciones a las cuales se observan fluctuaciones significativas en la sensibilidad analítica. (Velasco, 2021).

### 1.5.7. Veracidad.

La exactitud se define como la proximidad entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado para la misma. Este término se describe normalmente por medio de errores absolutos y relativos. El error absoluto es la diferencia entre la media de un número de mediciones y el valor teórico aceptado como correcto. El error relativo es la división del error absoluto y el valor teórico, multiplicado por cien. (Velasco et al., 2021; Pretelt et al., 2020).

Los resultados se expresan en forma de porcentaje de recuperación y porcentaje de error.

Porcentaje de error

$$\% \text{ error} = \frac{(\text{Valor Teorico} - \text{Valor Experimental})}{\text{Valor Teorico}} \times 100$$

Porcentaje de Recuperación

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{(\bar{x} - x)}{x_{\text{adición}}} \times 100$$

Dónde:

$\bar{x}$  : Valor medio de adiciones

x: Valor medio sin adición

$x_{\text{adición}}$ : Concentración añadida

este porcentaje de (% R) se expresa como la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente un analito que ha sido adicionado a una muestra.

### 1.5.8. Precisión.

Es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones determinadas. La precisión depende sólo de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero

esperado. La medida de la precisión generalmente, se expresa en términos de una desviación estándar de los resultados de la prueba. También puede expresarse en términos de la varianza y el coeficiente de variación. (Velasco, 2021).

## **1.6. Incertidumbre.**

La incertidumbre es un parámetro asociado al resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando. Esta dispersión de los resultados que pueden ser atribuidos al mensurando, se cuantifican con la incertidumbre. Comprende en general muchos componentes, algunos de ellos pueden evaluarse a partir de la distribución estadística de los resultados de una serie de mediciones y pueden caracterizarse por medio de desviaciones estándar experimentales. Los otros componentes, que también pueden ser caracterizados por desviaciones estándar, son evaluados a partir de distribuciones de probabilidad supuestas basadas en la experiencia u otra información. Se entiende que el resultado de la medición es la mejor estimación del valor del mensurando y que todos los componentes de la incertidumbre, incluyendo aquéllos provenientes de efectos sistemáticos, contribuyen a la dispersión. (Blanco, 2012)

### **1.6.1. Clasificación de la incertidumbre.**

Para poder cuantificar el valor de la incertidumbre es necesario conocer el tipo de incertidumbre que se puede presentar, sea de tipo **A** o tipo **B**. La incertidumbre **tipo A** es la incertidumbre que se puede encontrar experimentalmente en el laboratorio, a través del número de repeticiones en los ensayos y del error aleatorio. La incertidumbre **tipo B** es la que se obtiene de la información del certificado, ya sea la calibración, la pureza de los reactivos, las tolerancias de los materiales a volumétricos y los manuales de los instrumentos. Este tipo de incertidumbre está relacionado con errores sistemáticos. (Blanco, 2012)

### **1.6.2. Incertidumbre de medida.**

Es el parámetro asociado con el resultado de una medida que caracteriza la dispersión de los valores que se pueden atribuir razonablemente al mensurando. El mensurando debe interpretarse correctamente para considerar todas las fuentes de incertidumbre, la cual incluye componentes procedentes de efectos sistemáticos, tales como componentes asociadas a correcciones y a valores asignados a patrones. (Velasco, 2021).

$$U_a = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

### **1.6.3. Incertidumbre expandida (TIPO A).**

Magnitud que define un intervalo en torno al resultado de una medición, en el cual se espera encontrar una fracción importante de la distribución de valores que podrían ser atribuidos razonablemente al mensurando. (Velasco, 2021).

$$U_{exp} = K * U_T$$

### **1.6.4. Factor de cobertura (K=2).**

Es un factor numérico utilizado como un multiplicador de la incertidumbre estándar combinada mediante el cual se obtiene la incertidumbre expandida. (Velasco, 2021).

### **1.6.5. Incertidumbre debida al patrón o instrumento calibrado (TIPO B).**

La incertidumbre típica se obtiene dividiendo la incertidumbre expandida dada en el certificado de calibración del patrón por el factor de cobertura indicado. (GUIACUM, 2012).

$$U_{BC} = \frac{\text{Incertidumbre de calibración}}{2}$$

#### **1.6.6. Incertidumbre debida a la resolución (TIPO B).**

Una de las fuentes de incertidumbre de un instrumento es la resolución de su dispositivo indicador, si se trata de un instrumento digital, o la incertidumbre debida a la resolución de lectura, si se trata de un instrumento analógico (Hernández, 2012).

$$U_{Bi} = \frac{\text{Resolucion}}{2\sqrt{3}}$$

#### **1.6.7. Incertidumbre debida a la deriva del patrón (TIPO B).**

La deriva de un patrón no es fácil de determinar en muchos casos, y es un parámetro independiente y característico de cada patrón. Su valor depende, entre otros factores, de las condiciones de uso y mantenimiento, de la frecuencia de utilización, de la exactitud del instrumento, del periodo entre calibraciones (Hernández, 2012).

$$U = \frac{\text{Incertidumbre del patron}}{2}$$

#### **1.7. Cartas Control Analítico.**

Una vez validada la metodología, se comienza con su aplicación en los análisis de rutina, todos los controles de calidad relacionados con las propiedades analíticas deben ser documentados a través de la construcción de Cartas de Control, de forma tal que el comportamiento del método en el tiempo pueda ser trazable (Richter, 2017).

#### **1.8. Elaboración de procedimientos y hojas de cálculo.**

Se debe documentar todos los procedimientos de ensayo para el aseguramiento adecuado de las actividades inmersas en el laboratorio y por ende la validez de los resultados, por tal motivo se elaboró un manual de procedimientos para la determinación de amonio, nitritos, nitratos y fósforo reactivo. Incluyendo formatos de captura de los datos, las cartas control analítico de los métodos y además se elaboró

los respectivos planes e informes de la validación. Las portadas de los procedimientos se documentan en la carpeta de los Anexos (1, 2, 3, 4 y 5).

### **1.9. Importancia social y ecosistémica de las variables objeto de medición frente a los requerimientos de la Norma Colombiana.**

En el caso colombiano, no existen escalas valorativas de niveles máximos permisibles que permitan determinar si un determinado ecosistema tiene una alta o baja contaminación por presencia de nutrientes como nitrógeno amoniacal, nitritos, nitratos y fósforo reactivo. Sin embargo, en diferentes actos administrativos como resoluciones y decretos se determina la importancia y la exigencia de su cuantificación es así como en la resolución 0631 de 2015 (parámetros y los valores límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales) se solicita a las autoridades y entes de control la supervisión de los niveles de Nutrientes donde se documenta uno límites máximos permisibles como análisis y reporte.

En normativas de agua potable en Colombia se incluye los valores de las especies nitrogenadas individuales, en particular nitritos, nitratos, como sigue a continuación:

- La Resolución 2115 de 2007, del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial y del Ministerio de la Protección Social, cuya finalidad es señalar las características físicas y químicas, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia de la calidad del agua para consumo humano. La resolución establece que los nitritos y nitratos, tienen implicaciones sobre la salud humana, y, por lo tanto, la concentración de nitritos debe ser menor o igual a 0.1 mg/L de  $\text{NO}_2$ , la concentración de nitratos debe ser menor o igual a 10 mg/L de  $\text{NO}_3$  y el fósforo de 0.5 mg/L.

- El Decreto 1076 de 2015, de la Presidencia de la República de Colombia, establece los usos del agua. El decreto establece los criterios de calidad admisibles para la destinación del recurso para consumo humano y doméstico, cuando para su

potabilización se requiera tratamiento convencional o desinfección. En ambos casos, la concentración de amoníaco debe ser menor o igual a 1 mg/L de N y la concentración de nitratos y nitritos debe ser menor o igual a 10 mg/L de N.

La norma colombiana establece límites para la especie fósforo soluble y no para la especie fósforo total. Como referente relacionado con la magnitud de fosfato ( $\text{PO}_4$ ) se consideró la Directiva 75/440/CEE de la Unión Europea cuyos límites permisibles para agua superficial destinada a consumo humano según el tipo de tratamiento requerido, son:

Parámetro	A1	A2	A3
Fosfato (mg de $\text{PO}_4$ /L)	0.52	0.94	0.94

Tipo A1: Tratamiento físico simple y desinfección

Tipo A2: Tratamiento físico normal, tratamiento químico y desinfección

Tipo A3: Tratamiento físico y químico intensivos, afino y desinfección

En cuanto a ecosistemas marinos los índices de calidad ambiental marina (ICAM) permite evaluar los cambios del estado de la calidad del agua marina y costera, en criterios o estándares que cuantifican el estado de conservación o deterioro del agua de acuerdo con sus características y en función de su uso o destinación en el lugar y tiempo específico. Para la valoración del Índice ICAM tiene como referencia los valores de variables derivadas de Nitrógeno y Fósforo para la ponderación de los niveles de riesgos de la calidad del recurso hídrico marino como se puede visualizar en la tabla 1-1.

Tabla 1-1: Clasificación del ICAM propuesto por Invemar 2014. Calidad de agua de Colombia.

Categoría calidad de agua	Rango numérico del indicador %	COLOR
Optima	90-100	
Adecuada	70-90	
Aceptable	50 -70	
Inadecuada	25-50	
Pésima	0-25	

Fuente Invemar 2014. Adaptado por el Autor.

El ICAM evalúa cada parámetro y son ponderados según su importancia ambiental y de acuerdo a los criterios de calidad de la legislación. los parámetros seleccionados para el cálculo del indicador en sustrato Agua Estuarina son:

- Oxígeno disuelto
- **Nitratos**
- Sólidos suspendidos totales
- Coliformes termo tolerantes
- PH
- Clorofila A
- Demanda bioquímica de oxígeno
- **Fosfatos**

Según lo expuesto se puede establecer la necesidad de adelantar procesos de validación para cuantificar los nutrientes en aguas superficiales continentales y marinas que permitan un diagnóstico preciso de los diferentes tipos de agua y que sirvan como base para la toma de decisiones y como base fundamental de este trabajo de investigación.

## 2. METODOLOGÍA

### **Esquema generalizado para el alcance de los objetivos.**

Para la validación de los métodos analíticos en la determinación de amonio, nitritos, nitratos y fósforo reactivo, se siguió el procedimiento de control de calidad analítica utilizando los métodos normalizados publicados en el Standard Methods edición 23 del 2017, el manual práctico de análisis del agua de mar (Strickland & Parsons, 1972) y el instructivo de confirmación o validación de métodos analíticos del IDEAM 2020.

Para el cumplimiento del objetivo 1 se realizó un diagnóstico y verificación de la documentación existente al laboratorio por medio de una lista de chequeo (Herramienta de Verificación de estándares de Calidad) tomando como referencia el instructivo de consulta pública de estándares de calidad ajustados en el 2013 por el ministerio de salud y protección social, INVIMA y el INS (Red Nacional de Laboratorios) bajo tres tipos de criterios:

A (Obligatorio) con un puntaje designado de 3.

B (Superiores) con un puntaje de 2.

C (Mejoramiento) con un puntaje de 1. (Ardila & Castaño, 2015).

Los aspectos evaluados correspondieron a los siguientes:

- ✓ Organización y Gestión.
- ✓ Talento humano.
- ✓ Infraestructura y Dotación.
- ✓ Referencia y contrarreferencia.
- ✓ Bioseguridad y Manejo de residuos.

En cuanto los objetivos 2 y 3 correspondiente a la validación de los métodos de amonio, nitritos, nitratos y fósforo reactivo se realizó la evaluación de las siguientes figuras de mérito: linealidad, Sensibilidad, límite de detección, límite de

cuantificación, intervalo de trabajo, verificación del método, veracidad, precisión e incertidumbre.

Para dar alcance al objetivo 4 como parte del procedimiento de validación y estandarización, se hizo necesario alinear los métodos establecidos para su aplicación en el laboratorio de Calidad de Aguas de la Universidad del Magdalena y se elaboró un manual de procedimientos interno para la determinación de amonio, nitritos, nitratos y fósforo reactivo como se describen en el ítem 2.4. También se diseñaron diferentes instructivos como el de limpieza y lavado de material utilizado en los análisis, manejo y uso de la balanza (Anexo 6). A continuación, se realiza una descripción detallado del desarrollo de esta investigación

### **2.1. Fase de Campo.**

Se adelantó una fase de campo para coleccionar muestras de aguas con las cuales se realizó el proceso de validación y estandarización de los diferentes tipos de aguas (continentales y marinas) con la finalidad de evaluar el porcentaje de recuperación (%R) de las muestras reales fortificadas.

Las muestras utilizadas se recolectaron en recipientes de plástico y fueron refrigeradas. Luego fueron transportadas al laboratorio de Calidad de Aguas de la Universidad del Magdalena, donde se le realizó la filtraron al vacío con filtros de fibra de vidrio de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro con el fin de eliminar la turbidez de las muestras para disminuir las interferencias en los análisis.

La toma de la muestra de agua superficial se realizó en los siguientes puntos:

- Ciénaga Grande de Santa Marta
- Ciénaga de Cerro San Antonio
- San Lorenzo – Sierra Nevada de Santa Marta
- Río Aracataca – Aracataca Magdalena

Actividad que se llevó a cabo entre el 10 de noviembre y el 01 de diciembre del año 2021. La selección de los sitios se adelantó por registrar diferentes condiciones ambientales, desarrollo de actividades económicas distintas que posiblemente pueden estar condicionando la calidad de recurso hídrico, así mismo permitió realizar análisis de nutrientes bajo diferentes condiciones de desempeño y calidad del mismo.

## **2.2. Fase de laboratorio.**

Los análisis fueron realizados en el laboratorio de Calidad de Agua de la Universidad del Magdalena, monitoreando las condiciones ambientales con el objetivo de emitir resultados confiables. Todos los datos recopilados en los análisis de nutrientes ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ), fueron tomados en cuenta para la determinación de los métodos, con la finalidad de obtener análisis estadísticos (tablas y gráficas) usando el Programa Matemático Microsoft Excel 2010 para su posterior discusión.

## **2.3. Equipos, Materiales y Reactivos.**

### **2.3.1. Equipos y materiales del laboratorio.**

Los materiales y equipos de laboratorio utilizados en la determinación de amonio, nitritos, nitratos y fósforo reactivo, en aguas superficiales fueron: Material de vidrio volumétrico y aforado clase A, Espectrofotómetro UV-visible *Thermo Scientific*<sup>TM</sup> Genesys<sup>TM</sup> 10 Scanning, Balanza analítica marca *OHAUS* de 4 cifras significativas, Bomba de vacío, medidor de pH marca *WTW*, medidor de Conductividad marca *WTW*, Filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

### **2.3.2. Material de vidrio volumétrico.**

Para el manejo del material volumétrico (matraces aforados) utilizados en la validación y determinación de las curvas de calibración de los métodos se tuvo en cuenta: calibración, especificaciones y limpieza. La verificación de calibración se

realizó de manera interna en el laboratorio siguiendo lo estipulado en la norma ISO 8655-6 del material volumétrico aforado clase A (con límites de errores idénticos) de tipo IN (material de contenido) y EX (material de expulsión) los resultados de dichos procesos de calibración se documentan en el Anexo 7. Este proceso se llevó a cabo bajo condiciones ambientales de laboratorio (temperatura de 20°C y humedad de 75%) del laboratorio.

El lavado del material de vidrio se realizó con jabón extran alcalino, ácido clorhídrico al 10% y enjuagados con abundante agua desionizada Standard methods, 23 Edition del 2017.

### 2.3.3. Reactivos.

Para la determinación de nutrientes ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ) en aguas superficiales continentales y marinas se realizó siguiendo la metodología establecida por el Standard methods, 23 Edition del 2017, y según lo estipulado por Strickland & Parsons, 1972. Para cada una de las variables a analizar se utilizó una serie de reactivos que se registran en las siguientes tablas (2-1 a 2-4):

Tabla 2- 1: Reactivos y estándares de validación para nitritos en agua superficial.

Nombre	Marca	Lote	Especificaciones
Patrón de referencia certificado.	Merck	HC16350999	Concentración 1000 mg $\text{NO}_2^-/\text{L}$
Sulfanilamida	Merck	1.11799.0100	98% de pureza grado analítico
N-(1-naftil) etilendiaminadiclorhidrato	Merck	K52838337 114	98% de pureza grado analítico
Ácido Fosfórico	Merck	K46600873 515	Concentrado 85%
Agua Desionizada	N/A	N/A	Conductividad < 2 $\mu\text{S}/\text{cm}$

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

Tabla 2- 2:Reactivos y estándares de validación para amonio en agua superficial.

Nombre	Marca	Lote	Especificaciones
Patrón de referencia certificado	Merck	HC1618812	Concentración 1000 mg NH <sub>4</sub> /L
Fenol	PanReac	0001087756	99% de pureza
Nitroprusiato	Carlo Erba	481934	99% de pureza
Citrato Alcalino	Carlo Erba	0A024300D	98% de pureza
Agua Desionizada	N/A	N/A	Conductividad < 2 μS/cm

Tabla 2- 3:Reactivos y estándar de validación para nitratos en agua superficial.

Nombre	Marca	Lote	Especificaciones
Patrón de referencia certificado	Merck	HC15459511	Concentración 1000 mg NO <sub>3</sub> /L
Sulfanilamida	Merck	1.11799.0100	98% de pureza grado analítico
N-(1-naftil) etilendiaminadiclorhidrato	Merck	K52838337 114	98% de pureza grado analítico
Ácido Fosfórico	Merck	K46600873 515	Concentrado 85%
Cadmio granular	Merck	K52105004 012	99% de pureza
Cloruro de amonio	Merck	AMO762845 516	98,8% de pureza
Ácido clorhídrico	Merck	K51013486 905	Concentrado 37%
Sulfato de cobre	PanReac	0001028302	99 – 101% de pureza
Agua Desionizada	N/A	N/A	Conductividad < 2 μS/cm

Tabla 2- 4:Reactivos y estándar de validación para fósforo en agua superficial.

Nombre	Marca	Lote	Especificaciones
Patrón de referencia certificado	Merck	0001087756	Concentración 1000 mg PO <sub>4</sub> /L

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

Molibdato de amonio	Merck	481934	99% de pureza
Ácido ascórbico	Merck	0001950791	95% de pureza
Ácido Sulfúrico	Merck	K53465931 124	Concentrado 95 – 97%
Agua Desionizada	N/A	N/A	Conductividad < 2 μS/cm

### 2.3.3.1. Reactivo Color.

Es una mezcla de diferentes reactivos grado analítico para la obtención de un reactivo color para el caso del nitrógeno se utilizó para la formación de un colorante azo púrpura rojizo en las muestras y estándares de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) donde se preparó de la siguiente manera: A 800 mL de agua recientemente desionizada se le agregó 100 mL de ácido fosfórico al 85% y 10 g de sulfanilamida. Después de disolver completamente la sulfanilamida, se agregó 1 g de diclorhidrato de N- (1-naftil) – etilendiamina se mezcló junto con los otros reactivos con el fin de disolverlos, luego se aforó con agua desionizada en un balón con capacidad de 1 L. La solución es estable durante aproximadamente un mes cuando se almacena en una botella ámbar en el refrigerador. APHA, AWWA and WEF 2017 4500-NO<sub>2</sub> - NITROGEN (NITRITE) Stand. Methods Exam. Water Wastewater 4-124, NO<sub>3</sub> NITROGEN (NITRATE) Stand. Methods Exam. Water Wastewater 4-131

Para el caso del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) el reactivo color resulta de la combinación de reactivos como el fenol, nitroprusiato y reactivo alcalino (combinación de citrato + hipoclorito) formando un color azul indofenol cuya absorbancia es medida a 640nm. APHA, AWWA and WEF 2017 4500-NH<sub>3</sub> Nitrogen (Ammonia) Stand. Methods Exam. Water Wastewater 4–119

Por último, para los iones fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) se hizo reaccionar con una solución compuesta que contiene ácido molíbdico, ácido ascórbico y antimonio trivalente para dar una coloración azul cuya absorbancia es medida a 880nm. APHA, AWWA and WEF 2017 4500-P PHOSPHORUS Stand. Methods Exam. Water Wastewater 4–164

#### **2.3.4. Manejo y disponibilidad de residuos.**

Debido a que en este trabajo de investigación se maneja una gran cantidad de productos y se realizan diversos procesos que dan como resultado la generación de residuos, en algunos casos peligrosos para la salud humana y el medio ambiente. se hizo necesario establecer condiciones de trabajo adecuadas, incluyendo el control, tratamiento y disposición final de los residuos generados en el laboratorio calidad de agua de la Universidad del Magdalena para ello fue necesario seguir los procedimientos establecidos por la oficina de gestión ambiental cuyo proceso de recolección se encuentra subcontratado con la empresa Soluciones Ambientales del Caribe SA ESP con licencia de ambiental N° 1050 de 2004. La recolección de los residuos líquidos fue adelantada los días martes y jueves por personal interno de la Universidad del Magdalena capacitado para dicha labor; la disposición final por estuvo a cargo de la citada empresa SAC.

#### **2.4. Verificación de los procedimientos utilizados para los procesos de estandarización y validación.**

Los procedimientos de los métodos a estandarizar y validar se describen en las siguientes tablas (2-5, 2-6, 2-7, 2-8):

Tabla 2-5: Métodos de referencia para la validación y estandarización de nitrógeno amoniacal en agua superficial.

<b>Método</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4500-NH3 F. Phenate Method.</li> <li>• Strickland J.D.H. y Parsons T.R. 1972.</li> <li>• Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos – Invemar</li> </ul>
<b>Mensurando</b>	Nitrógeno amoniacal / Amonio – $\text{NH}_4^+$
<b>Matriz</b>	Agua superficial Continental y Marina

Tabla 2-6: Métodos de referencia para la validación y estandarización de nitritos en agua superficial.

<b>Método</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• S.M. 4500-NO2- B.</li> <li>• Strickland J.D.H. y Parsons T.R. 1972.</li> <li>• Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos – Invemar</li> </ul>
<b>Mensurando</b>	Nitrito – $\text{NO}_2^-$
<b>Matriz</b>	Agua superficial Continental y Marina

Tabla 2-7: Métodos de referencia para la validación y estandarización de nitratos en agua superficial.

<b>Método</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• S.M. 4500-NO3- E. Cadmium Reduction Method</li> <li>• Strickland J.D.H. y Parsons T.R. 1972.</li> <li>• Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos – Invemar</li> </ul>
<b>Mensurando</b>	Nitrato – $\text{NO}_3^-$
<b>Matriz</b>	Agua Superficial Continental y Marina

Tabla 2-8: Métodos de referencia para la validación y estandarización de fósforo reactivo en agua superficial.

<b>Método</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• S.M.4500-P- E. Ascorbic Acid Method</li> <li>• Strickland J.D.H. y Parsons T.R. 1972.</li> <li>• Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos – Invemar</li> </ul>
<b>Mensurando</b>	Fosforo reactivo / Fosfato – PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
<b>Matriz</b>	Agua superficial Continental y Marina

**Nota:** Todas las muestras, estándares e incluido el blanco de reactivo, se analizaron a partir de los siguientes procedimientos y criterios:

### 2.5. Parámetros de desempeño.

Para los métodos analíticos anteriormente citados se utilizaron las siguientes pruebas o figuras de mérito que se usados para la validación, las cuales definen el rendimiento de los análisis.

Tabla 2-9: Pruebas de méritos para la validación de métodos analíticos.

Prueba/figura de mérito	Aplica		# Mediciones	Criterio de aceptación	Responsable(s)
	Si	No			
Intervalo lineal	X		3 en el rango	$r \geq 0,995$	Sergio Tafur
Límite de detección del método	X		10	[ $\mu\text{g N-NO}_2/\text{L}$ ] > 0	Sergio Tafur
Límite de cuantificación	X		10	%CV < 15% Error < 50%	Sergio Tafur
Sensibilidad	X		3 en el rango		Sergio Tafur
Intervalo de trabajo	X		10	%CV < 15% %error < 10%	Sergio Tafur
Repetibilidad intermedia	X		4	%CV < 10 %	Sergio Tafur
Veracidad	X		8	90 < %R < 110	Sergio Tafur
Incertidumbre	X			< 15%	Sergio Tafur

### **2.5.1. Linealidad.**

La Evaluación de la linealidad de cada una de las variables susceptible de medición, se realizó a través de una curva de calibración; para ello se prepararon seis (6) concentraciones diferentes (patrones secundarios) a partir de patrones primarios de ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ) para cada patrón en particular la concentración es 1000 mg /L; junto con cada curva se evaluó un blanco de reactivo, el cual consiste en tener una muestra de agua desionizada y la adición del reactivo de color respectivo utilizado para el análisis de cada variable. Cada ensayo (curva) se analizó por triplicado con el fin de evaluar estadísticamente la regresión lineal. Con los resultados obtenidos se graficaron 3 curvas de calibración por cada variable, para lo cual se utilizaron los resultados de las absorbancias y las concentraciones de cada uno de los patrones secundarios, Absorbancia vs concentración (Pretelt & Socarrás, 2020).

Por cada variable analizada se promediaron los resultados para elaborar las curvas de calibración y se recalcularon las concentraciones de cada estándar para verificar que cumplieran con los criterios de aceptación. Para la evaluación se siguieron los criterios descritos en el Standard methods, edición 23, sección 4020 B, y se evaluó el porcentaje de error, luego se tabularon los valores obtenidos y se indicó el cumplimiento de los criterios (Gomez, 2019).

Una vez establecido el rango lineal, se calculó el coeficiente de correlación, el intercepto y la pendiente con su desviación estándar.

### **2.5.2. Sensibilidad.**

La sensibilidad se calculó utilizando las pendientes de las 3 curvas de calibración obtenida para cada variable analizada y fueron evaluados para cada uno de los métodos ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Eurachem. 2016).

### 2.5.3. Límite de detección del método (LDM).

En la evaluación de este parámetro se analizaron 10 blancos de reactivos. A partir de los datos obtenidos se calculó el promedio, la desviación estándar de los diez blancos, el cual se multiplico por el valor t-student, para obtener los respectivos grados de libertad; para el caso de las 10 medidas, t es igual 2.82 el cual se obtiene de la resta de las 10 mediciones – 1 obteniendo 9 mediciones que corresponden al valor en la tabla de confianza del 99% (tabla 2-10), posteriormente se calculó el límite de detección del método por la siguiente ecuación: (Instructivo de confirmación o validación de métodos analíticos IDEAM, 2020).

$$\text{LDM} = t(n-1) * s$$

Dónde:

s: Desviación estándar de los datos LCM

t (n-1): valor obtenido de la tabla de límite de confianza al 99%

Tabla 2-10: Límite de Confianza.

		
Número de mediciones n	95%	99%
<b>3</b>	1,15	4,54
<b>4</b>	1,46	3,75
<b>5</b>	1,67	3,36
<b>6</b>	1,82	3,14
<b>7</b>	1,94	3,00
<b>8</b>	2,03	2,90
<b>9</b>	2,11	2,82
<b>10</b>	2,18	2,76

**Nota:** Se calcula el LDM a partir de la desviación estándar obtenida en la confirmación del LCM.

#### **2.5.4. Límite de cuantificación del método (LCM).**

Se determinó el límite de cuantificación realizando 10 ensayos de las concentraciones iniciales de la curva para cada método de validación con el objetivo de cumplir los criterios como  $CV < 15\%$  y porcentaje de error  $< 50\%$  (Pretelt & Socarrás, 2020).

**Nota:** para cada método el límite de cuantificación será el primer punto de la curva

#### **2.5.5. Intervalo de trabajo.**

Para determinar el intervalo de trabajo de ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ), se analizaron 10 datos con concentraciones conocidas definidas para cada análisis y se realizaron los cálculos para verificar el cumplimiento de los criterios de calidad establecidos en el laboratorio de Calidad de Agua – Universidad Del Magdalena ( $\%CV < 15\%$  y  $\% \text{Error} < 10\%$ ). Estos rangos se aceptan tomando como referencia lo estipulados en el Standard Method y el Instructivo de confirmación o validación de métodos analíticos - IDEAM

#### **2.5.6. Verificación del método.**

Para la verificación de los métodos de ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ), se cuantificó un conjunto de muestras de aguas superficiales de los sitios descritos en el ítem 2.1. para cada una de las muestras fue necesario realizar un enriquecimiento, que consistió en la adición de una concentración conocida de una solución estándar (muestra fortificada), para cada muestra fue necesario la adición de un estándar de concentración baja y un estándar de concentración alta asignadas para el rango lineal de cada método. Esta especificación fue validada para cada una de las variables, es decir, amonio, nitritos, nitratos y fosforo reactivo (Jurado, 2008).

### **2.5.7. Veracidad.**

La veracidad o exactitud se evaluó teniendo en cuenta el porcentaje de error y el porcentaje de recuperación para muestras fortificadas (adición de estándares de concentración definida), el cual se estableció en el siguiente rango de recuperación ( $90 < \%R < 110$ ), donde se aceptaron los valores obtenidos en los análisis cumpliendo el rango de recuperación propuesto. El cual permitió evaluar las interferencias que estuvieron presentes al momento de realizar el análisis (Pacheco & Torres, 2020).

### **2.5.8. Precisión**

#### **2.5.8.1. Repetibilidad.**

La precisión fue evaluada bajo condiciones de repetibilidad mediante el coeficiente de variación  $< 15\%$  (datos homogéneos). Para esto se analizaron los datos de la matriz fortificada (adición de estándares de concentración definida) para cada uno de los analistas en la adición de concentración baja (Benítez et al., 2021).

### **2.5.9. Estimación de la incertidumbre del método**

Para la identificación de las fuentes de incertidumbre en la cuantificación de los métodos se estimaron las siguientes incertidumbres asociadas a:

- Incertidumbre del equipo
- Incertidumbre de medidas volumétricas (balones aforados, transferpipeta)
- Incertidumbre de la solución estándar
- Incertidumbre debido a la repetibilidad

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para el resultado del objetivo específico 1 diagnóstico del Laboratorio; se realizó una lista de chequeo la cual se adaptó tomando como referencia el instructivo utilizado por entidades como el INVIMA y INS. Con el desarrollo de estas actividades, se evaluó la etapa de la documentación primaria basado en la NTC-ISO-IEC 17025:2017 aplicada al laboratorio de Calidad de Aguas de la Universidad del Magdalena, los resultados del diagnóstico se enfocaron en los factores:

- ✓ Organización y Gestión.
- ✓ Talento humano.
- ✓ Infraestructura y Dotación.
- ✓ Referencia y contrarreferencia.
- ✓ Bioseguridad y Manejo de residuos.

De acuerdo a los resultados de cada uno de los factores evaluados se obtuvo un 65,1 % de cumplimiento de cumplimiento del Laboratorio de Calidad de Aguas de la Universidad del Magdalena. Como se muestra en el siguiente Cuadro, para más detalle ver Anexo 8.

Cuadro 1: Rango de cumplimiento

CONCEPTO DE LA APLICACIÓN DE LA HERRAMIENTA DE ESTANDARES	
PORCENTAJE	<b>65,1%</b>
RANGO DE CUMPLIMIENTO DE ACTA DE VISITA INICIAL	
<b>VERDE</b>	En este rango se encuentran los laboratorios que tienen un porcentaje de cumplimiento del <u>80 al 100%</u> de los requisitos de la herramienta aplicada
<b>AMARILLO</b>	En este rango se encuentran los laboratorios que tienen un porcentaje de cumplimiento del <u>30 al 79.9%</u> de los requisitos de la herramienta aplicada
<b>ROJO</b>	En este rango se encuentran los laboratorios que tienen un porcentaje de cumplimiento del <u>1 al 29,9%</u> de los requisitos de la herramienta aplicada

Se debe tener en cuenta que actualmente el laboratorio funciona apoyo a la Academia, sin embargo, este ejercicio es el primer paso para dar a conocer su estado actual y se constituye como un referente o guía para los procesos de acreditación del laboratorio

para prestar servicios de análisis fisicoquímicos y Microbiológicos en la región del Magdalena.

En cuanto a los objetivos específicos 2 y 3, los resultados de la validación de los métodos de amonio, nitritos, nitratos y fósforo reactivo realizados en el laboratorio de Calidad de Aguas de la Universidad del Magdalena, fue necesario establecer la determinación experimental de las siguientes figuras de mérito como: Linealidad, Sensibilidad, Límite de detección, Límite de cuantificación, Intervalo de trabajo, Veracidad, Repetibilidad e Incertidumbre, usando métodos estadísticos descritos para cada método como se describe a continuación en los ítems 3.1 al 3.4.

### **3.1. Validación de Nitrógeno Amoniacal $\text{NH}_4^+$ .**

Para dar cumplimiento con el objetivo de la validación del método analítico para la determinación de Amonio se calcularon los atributos de calidad descritos en la tabla 2-9, los resultados de cada uno de los atributos se registran en tabla 3-1 a la 3-11.

#### **3.1.1. Intervalo Lineal - $\text{NH}_4^+$ .**

Para el análisis de Amonio en la matriz agua continental y marina fue necesario preparar un estándar secundario de 10 mg/L  $\text{NH}_4^+$  a partir de un estándar primario certificado de 1000 mg/L  $\text{NH}_4^+$  del cual se tomó un volumen de 1ml y se aforó en matraz a un volumen de 100 ml con agua desionizada, a partir de este estándar secundario, se realizaron diluciones a diferentes concentraciones de 60, 120, 240, 480 y 600  $\mu\text{g N-NH}_4/\text{L}$ , a partir de estas concentraciones se elaboraron y se evaluaron tres curvas de calibración; una vez elaborada las curvas se verificó la linealidad por medio del coeficiente de correlación; finalmente se graficaron los resultados de las absorbancias de cada una de las concentraciones referenciadas: para dicho gráfico se tuvo en cuenta las absorbancias (Y) Vs La concentración de cada uno de los patrones secundarios

(X) con lo cual se obtiene una diagrama de dispersión como se describe en la tabla (3-1, 3-2 y figura 3-1).

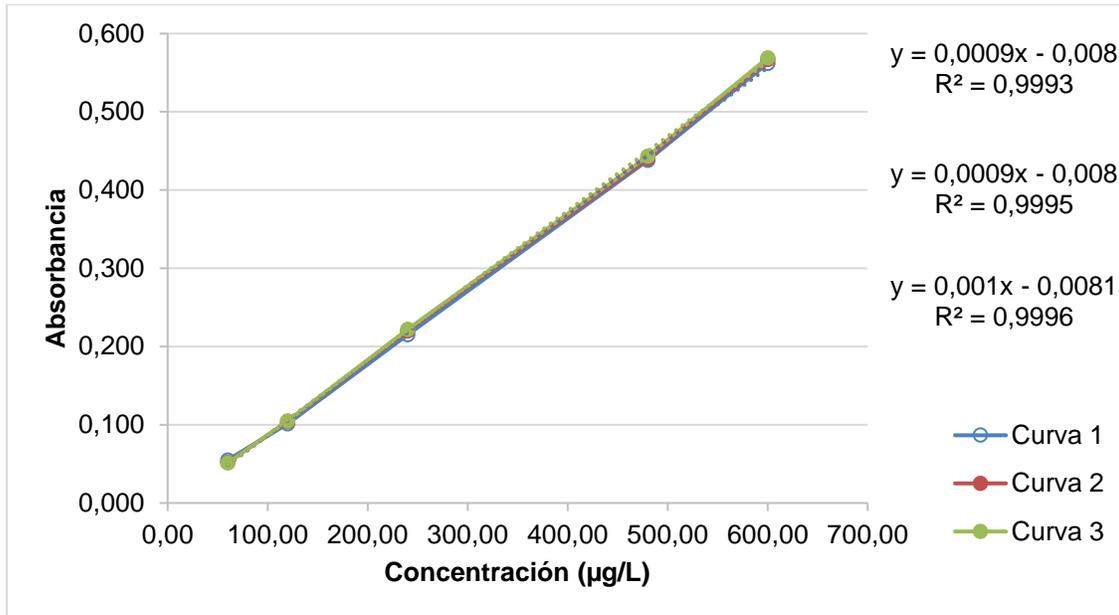
Tabla 3- 1: Preparación de la curva de Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ).

Volumen ( $\mu\text{L}$ ) tomado de patrón secundario 10 mg $\text{N-NH}_4^+/\text{L}$	Concentración ( $\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{L}$ )	Volumen final (mL)
600	60	100
1,200	120	100
2,400	240	100
4,800	480	100
6,000	600	100

Tabla 3-2: Datos obtenidos para las curvas de calibración  $\text{NH}_4^+$ .

<b>NH<sub>4</sub></b>					
<b>Thermo UV - GENESYS 10</b>					
Puntos	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Absorbancia			PROMEDIO
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	
STD 1	60,00	0,055	0,052	0,051	0,053
STD 2	120,00	0,101	0,104	0,105	0,103
STD 3	240,00	0,215	0,220	0,222	0,219
STD 4	480,00	0,438	0,440	0,443	0,440
STD 5	600,00	0,562	0,567	0,569	0,566
<b>Pendiente (m)</b>		0,00094	0,00095	0,00095	0,00095
<b>Intercepto (b)</b>		-0,0080	-0,0080	-0,0081	-0,0080
<b>Coef. Correlación</b>		0,9993	0,9995	0,9996	0,9995

Figura 3-1: Curvas de calibración para  $\text{NH}_4^+$ .



Se evaluaron las tres curvas de calibración de acuerdo a los criterios establecidos en el Standard Methods y bajo las condiciones de operación del laboratorio de Calidad de Agua de la Universidad del Magdalena. Se logró evidenciar que cada una de las determinaciones realizadas para las curvas de calibración cumplieron con los criterios de linealidad visual y el coeficiente de correlación  $R \geq 0,995$ , según Lahura (2003). considera que un coeficiente de correlación muy cercano a 1 indica que la relación entre las variables es muy fuerte, mientras que, si es muy cercano a cero, indica que la relación es muy débil.

Los coeficientes de correlación  $R^2$  calculados arrojaron valores de (0,9993), (0,9995) y (0,9996) respectivamente, indicando que existe una fuerte relación estadística entre la concentración de amonio y la absorbancia. Por lo tanto, la validez de las curvas para el análisis de nitrógeno amoniacal (Amonio) en agua Continental y marina, son confiables y se aceptan para su aplicación en el laboratorio.

### 3.1.1.1. Datos de la curva de calibración - NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

De las anteriores tres curvas de calibración elaboradas, se realizó un promedio de los resultados de las absorbancias, los interceptos, las pendientes y los coeficientes de correlación de cada una de las concentraciones mencionadas como se muestra en la tabla 3-2. Con los promedios obtenidos por cada uno de los parámetros (absorbancias, interceptos, pendientes y coeficientes de correlación) fueron sometidos nuevamente al proceso de verificación para constatar el cumplimiento de los criterios de aceptación como se indicó en el apartado 3.1.1 intervalo lineal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Para la evaluación se siguieron los criterios descritos en el Standard methods edición 23, sección 4020 B, donde se evaluó el porcentaje de error, el cual es obtenido por medio de la fórmula como lo indica el apartado 1.5.7 veracidad; los resultados obtenidos de dicha evaluación se tabularon en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3: Recalculo de los estándares utilizando los valores promedio de las curvas de calibración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> evaluadas para agua superficial y evaluación del porcentaje de error calculado.

Puntos	Concentración (mg/L)	Absorbancia Promedio	Concentración real	% error	Criterio de aceptación SM 4020B	Cumple
			(µg/L)		% error	
STD 1	60,00	0,053	64,03	6,72	≤ 50	Si
STD 2	120,00	0,103	117,50	2,08	≤ 20	Si
STD 3	240,00	0,219	239,57	0,18	≤ 20	Si
STD 4	480,00	0,440	473,14	1,43	≤ 20	Si
STD 5	600,00	0,566	605,76	0,96	≤ 10	Si
<b>Pendiente (m)</b>		0,00095				
<b>Intercepto (b)</b>		-0,0080				
<b>Coef. Correlación</b>		0,9995				

### 3.1.2. Sensibilidad - NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

La sensibilidad se calculó utilizando las pendientes de las tres curvas de calibración, según el análisis realizado, la señal de respuesta arrojó un valor de 0,000955 por 1 µg N-NH<sub>4</sub>/L (Tabla 3-4).

Tabla 3-4: Sensibilidad en la curva para la cuantificación de amonio en agua superficial.

	Pendientes	Sensibilidad (Absorbancia* $\mu\text{g/L}$ )
Curva 1	0,00094	0,00095
Curva 2	0,00095	
Curva 3	0,00095	

### 3.1.3. Estimación del Límite de Detección del Método (LDM) y Límite de Cuantificación del Método (LCM) - $\text{NH}_4^+$ .

El límite de detección del método experimental para la determinación de amonio se estimó cuantificando 10 blancos de reactivos (muestra ausente del analito en estudio) cuyos resultados se muestran en la tabla 3-5. posteriormente se aplicó la siguiente fórmula para estimar  $\text{LDM} = t(n-1) * s$ , descrito en el apartado 2.5.3, obteniendo como resultado un LDM de  $1,57 \mu\text{g N-NH}_4/\text{L}$  (Tabla 3-5).

Tabla 3- 5: Cálculo del límite de detección del método LDM-  $\text{NH}_4^+$ .

		
<b>DETERMINACIÓN LDM</b>		
<b>Método:</b>	<b>Amonio (Agua Continental y Marina)</b>	<b>Fecha:</b> 25/03/2022
<b>Equipo:</b>	<b>THERMO SPECTRONIC - UV GENESYS 10</b>	<b>Analista:</b> Sergio Tafur
<b>ITEM</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (<math>\mu\text{g NH}_4/\text{L}</math>)</b>
1	0,012	21,118
2	0,012	21,118
3	0,013	22,173
4	0,012	21,118
5	0,013	22,173
6	0,013	22,173
7	0,012	21,118
8	0,012	21,118

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

9	0,013	22,173
10	0,013	22,173
	<b>PROMEDIO</b>	21,65
	<b>DESVIACIÓN (s)</b>	0,56
	<b>%CV</b>	2,57
	<b>Valor Mínimo</b>	21,11784249
	<b>Valor Máximo</b>	22,17314833
	<b>T rechazo al LC 95%</b>	2,18
	<b>T de Rechazo de datos (Valor Mínimo)</b>	0,95
	<b>T de Rechazo de datos (Valor máximo)</b>	0,95
	<b>Valor crítico 99% n-1</b>	2,82
	<b>LDM</b>	1,57

Para el caso del LCM se calculó a partir de la primera concentración de la curva de calibración de amonio, el cual corresponde a 60  $\mu\text{g N-NH}_4/\text{L}$ . Posteriormente se realizaron 10 mediciones independientes de la absorbancia a partir de disoluciones de 60  $\mu\text{g N-NH}_4/\text{L}$  con el fin de evaluar los criterios de aceptación  $\% \text{ CV} < 15\%$  (datos homogéneos) y porcentaje de error  $< 50\%$ . (diferencia que existe entre el valor estimado y el valor real) estos datos se obtuvieron mediante el cálculo a partir de las fórmulas descritas en el ítem 1.5.5 límite de cuantificación.

El resultado del análisis arrojó que el LCM registró un CV de 0,88% indicando que los datos son homogéneos y con un % error relativo de 2,7% cumpliendo con el porcentaje  $< 50\%$ . (Tabla 3-6)

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

Tabla 3-6: Datos obtenidos en la determinación del límite de cuantificación del método  $\text{NH}_4^+$ .

		
<b>DETERMINACIÓN LCM</b>		
<b>Método:</b>	<b>Amonio (Agua superficial)</b>	<b>Fecha:</b> 30/03/2022
<b>Equipo:</b>	<b>THERMO SPECTRONIC - UV GENESYS 10</b>	<b>Analista:</b> Sergio Tafur
<b>Concentración Nominal (<math>\mu\text{g NH}_4/\text{L}</math>):</b>		<b>60,0</b>
<b>ITEM</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (<math>\mu\text{g NH}_4/\text{L}</math>)</b>
1	0,050	61,22
2	0,051	62,27
3	0,051	62,27
4	0,050	61,22
5	0,050	61,22
6	0,051	62,27
7	0,050	61,22
8	0,050	61,22
9	0,051	62,27
10	0,050	61,22
	<b>PROMEDIO</b>	<b>61,64</b>
	<b>DESVIACIÓN (s)</b>	<b>0,54</b>
	<b>%CV</b>	0,88
	<b>Error absoluto</b>	1,64
	<b>% Error relativo</b>	2,74
	<b>% Exactitud</b>	97,3
	<b>Valor Mínimo</b>	61,21946453
	<b>Valor Máximo</b>	62,27477037
	<b>T rechazo al LC 95%</b>	<b>2,18</b>
	<b>T de Rechazo de datos (Valor Mínimo)</b>	0,77
	<b>T de Rechazo de datos (Valor máximo)</b>	1,16
	<b>LCM estimado</b>	60,00
	<b>LCM experimental</b>	60,00

El ajuste del LDM se realizó a partir del cálculo de la desviación estándar obtenida en la confirmación del LCM como se muestra a continuación:

$$\text{LDM} = t_{n-1} * s$$

$$\text{LDM} = 2,82 * 0,54$$

$$\text{LDM} = 1,54$$

Este resultado de LDM es el que se utiliza o se registra como límite de detección en la prueba y es el que aparece en los reportes de resultados de análisis de muestra de agua.

#### **3.1.4. Intervalo de trabajo - NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.**

Para determinar el intervalo de trabajo del método de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), se analizaron 10 concentraciones independientes de 2,0 mg de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L donde se obtuvieron sus respectivas absorbancias, para luego determinar la concentración por medio de la pendiente y el intercepto de la curva de calibración descrita en la tabla 3-3. De dicho análisis se obtuvo los siguientes resultados para el intervalo de trabajo un %CV de 0,043 y un % error de 0,062 cumpliendo los criterios del plan de validación (%CV < 15 y % error <10). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se acepta la concentración propuesta para el intervalo de trabajo. (tabla 3-7)

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

Tabla 3-7: Intervalo de trabajo  $\text{NH}_4^+$ .

		
<b>DETERMINACION INTERVALO DE TRABAJO</b>		
<b>Método:</b>	<b>Amonio (Agua superficial)</b>	<b>Fecha:</b> 31/03/2022
<b>Equipo:</b>	<b>THERMO SPECTRONIC - UV GENESYS 10</b>	<b>Analista:</b> Sergio Tafur
<b>Concentración Nominal (<math>\mu\text{g NH}_4/\text{L}</math>):</b>		<b>2000</b>
<b>ITEM</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (<math>\mu\text{g NH}_4/\text{L}</math>)</b>
1	1,885	1997,706
2	1,886	1998,761
3	1,887	1999,816
4	1,886	1998,761
5	1,885	1997,706
6	1,887	1999,816
7	1,886	1998,761
8	1,885	1997,706
9	1,886	1998,761
10	1,887	1999,816
	<b>PROMEDIO</b>	<b>1999</b>
	<b>DESVIACIÓN (s)</b>	<b>0,9</b>
	<b>%CV</b>	0,043
	<b>%Error relativo</b>	0,062
	<b>Error absoluto</b>	1,239
	<b>%Exactitud</b>	99,94
	<b>Valor Mínimo</b>	1997,7
	<b>Valor Máximo</b>	1999,8
	<b>T de Rechazo de datos (Valor Mínimo)</b>	1,22
	<b>T de Rechazo de datos (Valor máximo)</b>	1,22
	<b>T rechazo al LC 95%</b>	<b>2,18</b>

### 3.1.5. Verificación del método - NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

La cuantificación del método de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) se realizó de acuerdo a lo propuesto en el plan de validación (Anexo 2), para lo cual se utilizó la muestra colectada en la Ciénaga de Cerro de San Antonio, probadas por dos (2) analistas en el laboratorio donde se obtienen resultados para ser sometidos a pruebas estadísticas para descartar datos atípicos, los resultados de la validación se muestran en la tabla 3-8.

El set de muestras analizado para la validación de amonio en agua superficial continental y marina fue el siguiente:

**Blanco de método- BK:** agua de desionizada con los reactivos del ensayo.

**Eb:** Estándar de concentración baja (15% del intervalo lineal) correspondiente a 90 µg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

**Ea:** Estándar de concentración alta (aproximadamente el 90% del intervalo lineal), correspondiente a 540 µg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

**MR:** Muestra real de agua

**MR+Ab:** Muestra real + adición baja de 180 µg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

**MR+Aa:** Muestra real + adición alta correspondiente a 350 µg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Tabla 3-8: Resultados obtenidos en la cuantificación del set de muestra - NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

	
<b>PAGINA 1 DE 1</b>	<b>VALIDACIÓN Y/O VERIFICACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS</b>
<b>Análisis:</b> <u>Amonio</u>	<b>Equipo:</b> <u>GENESYS 10 UV – VIS</u>
<b>Analistas:</b> <u>Sergio Tafur - Daniela Palma</u>	<b>Método:</b> <u>DETERMINACIÓN DE AMONIO POR COLORIMETRIA.S.M. 4500-NH3 - F. METODO DEL FENATO</u>

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

Validación: <u>  X  </u> Verificación: _____						
<b>DATOS DE CONCENTRACIÓN EN (µg N- NH<sub>4</sub>/L)</b>						
ENSAYO	BCO	E.b (90 µg/L)	E.a (540 µg/L)	MRAc	MRAc + Ab (180 µg/L)	MRAc + Aa (350 µg/L)
	-	<b>90</b>	<b>540</b>		<b>180</b>	<b>350</b>
Analista 1	0,00	90,3	539,7	27,0	204,5	375,5
Analista 2	0,00	89,7	541,8	27,6	200,4	369,3
Analista 1	0,00	90,2	541,4	28,5	206,9	378,9
Analista 2	0,00	91,4	542,2	27,8	202,1	370,7
Analista 1	0,00	89,9	540,3	27,8	205,1	376,8
Analista 2	0,00	91,1	538,7	28,1	203,7	371,6
Analista 1	0,00	89,9	540,6	28,2	204,4	377,2
Analista 2	0,00	90,7	540,1	27,8	204,3	376,4
<b>Promedio</b>	<b>0,00</b>	<b>90,4</b>	<b>540,6</b>	<b>27,9</b>	<b>203,9</b>	<b>374,5</b>
<b>Desviación estándar (s)</b>	0,00	0,61	1,16	0,45	1,94	3,51
<b>%CV</b>	-	0,68	0,21	1,61	0,95	0,94
<b>Valor Mínimo</b>	-	89,70	538,70	27,00	200,40	369,30
<b>Valor Máximo</b>	-	91,40	542,20	28,50	206,85	378,87
<b>N (Número de datos)</b>	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
<b>T de rechazo de datos (valor mínimo)</b>	-	1,14	1,64	1,90	1,81	1,50
<b>T de rechazo de datos (valor máximo)</b>	-	1,63	1,38	1,46	1,51	1,23
<b>Rango</b>	-	1,70	3,50	-	6,45	9,57
<b>T tabla a 95%</b>	-	2,03	2,03	-	-	-
<b>%Error (relativo)</b>	-	0,44	0,11	-	-	-
<b>Veracidad %</b>	-	99,6	99,9	-	-	-
<b>% Recuperación</b>	-	-	-	-	97,8	99,1

Adicionalmente se establecieron concentraciones para la creación de la carta de control analítico. Para la evaluación de la estabilidad del complejo se analizaron los dos estándares propuestos en el plan de validación (90 y 540 µg N/L). y se graficaron con la finalidad de observar el comportamiento de los resultados obtenidos los cuales se detallan en el Anexo 4.

### 3.1.6. Veracidad – NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

La veracidad se evaluó teniendo en cuenta el porcentaje de error y el porcentaje de recuperación para muestras fortificadas. Los resultados de la Tabla 3-9 muestran que la veracidad en función del porcentaje de error, con resultados entre 99,6% y 99,9% un error de 0,44% y 0,11% respectivamente para los estándares de trabajo, cumpliendo con lo estipulado en el instructivo de validación de métodos analíticos del IDEAM 2020 (10% < % error). La Veracidad como porcentaje de recuperación para las muestras reales, se encontró entre 97,8% y 99,1% cumpliendo un porcentaje de recuperación entre el (90<%R<110). Lo cual indica que nuestro ensayo cumplió con el rango previamente establecido, teniendo en cuenta las posibles interferencias a la hora de realizar el análisis.

Tabla 3-9: Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de validación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Muestra	Promedio	Desviación estándar	%CV	%Error	Veracidad	% R promedio
BCO	0,00	0,00	-	-	-	-
E.B	90,4	0,61	0,68	0,44	99,6	-
E. A	541	1,16	0,21	0,11	99,9	-
MRAc	27,9	0,45	1,61	-	-	-
MRAc + Ab	204	1,9	0,95	-	-	97,8
MRAc + Aa	375	3,5	0,94	-	-	99,1

### 3.1.7. Precisión - NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

#### 3.1.7.1. Repetibilidad - NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

La precisión fue evaluada bajo condiciones de repetibilidad mediante el coeficiente de variación. Para esto se analizaron los datos obtenidos de la matriz fortificada, a cada uno de los analistas se le realizó la adición de una concentración baja de un estándar conocido a la muestra real del método de amonio NH<sub>4</sub><sup>+</sup> obteniendo un coeficiente de variación reportado para cada analista de 0,6% y 0,9%, lo que indica el cumplimiento o la precisión en condiciones de repetibilidad con el criterio planteado (CV<15%). En la Tabla 3-10 se registran los datos obtenidos.

Tabla 3-10: Resultados de la repetibilidad -  $\text{NH}_4^+$ .

<b>Precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia</b>		
<b>Agua superficial (MRAc + Ab)</b>		
<b>No Datos</b>	<b>ANALISTA 1</b>	<b>ANALISTA 2</b>
1	204,5	200,4
2	206,9	202,1
3	205,1	203,7
4	204,4	204,3
<b>Promedio</b>	205,2	202,6
<b>S</b>	1,1	1,8
<b>%CV</b>	0,6	0,9

**MRAc + Ab** = Muestra Real Agua continental y marina (ciénaga de cerro de san Antonio) + adición baja ( $180 \mu\text{g N-NH}_4/\text{L}$ )

### 3.1.8. Estimación de la incertidumbre del método - $\text{NH}_4^+$ .

Para la identificación de las fuentes de incertidumbre en la cuantificación de Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), se muestran los resultados de las contribuciones de cada variable asociada al análisis encontrando las siguientes incertidumbres descritas en la tabla 3-11.

Tabla 3- 11:Fuentes de incertidumbre para la determinación amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en agua superficial continental y marina.

<b>Fuentes de incertidumbre</b>	<b>ID Equipo</b>	<b>Incertidumbre Certificado de Calibración</b>	<b>Resolución del Equipo</b>	<b>Incertidumbre de Calibración K=2</b>	<b>Incertidumbre de Instrumento Rectangular res/raíz (3)</b>
<b>INCERTIDUMBRE DEL EQUIPO</b>					
Espectrofotómetro	ESP-02546	0,5	0,001	0,250000	0,00029 <b>0,25000</b>
<b>MEDIDAS VOLUMETRICAS</b>					
Transfer pipeta (100-1000uL)	Tranf-CA	0,06	0,04	0,052	0,01155
Matraz volumétrico (100 mL)	CA-UM	0,01		0,010	

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

			<b>0,01305</b>
<b>SOLUCION ESTANDAR</b>			
Solución MERCK Amonio 1000mg/L	<b>0,4</b>	<b>0,200000</b>	<b>0,20000</b>
<b>DEBIDO A LA REPETIBILIDAD</b>			
	<b>No. de Datos</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Incertidumbre de Repetición</b>
Estándar bajo	8	0,6	0,2
Estándar alto	8	1,2	0,4
			<b>0,46279</b>
<b>Incertidumbre Total</b>			<b>0,6</b>
<b>Incertidumbre Expandida</b>			<b>1,1</b>

### 3.1.9. Declaración de aptitud del método - $\text{NH}_4^+$ .

El método de Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), basado en el Standard methods, edición 23 del 2017, 4500-NH3 F. Phenate Method, y en lo estipulado por Strickland J.D.H. y Parsons T.R. 1972. A PRACTICAL HANDBOOK OF SEAWATER ANALYSIS, BULLETIN 167 (Second Edition). Es válido para su aplicación en el Laboratorios de Calidad de Aguas de la Universidad del Magdalena ya que cumplió con los parámetros establecidos en las figuras de mérito para el método, para lo cual se estableció el procedimiento analítico, descrito con las siguientes siglas **PR – LABCA – UM –  $\text{NH}_4^+$**

**PR**= Procedimiento

**LABCA**= Laboratorio Calidad de Agua

**UM**= Universidad Del Magdalena

**$\text{NH}_4^+$** = Ion Amonio

### 3.2. Validación de Nitritos $\text{NO}_2^-$ .

Para dar cumplimiento con el objetivo de la validación del método analítico para la determinación de nitritos se calcularon los atributos de calidad descritos en la tabla 2-9, los resultados de cada uno de los atributos se registran en tabla 3-12 a la 3-22.

#### 3.2.1. Intervalo Lineal - $\text{NO}_2^-$ .

Para el análisis de nitritos en la matriz agua superficial continental y marina fue necesario preparar un estándar secundario de  $10.000 \mu\text{g/L NO}_2^-$  a partir de un estándar primario certificado de  $1000 \text{ mg/L NO}_2^-$  del cual se tomó un volumen de 1 ml y se aforó en matraz a volumen de 100 ml con agua desionizada, a partir de este estándar secundario, se realizaron diferentes concentraciones de 6, 10, 50, 100, 150 y  $200 \mu\text{g N-NO}_2^-/\text{L}$ , a partir de estas concentraciones se elaboraron y se evaluaron tres curvas de calibración en días diferentes; una vez elaboradas las curvas se verificó la linealidad por medio del coeficiente de correlación; finalmente se graficaron los resultados de las absorbancias de cada una de las concentraciones referenciadas, para dicho gráfico se tuvo en cuenta las absorbancias (Y) Vs La concentración (X) de cada uno de los patrones secundarios para obtener un diagrama de dispersión como se describe en la tabla (3-12, 3-13 y figura 3-4).

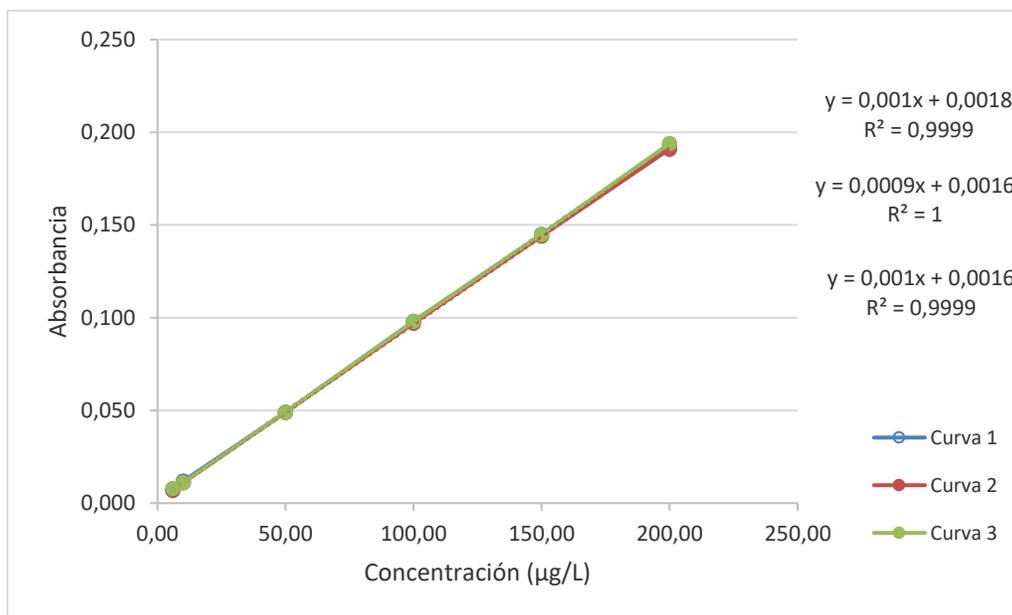
Tabla 3- 12:Preparación de la curva de Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).

Volumen ( $\mu\text{L}$ ) tomado de patrón secundario $10 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$	Concentración ( $\mu\text{g N-NO}_2^-/\text{L}$ )	Volumen final (mL)
60	6	100
100	10	100
500	50	100
1,000	100	100
1,500	150	100
2,000	200	100

Tabla 3-13: Datos obtenidos para las curvas de calibración  $\text{NO}_2^-$ .

Thermo UV - GENESYS 10					
Puntos	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Absorbancia			PROMEDIO
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	
STD 1	6,00	0,007	0,007	0,008	0,007
STD 2	10,00	0,012	0,011	0,011	0,011
STD 3	50,00	0,049	0,049	0,049	0,049
STD 4	100,00	0,098	0,097	0,098	0,098
STD 5	150,00	0,145	0,144	0,145	0,145
STD 6	200,00	0,193	0,191	0,194	0,193
<b>Pendiente (m)</b>		0,000956	0,000949	0,000960	0,000955
<b>Intercepto (b)</b>		0,001752	0,001562	0,001611	0,001642
<b>Coef. Correlación</b>		0,9999	1,0000	0,9999	1,0000

Figura 3- 2: Curvas de calibración  $\text{NO}_2^-$ .



Se evaluaron las tres curvas de calibración de acuerdo a los criterios establecidos en el Standard Methods y bajo las condiciones de operación del laboratorio de Calidad de Agua de la Universidad del Magdalena. Se evidenció que cada una de las determinaciones realizadas para las curvas de calibración cumplieron con los criterios de linealidad visual y el coeficiente de correlación  $R \geq 0,995$ . Según Lahura (2003).

considera que un coeficiente de correlación muy cercano a 1 indica que la relación entre las variables es muy fuerte, mientras que, si es muy cercano a cero, indica que la relación es muy débil. Los coeficientes de correlación  $R^2$  calculados arrojaron valores de (0,9999), (1) y (0,9999) respectivamente, indicando que hay una fuerte relación estadística entre la concentración de nitritos y la absorbancia. Por lo tanto, la validez de las curvas para el análisis de nitritos en agua superficial continental y marina, son confiables y se aceptan para su aplicación en el laboratorio.

### 3.2.1.1. Datos de la curva de calibración - $\text{NO}_2^-$ .

De las anteriores tres curvas de calibración, se promediaron los resultados de las absorbancias, los interceptos, las pendientes y los coeficientes de correlación por cada una de las concentraciones mencionadas como se muestra en la tabla 3-13. Con los promedios obtenidos por cada uno de los parámetros (absorbancias, interceptos, pendientes y coeficientes de correlación) los promedios nuevamente fueron sometidos al proceso de verificación para constatar el cumplimiento de los criterios de aceptación como se indicó en el apartado 3.2.1 intervalo lineal ( $\text{NO}_2^-$ ). Para la evaluación se siguieron los criterios descritos en el Standard methods edición 23, sección 4020 B, donde se evaluó el porcentaje de error el cual es obtenido por medio de la fórmula como lo indica el apartado 1.5.7 veracidad; los resultados obtenidos de dicha evaluación se tabularon, indicando el cumplimiento de los criterios descrito en la siguiente Tabla 3-14.

Tabla 3-14: Recalculo de los estándares utilizando los valores promedio de las curvas de calibración de  $\text{NO}_2^-$  evaluadas para agua Continental y evaluación del porcentaje de error calculado.

Puntos	Concentración (mg/L)	Absorbancia Promedio	Concentración real	% error	Criterio de aceptación SM 4020B	Cumple
			( $\mu\text{g/L}$ )		% error	
STD 1	6,00	0,007	5,96	0,68	$\leq 50$	Si
STD 2	10,00	0,011	10,15	1,48	$\leq 20$	Si
STD 3	50,00	0,049	49,59	0,83	$\leq 20$	Si
STD 4	100,00	0,098	100,54	0,54	$\leq 20$	Si
STD 5	150,00	0,145	149,75	0,16	$\leq 20$	Si
STD 6	200,00	0,193	200,01	0,01	$\leq 10$	Si

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

<b>Pendiente (m)</b>		0,000955				
<b>Intercepto (b)</b>		0,001642				
<b>Coef. Correlación</b>		1,0000				

### 3.2.2. Sensibilidad - NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

La sensibilidad se calculó utilizando las pendientes de las tres curvas de calibración, según el análisis realizado la señal de respuesta arrojó un valor de 0,000955 por 1 µg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L (Tabla 3-15).

Tabla 3-15: Sensibilidad en la curva para la cuantificación de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) en agua superficial.

	<b>Pendientes</b>	<b>Sensibilidad (Absorbancia*µg/L)</b>
Curva 1	0,000956	0,000955
Curva 2	0,000949	
Curva 3	0,000960	

### 3.2.3. Estimación del límite de detección del método (LDM) y límite de cuantificación del método (LCM) - NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

El límite de detección del método experimental para la determinación de nitritos se estimó cuantificando 10 blancos de reactivos (muestra ausente del analito en estudio) cuyos resultados se muestran en la tabla 3-16. posteriormente se aplicó la siguiente fórmula para estimar  $LDM = t(n-1) * s$ , descrito en el apartado 2.5.3, obteniendo como resultado un LDM de 1,52 µg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L (Tabla 3-16).

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

Tabla 3-16: Cálculo del límite de detección del método NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

		
<b>DETERMINACIÓN LDM</b>		
<b>Método:</b>	<b>Nitritos (Agua Superficial)</b>	<b>Fecha:</b> 10/03/2022
<b>Equipo:</b>	<b>THERMO SPECTRONIC - UV GENESYS 10</b>	<b>Analista:</b> Sergio Tafur
<b>ITEM</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (µg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L)</b>
1	0,001	-0,672
2	0,002	0,375
3	0,002	0,375
4	0,002	0,375
5	0,001	-0,672
6	0,002	0,375
7	0,001	-0,672
8	0,002	0,375
9	0,002	0,375
10	0,001	-0,672
	<b>PROMEDIO</b>	-0,043585147
	<b>DESVIACIÓN (s)</b>	0,54
	<b>%CV</b>	-1241
	<b>Valor Mínimo</b>	-0,671810349
	<b>Valor Máximo</b>	0,375231655
	<b>T rechazo al LC 95%</b>	2,18
	<b>T de Rechazo de datos (Valor Mínimo)</b>	1,16
	<b>T de Rechazo de datos (Valor máximo)</b>	0,77
	<b>Valor crítico 99% n-1</b>	2,82
	<b>LDM</b>	1,52

Para el caso del LCM se calculó a partir de la primera concentración de la curva de calibración de nitritos, el cual corresponde a 6 µg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L. Posteriormente se

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

realizaron 10 mediciones independientes de la absorbancia a partir de disoluciones de  $6 \mu\text{g N-NO}_2^-/\text{L}$  con el fin de evaluar los criterios de aceptación  $\% \text{ CV} < 15\%$  (datos homogéneos) y porcentaje de error  $< 50\%$ . (diferencia que existe entre el valor estimado y el valor real) estos datos se obtuvieron mediante cálculo a partir de las fórmulas descritas en el ítem 1.5.5 límite de cuantificación.

El resultado del análisis arrojó que el LCM registró un CV de 7,3922% indicando que los datos son homogéneos con un % error relativo de 0,7920% cumpliendo  $< 50\%$ . (Tabla 3-17)

Tabla 3-17: Datos obtenidos en la determinación del Límite de cuantificación del método  $\text{NO}_2^-$ .

		
<b>DETERMINACIÓN LIMITE DE CUANTIFICACION DEL METODO</b>		
<b>Método:</b>	<b>Nitritos (Agua Continental)</b>	<b>Fecha:</b> 11/03/2022
<b>Equipo:</b>	<b>THERMO SPECTRONIC - UV GENESYS 10</b>	<b>Analista:</b> Sergio Tafur
<b>Concentración Nominal (<math>\mu\text{g N-NO}_2^-/\text{L}</math>):</b>		<b>6,00</b>
<b>ITEM</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (<math>\mu\text{g NO}_2^-/\text{L}</math>)</b>
1	0,007	5,73
2	0,007	5,73
3	0,008	6,79
4	0,007	5,73
5	0,007	5,84
6	0,008	6,79
7	0,007	5,73
8	0,007	5,73
9	0,007	5,73
10	0,007	5,73
<b>PROMEDIO</b>		<b>5,95</b>

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

<b>DESVIACIÓN (s)</b>	<b>0,4</b>
<b>%CV</b>	7,4
<b>Error absoluto</b>	0,05
<b>% Error relativo</b>	0,8
<b>% Exactitud</b>	99,21
<b>Valor Mínimo</b>	5,73116806
<b>Valor Máximo</b>	6,78502581
<b>T rechazo al LC 95%</b>	<b>2,18</b>
<b>T de Rechazo de datos (Valor Mínimo)</b>	0,50
<b>T de Rechazo de datos (Valor máximo)</b>	1,89
<b>LCM estimado</b>	5,41
<b>LCM experimental</b>	6,00

El ajuste del LDM se realizó a partir del cálculo de la desviación estándar obtenida en la confirmación del LCM como se muestra a continuación:

$$\text{LDM} = t_{n-1} * s$$

$$\text{LDM} = 2,82 * 0,4$$

$$\text{LDM} = 1,24$$

Este resultado de LDM es el que se utiliza o se registra como límite de detección en la prueba en los reportes de resultados de análisis de agua donde se determine los nitritos.

### 3.2.4. Intervalo de trabajo - NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Para determinar el intervalo de trabajo del método de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), se analizaron 10 concentraciones independientes de 1,0 mg de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L donde se obtuvieron sus respectivas absorbancias para luego determinar la concentración por medio de la pendiente y el intercepto de la curva de calibración ya evaluada en la tabla 3-14. Obteniendo los siguientes resultados para el intervalo de trabajo un %CV de 0,2158 y un % error de 0,5537 cumpliendo los criterios del plan de validación (%CV < 15 y

% error <10). Teniendo en cuenta dichos resultados, se acepta la concentración propuesta para el intervalo de trabajo. (tabla 3-18)

Tabla 3-18:Intervalo de trabajo NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

 <b>DETERMINACION INTERVALO DE TRABAJO</b>		
<b>Método:</b>	<b>Nitritos (Agua Continental)</b>	<b>Fecha:</b> 14/03/2022
<b>Equipo:</b>	<b>THERMO SPECTRONIC - UV GENESYS 10</b>	<b>Analista:</b> Sergio Tafur
<b>Concentración Nominal (µg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L):</b>		<b>1000</b>
<b>ITEM</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (µg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L)</b>
1	0,955	1004,8
2	0,957	1006,9
3	0,959	1009,0
4	0,953	1002,7
5	0,955	1004,8
6	0,956	1005,9
7	0,957	1006,9
8	0,958	1007,9
9	0,954	1003,7
10	0,953	1002,7
	<b>PROMEDIO</b>	<b>1006</b>
	<b>DESVIACIÓN (s)</b>	<b>2,2</b>
	<b>%CV</b>	0,22
	<b>%Error relativo</b>	0,55
	<b>Error absoluto</b>	5,54
	<b>%Exactitud</b>	99,446
	<b>Valor Mínimo</b>	1002,7
	<b>Valor Máximo</b>	1009,0
	<b>T de Rechazo de datos (Valor Mínimo)</b>	1,32

	<b>T de Rechazo de datos (Valor máximo)</b>	1,60
	<b>T rechazo al LC 95%</b>	2,18

### 3.2.5. Verificación del método - $\text{NO}_2^-$ .

La cuantificación del método de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) se realizó de acuerdo a lo propuesto en el plan de validación ver Anexo 2, para ello se utilizó la muestra colectada en la ciénaga Grande de Santa Marta (CGSM), y probadas por dos (2) analistas en el laboratorio donde se obtienen resultados para ser sometidos a pruebas estadísticas para descartar posibles datos atípicos, los resultados de la validación se muestran en la tabla 3-19.

El set de muestras analizado para la validación de nitritos en agua superficial continental y marina fue el siguiente:

**Blanco de método- BK:** agua de desionizada con los reactivos del ensayo.

**Eb:** Estándar de concentración baja (10% del intervalo lineal) correspondiente a 30  $\mu\text{g NO}_2^-$

**Ea:** Estándar de concentración alta (aproximadamente el 90% del intervalo lineal), correspondiente a 180  $\mu\text{g NO}_2^-$

**MR:** Muestra real de agua

**MR+Ab:** Muestra real + adición baja de 60  $\mu\text{g NO}_2^-$

**MR+Aa:** Muestra real + adición alta correspondiente a 120  $\mu\text{g NO}_2^-$

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

Tabla 3-19: Resultados obtenidos en la cuantificación del set de muestra - NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

 <b>PAGINA 1 DE 1</b> <b>VALIDACIÓN Y/O VERIFICACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS</b>						
<b>Análisis:</b> Nitritos <hr style="width: 100px; margin: 0 auto;"/>		<b>Equipo:</b> GENESYS 10 UV – VIS <hr style="width: 100px; margin: 0 auto;"/>				
<b>Analistas:</b> Sergio Tafur - Daniela Palma <hr style="width: 100px; margin: 0 auto;"/>		<b>Método:</b> DETERMINACIÓN DE NITRITOS POR COLORIMETRIA.S. M. 4500-NO2- B. <hr style="width: 100px; margin: 0 auto;"/>				
<b>Validación:</b> <u>  X  </u> <b>Verificación:</b> _____						
DATOS DE CONCENTRACIÓN EN (µg N - NO <sub>2</sub> /L)						
ENSAYO	BCO	E.b (30 µg/L)	E.a (180 µg/L)	MRAc	MRAc + Ab (60 µg/L)	MRAc + Aa (120 µg/L)
	-	<b>30</b>	<b>180</b>	-	<b>60</b>	<b>120</b>
Analista 1	0,00	29,7	181,5	6,7	70,5	134,4
Analista 2	0,00	29,0	180,0	6,7	70,2	133,9
Analista 1	0,00	28,6	181,6	7,7	70,1	132,3
Analista 2	0,00	30,0	179,5	6,7	69,9	132,6
Analista 1	0,00	30,7	180,6	6,7	72,6	136,5
Analista 2	0,00	29,9	179,8	6,7	70,3	135,1
Analista 1	0,00	29,7	181,5	6,7	70,5	132,3
Analista 2	0,00	31,4	178,9	7,7	69,6	130,1
<b>Promedio</b>	<b>0,00</b>	<b>29,9</b>	<b>180,4</b>	<b>6,9</b>	<b>70,5</b>	<b>133,4</b>
<b>Desviación estándar (s)</b>	0,00	0,88	1,03	0,47	0,92	1,99
<b>%CV</b>	-	2,95	0,57	6,79	1,31	1,49

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

<b>Valor Mínimo</b>	-	28,65	178,90	6,66	69,60	130,10
<b>Valor Máximo</b>	-	31,40	181,56	7,70	72,62	136,49
<b>N (Número de datos)</b>	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
<b>T de rechazo de datos (valor mínimo)</b>	-	1,41	1,48	0,60	0,94	1,66
<b>T de rechazo de datos (valor máximo)</b>	-	1,72	1,11	1,62	2,33	1,56
<b>Rango</b>	-	2,75	2,66	-	3,02	6,39
<b>T tabla a 95%</b>	-	2,03	2,03	-	-	-
<b>%Error (relativo)</b>	-	0,38	0,23	-	-	-
<b>Veracidad %</b>	-	99,6	99,8	-	-	-
<b>% Recuperación</b>	-	-	-	-	105,9	105,4

Adicionalmente se establecieron concentraciones para la creación de la carta de control analítico. Para la evaluación de la estabilidad del complejo se analizaron los dos estándares propuestos en el plan de validación (30 y 180  $\mu\text{g N-NO}_2^-/\text{L}$ ). y se graficaron con la finalidad para observar el comportamiento de los resultados, los cuales se observan en el Anexo 4.

### 3.2.6. Veracidad - $\text{NO}_2^-$ .

La veracidad se evaluó teniendo en cuenta el porcentaje de error y el porcentaje de recuperación para muestras fortificadas. Los resultados de la Tabla 3-20 muestran que la veracidad en función del porcentaje de error estuvo entre 99,5% y 99,6% con un error de 0,51% y 0,38% respectivamente para los estándares de trabajo, cumpliendo lo estipulado en el instructivo de validación de métodos analíticos del IDEAM (10% < % error). La Veracidad como porcentaje de recuperación para las muestras reales, se encontró entre 105,4 % y 105,9% cumpliendo un porcentaje de recuperación entre el (90%<R<110). indicando que los ensayo cumplieron los supuestos planteados y dentro del rango teniendo en cuenta las posibles interferencias a la hora de realizar el análisis.

Tabla 3-20: Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de validación de  $\text{NO}_2^-$

Muestra	Promedio	Desviación estándar	%CV	%Error	Veracidad	% R promedio
BCO	0,00	0,00	-	-	-	-
E.B	29,9	0,88	2,95	0,38	99,6	-
E. A	180	1,03	0,57	0,23	99,8	-
MRAc	6,9	0,47	6,79	-	-	-
MRAc + Ab	70	0,9	1,31	-	-	105,9
MRAc + Aa	133	2,0	1,49	-	-	105,4

### 3.2.7. Precisión - $\text{NO}_2^-$ .

#### 3.2.7.1. Repetibilidad - $\text{NO}_2^-$ .

La precisión fue evaluada bajo condiciones de repetibilidad mediante el coeficiente de variación. Para esto se analizaron los datos obtenidos de la matriz fortificada, cada uno de los analistas realizó la adición de una concentración baja de un estándar conocido a la muestra real del método de nitrito  $\text{NO}_2^-$  obteniendo un coeficiente de variación reportado para cada analista de 0,5% y 1,6% lo cual indica el cumplimiento o la precisión en condiciones de repetibilidad con el criterio planteado ( $\text{CV} < 15\%$ ). En la siguiente tabla se registran los datos obtenidos (Tabla 3-21).

Tabla 3-21: resultados de la Repetibilidad -  $\text{NO}_2^-$ .

<b>Precisión en términos de Repetibilidad y precisión intermedia</b>		
<b>Agua continental (MRAc + Ab)</b>		
<b>No Datos</b>	<b>ANALISTA 1</b>	<b>ANALISTA 2</b>
1	70,5	70,2
2	70,1	69,9
3	72,6	70,3
4	70,5	69,6
<b>Promedio</b>	<b>70,9</b>	<b>70,0</b>
<b>S</b>	<b>1,1</b>	<b>0,3</b>
<b>%CV</b>	<b>1,6</b>	<b>0,5</b>

**MRAc + Ab** = Muestra Real Agua continental y marina (Ciénaga Grande de Santa Marta) + adición baja (60 µg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L).

### 3.2.8. Estimación de la incertidumbre del método - NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Para la identificación de las fuentes de incertidumbre en la cuantificación de Nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), se muestran los resultados de las contribuciones de cada variable asociada al análisis encontrando las siguientes incertidumbres descritas en la tabla 3-22.

Tabla 3-22: Fuentes de incertidumbre para la determinación Nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) en agua Continental y marina.

Fuentes de incertidumbre	ID Equipo	Incertidumbre Certificado de Calibración	Resolución del Equipo	Incertidumbre de Calibración K=2	Incertidumbre de Instrumento Rectangular res/raíz (3)
<b>INCERTIDUMBRE DEL EQUIPO</b>					
Espectrofotómetro	ESP-02546	0,5	0,001	0,250000	0,00029
					<b>0,25000</b>
<b>MEDIDAS VOLUMETRICAS</b>					
Transferpipeta (100-1000uL)	Tranf-CA	0,06	0,04	0,052	0,01155
Matraz volumétrico (100 mL)	CA-UM	0,01		0,010	
					<b>0,01305</b>
<b>SOLUCION ESTANDAR</b>					
Solución MERCK Nitritos 1000mg/L		0,7		0,350000	
					<b>0,35000</b>
<b>DEBIDO A LA REPETIBILIDAD</b>					
	No. de Datos	Desviación Estándar		Incertidumbre de Repetición	
Estándar bajo	8	0,9		0,3	
Estándar alto	8	1,0		0,4	
					<b>0,47894</b>
<b>Incertidumbre Total</b>				<b>0,6</b>	
<b>Incertidumbre Expandida</b>				<b>1,3</b>	

### **3.2.9. Declaración de aptitud del método - NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.**

El método de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), basado en el Standard methods, edición 23 del 2017, 4500-NO<sub>2</sub>- B, y en lo estipulado por Strickland J.D.H. y Parsons T.R. 1972. A PRACTICAL HANDBOOK OF SEAWATER ANALYSIS, BULLETIN 167 (Second Edition). Es válido para su aplicación en el Laboratorios de Calidad de Aguas de la Universidad del Magdalena dado que cumplió con los parámetros establecidos en las figuras de mérito para el método, para el cual se estableció el procedimiento analítico en el laboratorio descrito con las siguientes siglas **PR – LABCA – UM – NO<sub>2</sub><sup>-</sup>**

**PR**= Procedimiento

**LABCA**= Laboratorio Calidad de Agua

**UM**= Universidad Del Magdalena

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>**= Nitritos

### **3.3. Validación de Nitratos NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.**

Para dar cumplir con el objetivo de la validación del método analítico para la determinación de nitratos se calcularon los atributos de calidad descritos en la tabla 2-9, los resultados de cada uno de los atributos se registran en tabla 3-23 a la 3-33.

#### **3.3.1. Intervalo Lineal - NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.**

Para el análisis de nitratos en la matriz agua superficial continental y marina fue necesario preparar un estándar secundario de 10.000 µg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a partir de un estándar primario certificado de 1000 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup> del cual se tomó un volumen de 1 ml y se aforó en matraz a volumen de 100 ml con agua desionizada, a partir de este estándar secundario, se realizaron diferentes concentraciones de 10, 50, 100, 200, 500 y 1000 µg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, con estas concentraciones se elaboraron y se evaluaron tres curvas de

calibración en días diferentes; una vez elaborada las curvas se verificó la linealidad por medio del coeficiente de correlación; finalmente se graficaron los resultados de las absorbancias de cada una de las concentraciones referenciadas: para dicho gráfico se tuvo en cuenta las absorbancias (Y) Vs La concentración (X) de cada uno de los patrones secundarios, con lo cual se obtiene una diagrama de dispersión como se describe en la tabla (3-23, 3-24 y figura 3-7).

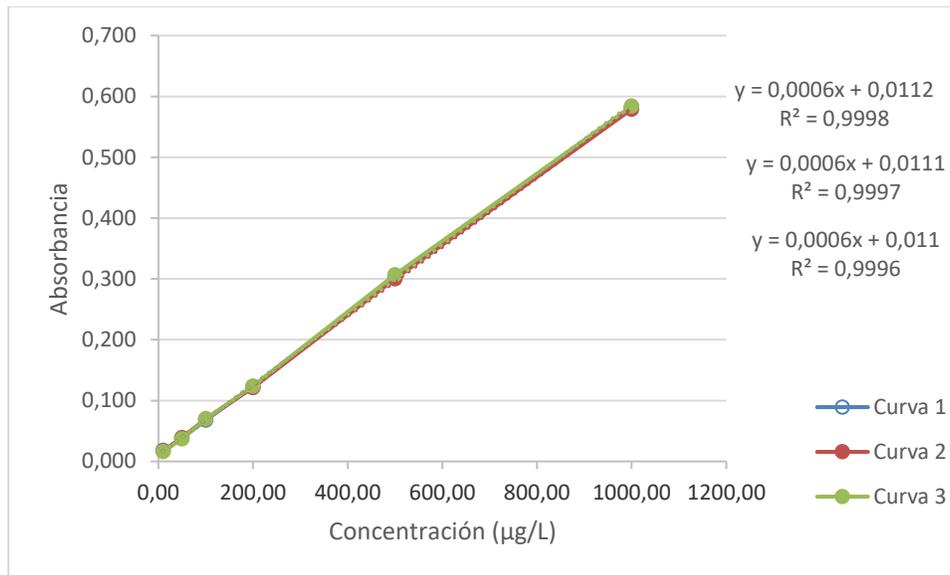
Tabla 3- 23: Preparación de la curva de nitratos  $\text{NO}_3^-$ .

Volumen ( $\mu\text{L}$ ) tomado de patrón secundario 10 mg N- $\text{NO}_3^-/\text{L}$	Concentración ( $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{L}$ )	Volumen final (mL)
100	10	100
500	50	100
1 mL	100	100
2 mL	200	100
5 mL	500	100
10 mL	1000	100

Tabla 3-24: Datos obtenidos para las curvas de calibración  $\text{NO}_3^-$ .

Thermo UV - GENESYS 10					
Puntos	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	ABSORBANCIA			PROMEDIO
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	
STD 1	10,00	0,018	0,017	0,016	0,017
STD 2	50,00	0,038	0,039	0,037	0,038
STD 3	100,00	0,068	0,070	0,070	0,069
STD 4	200,00	0,123	0,121	0,124	0,123
STD 5	500,00	0,305	0,300	0,307	0,304
STD 6	1000,00	0,583	0,579	0,584	0,582
<b>Pendiente (m)</b>		0,00057	0,00057	0,00058	0,00057
<b>Intercepto (b)</b>		0,0108	0,0112	0,0108	0,0109
<b>Coef. Correlación</b>		0,9997	0,9998	0,9998	0,9998

Figura 3-3: Curvas de calibración  $\text{NO}_3^-$ .



Se evaluaron las tres curvas de calibración de acuerdo a los criterios establecidos en el Standard Methods y bajo las condiciones de operación del laboratorio de Calidad de Agua de la Universidad del Magdalena. Se evidenció que cada una de las determinaciones realizadas para las curvas de calibración cumplieron con los criterios de linealidad visual y el coeficiente de correlación  $R \geq 0,995$ . Según Lahura (2003), considera que un coeficiente de correlación muy cercano a 1 indica que la relación entre las variables es muy fuerte, mientras que, si es muy cercano a cero, indica que la relación es muy débil. Los coeficientes de correlación  $R^2$  calculados arrojaron valores de (0,9998), (0,9997) y (0,9996) respectivamente, indicando que existe una fuerte relación estadística entre la concentración de nitrato y la absorbancia. Por lo tanto, la validez de las curvas para el análisis de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en agua superficial continental y marina, son confiables y se aceptan para su aplicación en el laboratorio.

### 3.3.1.1. Datos de la curva de calibración - $\text{NO}_3^-$ .

De las anteriores tres curvas de calibración, se promediaron los resultados de las absorbancias, los interceptos, las pendientes y los coeficientes de correlación por cada una de las concentraciones mencionadas como se muestra en la tabla 3-24. Con los

promedios obtenidos por cada uno de los parámetros (absorbancias, interceptos, pendientes y coeficientes de correlación) dichos promedios nuevamente fueron sometidos al proceso de verificación para constatar el cumplimiento de los criterios de aceptación como se indicó en el apartado 3.3.1 intervalo lineal de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ). Para la evaluación se siguieron los criterios descritos en el Standard methods edición 23, sección 4020 B, donde se evaluó el porcentaje de error el cual es obtenido por medio de la fórmula como lo indica el apartado 1.5.7 veracidad; los resultados de dicha evaluación se tabularon, indicando el cumplimiento de los criterios descrito en la siguiente Tabla 3-25.

Tabla 3-25: Recalculo de los estándares utilizando los valores promedio de las curvas de calibración de  $\text{NO}_3^-$  evaluadas para agua superficial continental y marina y evaluación del porcentaje de error calculado.

Puntos	Concentración (mg/L)	Absorbancia Promedio	Concentración real	% error	Criterio de aceptación SM 4020B	Cumple
			( $\mu\text{g/L}$ )		% error	
STD 1	10,00	0,017	10,61	6,10	$\leq 50$	Si
STD 2	50,00	0,038	47,23	5,53	$\leq 20$	Si
STD 3	100,00	0,069	101,88	1,88	$\leq 20$	Si
STD 4	200,00	0,123	194,89	2,55	$\leq 20$	Si
STD 5	500,00	0,304	511,14	2,23	$\leq 20$	Si
STD 6	1000,00	0,582	995,98	0,40	$\leq 10$	Si
<b>Pendiente (m)</b>		0,00057				
<b>Intercepto (b)</b>		0,0109				
<b>Coef. Correlación</b>		0,9998				

### 3.3.2. Sensibilidad - $\text{NO}_3^-$ .

La sensibilidad se calculó utilizando las pendientes de las tres curvas de calibración, según el análisis realizado, la señal de respuesta arrojó un valor de 0,00057 por  $1 \mu\text{g N-NO}_3^-/\text{L}$  (Tabla 3-26).

Tabla 3-26: Sensibilidad en la curva para la cuantificación de Nitrato (NO<sub>3</sub>) en agua Continental y marina.

	Pendientes	Sensibilidad (Absorbancia*µg/L)
Curva 1	0,00057	0,00057
Curva 2	0,00057	
Curva 3	0,00058	

### 3.3.3. Estimación del límite de detección del método (LDM) y límite de cuantificación del método (LCM) - NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

El límite de detección del método experimental para la determinación de nitratos se estimó cuantificando 10 blancos de reactivos (muestra ausente del analito en estudio) cuyos resultados se muestran en la tabla 3-27. posteriormente se aplicó la siguiente fórmula para estimar  $LDM = t(n-1) * s$ , descrito en el apartado 2.5.3, obteniendo como resultado un LDM de 4,64 µg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (Tabla 3-27).

Tabla 3-27: Datos obtenidos en el cálculo del límite de detección del método NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

		
<b>DETERMINACIÓN LDM</b>		
<b>Método:</b>	<b>Nitratos (Agua superficial)</b>	<b>Fecha:</b> 10/05/2022
<b>Equipo:</b>	<b>THERMO SPECTRONIC - UV GENESYS 10</b>	<b>Analista:</b> Sergio Tafur
<b>ITEM</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (µg N-NO<sub>3</sub>/L)</b>
1	0,009	-3,342
2	0,011	0,146
3	0,010	-1,598
4	0,011	0,146
5	0,009	-3,342
6	0,009	-3,342
7	0,011	0,146

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

8	0,010	-1,598
9	0,009	-3,342
10	0,011	0,146
	<b>PROMEDIO</b>	-1,59796291
	<b>DESVIACIÓN (s)</b>	1,644
	<b>%CV</b>	-103
	<b>Valor Mínimo</b>	-3,341981359
	<b>Valor Máximo</b>	0,14605554
	<b>T rechazo al LC 95%</b>	2,18
	<b>T de Rechazo de datos (Valor Mínimo)</b>	1,06
	<b>T de Rechazo de datos (Valor máximo)</b>	1,06
	<b>Valor critico 99% n-1</b>	2,82
	<b>LDM</b>	4,64

Para el caso del LCM se calculó a partir de la primera concentración de la curva de calibración de nitrato, el cual corresponde a 10  $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{L}$ . Posteriormente se realizaron 10 mediciones independientes de la absorbancia a partir de disoluciones de 10  $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{L}$  con el fin de evaluar los criterios de aceptación  $\% \text{CV} < 15\%$  (datos homogéneos) y porcentaje de error  $< 50\%$ . (diferencia que existe entre el valor estimado y el valor real) estos datos se obtuvieron mediante el cálculo a partir de las fórmulas descritas en el ítem 1.5.5 límite de cuantificación.

El resultado del análisis arrojó que el LCM registró un CV de 8,4% indicando que los datos son homogéneos y con un % error relativo de 0,9% cumpliendo  $< 50\%$ . (Tabla 3-28)

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

Tabla 3-28: Datos obtenidos en la determinación del Límite de cuantificación del método NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

		
<b>DETERMINACIÓN LIMITE DE CUANTIFICACION DEL METODO</b>		
<b>Método:</b>	Nitritos (Agua Continental)	<b>Fecha:</b> 11/05/2022
<b>Equipo:</b>	THERMO SPECTRONIC - UV GENESYS 10	<b>Analista:</b> Sergio Tafur
<b>Concentración Nominal (µg N-NO<sub>3</sub>/L):</b>		<b>10,00</b>
<b>ITEM</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (µg NO<sub>3</sub>/L)</b>
1	0,017	10,61
2	0,016	8,87
3	0,016	8,87
4	0,017	10,61
5	0,017	10,61
6	0,017	10,61
7	0,017	10,61
8	0,017	10,61
9	0,017	10,61
10	0,016	8,87
	<b>PROMEDIO</b>	<b>10,09</b>
	<b>DESVIACIÓN (s)</b>	<b>0,8</b>
	<b>%CV</b>	8,4
	<b>Error absoluto</b>	0,09
	<b>% Error relativo</b>	0,9
	<b>% Exactitud</b>	99,13
	<b>Valor Mínimo</b>	8,866147785
	<b>Valor Máximo</b>	10,61016623
	<b>T rechazo al LC 95%</b>	<b>2,18</b>
	<b>T de Rechazo de datos (Valor Mínimo)</b>	1,45
	<b>T de Rechazo de datos (Valor máximo)</b>	0,62
	<b>LCM estimado</b>	10,00

	LCM experimental	10,00
--	------------------	-------

El ajuste del LDM se realizó a partir del cálculo de la desviación estándar obtenida en la confirmación del LCM como se muestra a continuación:

$$\text{LDM} = t_{n-1} * s$$

$$\text{LDM} = 2,82 * 0,54$$

$$\text{LDM} = 2,38$$

### 3.3.4. Intervalo de trabajo - NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Para determinar el intervalo de trabajo del método de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), se analizaron 10 concentraciones independientes de 1,0 mg de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L donde se obtuvieron sus respectivas absorbancias para luego determinar la concentración por medio de la pendiente y el intercepto de la curva de calibración ya evaluada en la tabla 3-25. Obteniendo los siguientes resultados para el intervalo de trabajo un %CV de 0,44 y un % error de 0,04 cumpliendo los criterios del plan de validación (%CV < 15 y % error < 10). Teniendo en cuenta los resultados, se acepta la concentración propuesta para el intervalo de trabajo. (tabla 3-29)

Tabla 3-29: Intervalo de trabajo NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

		
<b>DETERMINACION INTERVALO DE TRABAJO</b>		
<b>Método:</b>	Nitritos (Agua Continental)	<b>Fecha:</b> 14/05/2022
<b>Equipo:</b>	<b>THERMO SPECTRONIC - UV GENESYS 10</b>	<b>Analista:</b> Sergio Tafur
<b>Concentración Nominal (µg N-NO<sub>3</sub>/L):</b>		<b>1000</b>
<b>ITEM</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (µg NO<sub>3</sub>/L)</b>
1	0,584	999,5
2	0,583	997,7

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

3	0,587	1004,7
4	0,588	1006,4
5	0,580	992,5
6	0,583	997,7
7	0,586	1003,0
8	0,581	994,2
9	0,584	999,5
10	0,585	1001,2
	<b>PROMEDIO</b>	<b>1000</b>
	<b>DESVIACIÓN (s)</b>	<b>4,4</b>
	<b>%CV</b>	0,44
	<b>%Error relativo</b>	0,04
	<b>Error absoluto</b>	0,4
	<b>%Exactitud</b>	99,964
	<b>Valor Mínimo</b>	992,5
	<b>Valor Máximo</b>	1006,4
		1,63
	<b>T de Rechazo de datos (Valor Mínimo)</b>	
		1,55
	<b>T de Rechazo de datos (Valor máximo)</b>	
	<b>T rechazo al LC 95%</b>	<b>2,18</b>

### 3.3.5. Verificación del método - NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

La cuantificación del método de Nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) se realizó de acuerdo a lo propuesto en el plan de validación (Anexo 2), para lo cual se utilizó la muestra colectada en San Lorenzo – Sierra Nevada de Santa Marta, probadas por dos (2) analistas en el laboratorio donde se obtienen resultados para ser sometidos a pruebas estadísticas donde se descartar posibles datos atípicos, los resultados de la validación se muestran en la tabla 3-30.

El set de muestras analizado para la validación de amonio en agua continental y marina fue el siguiente:

**Blanco de método- BK:** agua de desionizada con los reactivos del ensayo.

**Eb:** Estándar de concentración baja (10% del intervalo lineal) correspondiente a 30 µg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

**Ea:** Estándar de concentración alta (aproximadamente el 90% del intervalo lineal), correspondiente a 900 µg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

**MR:** Muestra real de agua

**MR+Ab:** Muestra real + adición baja de 300 µg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

**MR+Aa:** Muestra real + adición alta correspondiente a 600 µg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Tabla 3-30: Resultados obtenidos en la cuantificación del set de muestra – NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

 PAGINA 1 DE 1      VALIDACIÓN Y/O VERIFICACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS						
Análisis: Nitratos			Equipo: GENESYS 10 UV – VIS			
Analistas: Sergio Tafur - Daniela Palma			Método: DETERMINACIÓN DE NITRATOS POR COLORIMETRIA.S.M. 4500-NO3- E. REDUCCION DE CADMIO.			
Validación: <input checked="" type="checkbox"/>			Verificación: <input type="checkbox"/>			
DATOS DE CONCENTRACIÓN EN (µg N – NO <sub>3</sub> /L)						
ENSAYO	BCO	E.b (30 µg/L)	E.a (900 µg/L)	MRAc	MRAc + Ab (300 µg/L)	MRAc + Aa (600 µg/L)
	-	30	900	-	300	600
Analista 1	0,00	29,8	901,8	38,5	357,7	657,6
Analista 2	0,00	29,4	901,5	37,2	352,2	648,9
Analista 1	0,00	30,1	899,7	39,1	355,9	651,2
Analista 2	0,00	30,5	900,2	38,9	359,3	665,8
Analista 1	0,00	29,7	901,3	39,5	362,4	659,1
Analista 2	0,00	29,1	899,9	37,8	357,1	654,2

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

Analista 1	0,00	30,4	900,4	38,1	360,6	650,5
Analista 2	0,00	30,2	902,1	39,2	358,2	656,8
<b>Promedio</b>	<b>0,00</b>	<b>29,9</b>	<b>900,9</b>	<b>38,5</b>	<b>357,9</b>	<b>655,5</b>
<b>Desviación estándar (s)</b>	0,00	0,49	0,92	0,79	3,09	5,53
<b>%CV</b>	-	1,64	0,10	2,04	0,86	0,84
<b>Valor Mínimo</b>	-	29,10	899,70	37,20	352,20	648,90
<b>Valor Máximo</b>	-	30,50	902,10	39,50	362,40	665,80
<b>N (Número de datos)</b>	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
<b>T de rechazo de datos (valor mínimo)</b>	-	1,63	1,26	1,70	1,85	1,20
<b>T de rechazo de datos (valor máximo)</b>	-	1,22	1,34	1,22	1,45	1,86
<b>Rango</b>	-	1,40	2,40	-	10,20	16,90
<b>T tabla a 95%</b>	-	2,03	2,03	-	-	-
<b>%Error (relativo)</b>	-	0,33	0,10	-	-	-
<b>Veracidad %</b>	-	99,7	99,9	-	-	-
<b>% Recuperación</b>	-	-	-	-	106,5	102,8

Adicionalmente se establecieron concentraciones para la creación de la carta de control analítico. Para la evaluación de la estabilidad del complejo se analizaron los dos estándares propuestos en el plan de validación (30 y 900  $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{L}$ ) y se graficaron para analizar el comportamiento de los resultados, los cuales se registran en el Anexo 4.

### 3.3.6. Veracidad - $\text{NO}_3^-$ .

La veracidad se evaluó teniendo en cuenta el porcentaje de error y el porcentaje de recuperación para muestras fortificadas. Los resultados de la Tabla 3-31 muestran que la veracidad en función del porcentaje de error estuvo entre 99,7% y 99,9% con un error de 0,10% y 0,33% respectivamente, para los estándares de trabajo, cumpliendo lo estipulado en el instructivo de validación de métodos analíticos del IDEAM (10% < % error). La Veracidad como porcentaje de recuperación para las muestras reales,

se encontró entre 102,8% y 106,5% cumpliendo un porcentaje de recuperación entre el (90<%R<110). Lo cual indica que el ensayo cumplió con los supuestos planteados y con el rango, teniendo en cuenta las posibles interferencias a la hora de realizar el análisis.

Tabla 3-31: Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de validación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Muestra	Promedio	Desviación estándar	%CV	%Error	Veracidad	% R promedio
BCO	0,00	0,00	-	-	-	-
E.B	29,9	0,49	1,64	0,33	99,7	-
E. A	901	0,92	0,10	0,10	99,9	-
MRAc	38,5	0,79	2,04	-	-	-
MRAc + Ab	358	3,1	0,86	-	-	106,5
MRAc + Aa	656	5,5	0,84	-	-	102,8

### 3.3.7. Precisión - NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

#### 3.3.7.1. Repetibilidad - NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

La precisión fue evaluada bajo condiciones de repetibilidad mediante el Coeficiente de variación. Para esto se analizaron los datos obtenidos de la matriz fortificada, cada uno de los analistas realizó la adición de una concentración baja de un estándar conocido a la muestra real del método de nitrato NO<sub>3</sub><sup>-</sup> obteniendo un coeficiente de variación reportado para cada analista de 0,8% y 0,9% lo cual indica el cumplimiento o la precisión en condiciones de repetibilidad con el criterio planteado (CV<15%) tabla (Tabla 3-32).

Tabla 3-32: Resultados de la repetibilidad -  $\text{NO}_3^-$ .

Precisión en términos de Repetibilidad y precisión intermedia		
Agua continental (MRAc + Ab)		
No Datos	ANALISTA 1	ANALISTA 2
1	357,7	352,2
2	355,9	359,3
3	362,4	357,1
4	360,6	358,2
<b>Promedio</b>	<b>359,2</b>	<b>356,7</b>
<b>S</b>	<b>2,9</b>	<b>3,1</b>
<b>%CV</b>	<b>0,8</b>	<b>0,9</b>

**MRAc + Ab** = Muestra Real Agua continental y marina (San Lorenzo – Sierra Nevada de Santa Marta) + adición baja (300  $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{L}$ )

### 3.3.8. Estimación de la incertidumbre del método - $\text{NO}_3^-$ .

Para la identificación de las fuentes de incertidumbre en la cuantificación de Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), se muestran los resultados de las contribuciones de cada variable asociada al análisis encontrando las siguientes incertidumbres descritas en la tabla 3-33.

Tabla 3-33: Fuentes de incertidumbre para la determinación Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) en agua Continental y Marina.

Fuentes de incertidumbre	ID Equipo	Incertidumbre Certificado de Calibración	Resolución del Equipo	Incertidumbre de Calibración K=2	Incertidumbre de Instrumento Rectangular res/raíz (3)
<b>INCERTIDUMBRE DEL EQUIPO</b>					
Espectrofotómetro	ESP-02546	0,5	0,001	0,250000	0,00029 <b>0,25000</b>
<b>MEDIDAS VOLUMETRICAS</b>					
Transferpipeta (100-1000 $\mu\text{L}$ )	Tranf-CA	0,06	0,04	0,052	0,01155
Matraz volumétrico (100 mL)	CA-UM	0,01		0,010	

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

			<b>0,01305</b>
<b>SOLUCION ESTANDAR</b>			
Solución MERCK Nitratos 1000mg/L	<b>1,0</b>	<b>0,500000</b>	<b>0,50000</b>
<b>DEBIDO A LA REPETIBILIDAD</b>			
	<b>No. de Datos</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Incertidumbre de Repetición</b>
Estándar bajo	8	0,5	0,2
Estándar alto	8	0,9	0,3
			<b>0,36885</b>
<b>Incertidumbre Total</b>			<b>0,7</b>
<b>Incertidumbre Expandida</b>			<b>1,3</b>

### 3.3.9. Declaración de aptitud del método - NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

El método de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), basado en el Standard methods, edición 23 del 2017, S.M. 4500-NO3- E. Y en lo estipulado por Strickland J.D.H. y Parsons T.R. 1972. A PRACTICAL HANDBOOK OF SEAWATER ANALYSIS, BULLETIN 167 (Second Edition). Es válido para su aplicación en el Laboratorios de calidad de aguas de la Universidad Del Magdalena siguiendo el procedimiento analítico descrito en el Manual de análisis con las siguientes siglas **PR – LABCA – UM – NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**

**PR**= Procedimiento

**LABCA**= Laboratorio Calidad de Agua

**UM**= Universidad Del Magdalena

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**= Nitratos

### 3.4. Validación de Fosforo Reactivo (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>).

Para dar cumplir con el objetivo de la validación del método analítico para la determinación de fósforo reactivo (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) se calcularon los atributos de calidad

descritos en la tabla 2-9, los resultados de cada uno de los atributos se registran en tabla 3-34 a la 3-44.

### 3.4.1. Intervalo Lineal ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).

Para el análisis de fósforo en la matriz agua superficial continental y marina fue necesario preparar un estándar secundario de  $10.000 \mu\text{g/L PO}_4^{3-}$  a partir de un estándar primario certificado de  $1000 \text{ mg/L PO}_4^{3-}$  del cual se tomó un volumen de 1 ml y se aforó en matraz a volumen de 100 ml con agua desionizada, a partir de este estándar secundario, se realizaron diferentes concentraciones de 30, 100, 300, 500, 1000 y  $1300 \mu\text{g P-PO}_4^{3-}/\text{L}$ , de estas concentraciones se elaboraron y se evaluaron tres curvas de calibración en días diferentes; una vez elaborada las curvas se verificó la linealidad por medio del coeficiente de correlación; finalmente se graficaron los resultados de las absorbancias de cada una de las concentraciones referenciadas: para dicho gráfico se tuvo en cuenta las absorbancias (Y) Vs La concentración (X) de cada uno de los patrones secundarios con lo cual se obtuvo diagrama de dispersión como se describe en la tabla (3-34, 3-35 y figura 3-10).

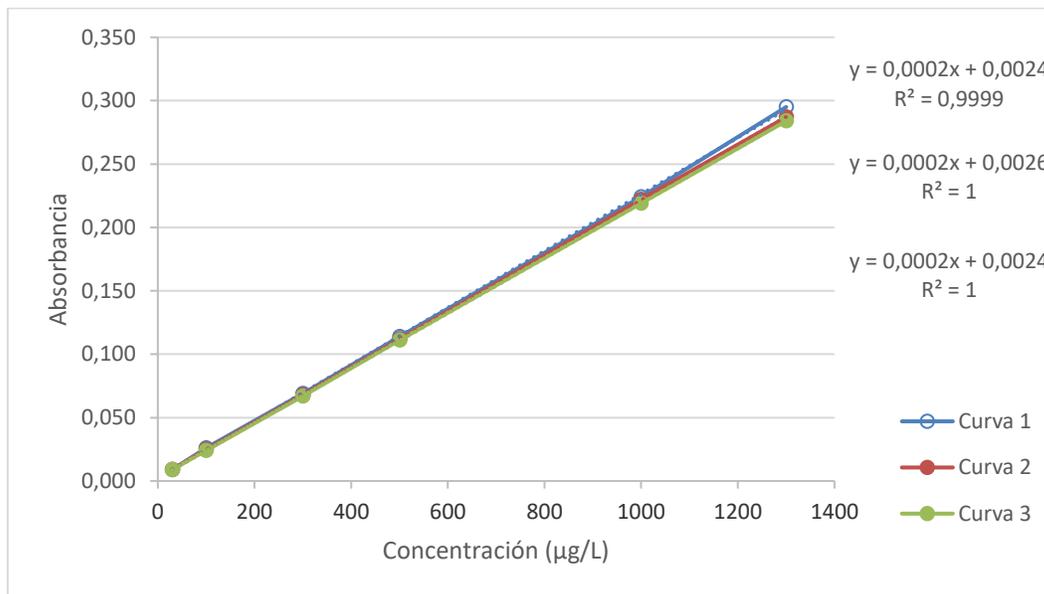
Tabla 3-34: Preparación de la curva de fósforo reactivo  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Volumen ( $\mu\text{L}$ ) tomado de patrón secundario $10 \text{ mg P-PO}_4^{3-}/\text{L}$	Concentración ( $\mu\text{g P-PO}_4^{3-}/\text{L}$ )	Volumen final (mL)
300	30	100
1 mL	100	100
3 mL	300	100
5 mL	500	100
10 mL	1000	100
13 mL	1300	100

Tabla 3-35: Datos obtenidos para las curvas de calibración  $\text{PO}_4^{3-}$ .

<b><math>\text{PO}_4^{3-}</math></b>					
<b>Thermo UV - GENESYS 10</b>					
Puntos	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Absorbancia			PROMEDIO
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	
STD 1	30	0,009	0,009	0,009	0,009
STD 2	100	0,026	0,025	0,024	0,025
STD 3	300	0,069	0,068	0,067	0,068
STD 4	500	0,114	0,112	0,111	0,112
STD 5	1000	0,224	0,222	0,219	0,222
STD 6	1300	0,295	0,287	0,284	0,289
<b>Pendiente (m)</b>		0,000224	0,000219	0,000217	0,000220
<b>Intercepto (b)</b>		0,0024	0,0026	0,0024	0,00247
<b>Coef. Correlación</b>		0,9999	1,0000	1,0000	0,9999

Figura 3-4: Curvas de calibración para  $\text{PO}_4^{3-}$ .



Se evaluaron las tres curvas de calibración de acuerdo a los criterios establecidos en el Standard Methods y bajo las condiciones de operación del laboratorio de Calidad de Agua de la Universidad del Magdalena. Se evidenció que cada una de las determinaciones realizadas para las curvas de calibración cumplieron con los criterios de linealidad visual y el coeficiente de correlación  $R \geq 0,995$ ; lo cual según Lahura (2003).

considera que un coeficiente de correlación muy cercano a 1 indica que la relación entre las variables es muy fuerte, mientras que, si es muy cercano a cero, indica que la relación es muy débil. Los coeficientes de correlación  $R^2$  calculados arrojaron valores de (0,9999), (1) y (1) respectivamente, indicando que hay una fuerte relación estadística entre la concentración de fósforo reactivo y la absorbancia. Por lo tanto, la validez de las curvas para el análisis de fósforo reactivo ( $PO_4^{3-}$ ) en agua continental y marina, son confiables y se aceptan para su aplicación en el laboratorio.

### 3.4.1.1. Datos de la curva de calibración - $PO_4^{3-}$ .

De las anteriores tres curvas de calibración, se promediaron los resultados de las absorbancias, los interceptos, las pendientes y los coeficientes de correlación por cada una de las concentraciones mencionadas como se muestra en la tabla 3-35. Con los promedios obtenidos por cada uno de los parámetros (absorbancias, interceptos, pendientes y coeficientes de correlación) se sometieron nuevamente al proceso de verificación para constatar el cumplimiento de los criterios de aceptación como se indicó en el apartado 3.4.1 intervalo lineal ( $PO_4^{3-}$ ). Para la evaluación se siguieron los criterios descritos en el Standard methods edición 23, sección 4020 B, donde se evaluó el porcentaje de error el cual es obtenido por medio de la fórmula como lo indica el apartado 1.5.7 veracidad; los resultados de dicha evaluación se tabularon, indicando el cumplimiento de los criterios descrito en la Tabla 3-36.

Tabla 3-36: Recalculo de los estándares utilizando los valores promedio de las curvas de calibración evaluadas para  $PO_4^{3-}$  agua Continental y marina y evaluación del porcentaje de error calculado.

Puntos	Concentración (mg/L)	Absorbancia Promedio	Concentración real	% error	Criterio de aceptación SM 4020B	Cumple
			( $\mu\text{g/L}$ )		% error	
STD 1	30	0,009	29,72	0,94	$\leq 50$	Si
STD 2	100	0,025	102,52	2,52	$\leq 20$	Si
STD 3	300	0,068	298,18	0,61	$\leq 20$	Si
STD 4	500	0,112	499,91	0,02	$\leq 20$	Si
STD 5	1000	0,222	997,40	0,26	$\leq 20$	Si

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

STD 6	1300	0,289	1302,27	0,17	≤ 10	Si
<b>Pendiente (m)</b>		0,00022				
<b>Intercepto (b)</b>		0,0025				
<b>Coef. Correlación</b>		0,9999				

### 3.4.2. Sensibilidad - PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

La sensibilidad se calculó utilizando las pendientes de las tres curvas de calibración, según el análisis realizado, la señal de respuesta arrojó un valor de 0,000220 por 1 µg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L (Tabla 3-37).

Tabla 3-37: Sensibilidad en la curva para la cuantificación de fósforo reactivo (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) en agua Continental y marina.

	<b>Pendientes</b>	<b>Sensibilidad (Absorbancia*µg/L)</b>
Curva 1	0,000224	0,000220
Curva 2	0,000219	
Curva 3	0,000217	

### 3.4.3. Estimación del límite de detección del método (LDM) y límite de cuantificación del método (LCM) - PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

El límite de detección del método experimental para la determinación de fósforo reactivo se estimó cuantificando 10 blancos de reactivos (muestra ausente del analito en estudio) cuyos resultados se muestran en la tabla 3-38. posteriormente se aplicó la siguiente fórmula para estimar  $LDM = t(n-1) * s$ , descrito en el apartado 2.5.3, obteniendo como resultado un LDM de 0,0 µg P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L (Tabla 3-38).

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

Tabla 3-38: Datos obtenidos en el cálculo del límite de detección del método  $\text{PO}_4^{3-}$ .

		
<b>DETERMINACIÓN LDM</b>		
<b>Método:</b>	<b>Fosforo Reactivo (Agua Continental)</b>	<b>Fecha:</b> 19/04/2022
<b>Equipo:</b>	<b>THERMO SPECTRONIC - UV GENESYS 10</b>	<b>Analista:</b> Sergio Tafur
<b>ITEM</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (<math>\mu\text{g P- PO}_4^{3-}/\text{L}</math>)</b>
1	0,002	-11,2
2	0,002	-11,2
3	0,002	-11,2
4	0,002	-11,2
5	0,002	-11,2
6	0,002	-11,2
7	0,002	-11,2
8	0,002	-11,2
9	0,002	-11,2
10	0,002	-11,2
	<b>PROMEDIO</b>	-11,2311475
	<b>DESVIACIÓN (s)</b>	0,000
	<b>%CV</b>	0
	<b>Valor Mínimo</b>	-11,2311775
	<b>Valor Máximo</b>	-11,2310775
	<b>T rechazo al LC 95%</b>	2,18
	<b>T de Rechazo de datos (Valor Mínimo)</b>	0,62
	<b>T de Rechazo de datos (Valor máximo)</b>	1,45
	<b>Valor crítico 99% n-1</b>	2,82
	<b>LDM</b>	0,0

Para el caso del LCM se calculó a partir de la primera concentración de la curva de calibración de fósforo reactivo, el cual corresponde a  $30 \mu\text{g P-PO}_4^{3-}/\text{L}$ . Posteriormente

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

se realizaron 10 mediciones independientes de la absorbancia a partir de disoluciones de  $30 \mu\text{g P-PO}_4^{3-}/\text{L}$  con el fin de evaluar los criterios de aceptación  $\% \text{CV} < 15\%$  (datos homogéneos) y porcentaje de error  $< 50\%$ . (diferencia que existe entre el valor estimado y el valor real) estos datos se obtuvieron mediante el cálculo a partir de las fórmulas descritas en el ítem 1.5.5 límite de cuantificación.

El resultado del análisis arrojó que el LCM registró un CV de 0,79 % indicando que los datos son homogéneos, con un % error relativo de 0,33% cumpliendo  $< 50\%$ . (Tabla 3-39).

Tabla 3-39: Datos obtenidos en la determinación del límite de cuantificación del método  $\text{PO}_4^{3-}$

		
<b>DETERMINACIÓN LCM</b>		
<b>Método:</b>	<b>Fosforo Reactivo (Agua Continental)</b>	<b>Fecha:</b> 21/04/2022
<b>Equipo:</b>	<b>THERMO SPECTRONIC - UV GENESYS 10</b>	<b>Analista:</b> Sergio Tafur
<b>Concentración Nominal (<math>\mu\text{g P-PO}_4^{3-}/\text{L}</math>):</b>		<b>30,00</b>
<b>ITEM</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (<math>\mu\text{g P-PO}_4^{3-}/\text{L}</math>)</b>
1	0,009	30,17
2	0,009	29,72
3	0,009	30,17
4	0,009	29,72
5	0,009	29,72
6	0,009	29,72
7	0,009	30,17
8	0,009	29,72
9	0,009	29,72
10	0,009	30,17
<b>PROMEDIO</b>		<b>29,90</b>
<b>DESVIACIÓN (s)</b>		<b>0,2</b>

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

%CV	0,79
Error absoluto	0,10
% Error relativo	0,33
% Exactitud	99,67
Valor Mínimo	29,7188808
Valor Máximo	30,17390367
T rechazo al LC 95%	2,18
T de Rechazo de datos (Valor Mínimo)	0,77
T de Rechazo de datos (Valor máximo)	1,16
LCM estimado	30,00
LCM experimental	30,00

El ajuste del LDM se realizó a partir del cálculo de la desviación estándar obtenida en la confirmación del LCM como se muestra a continuación:

$$\text{LDM} = t_{n-1} * s$$

$$\text{LDM} = 2,82 * 0,2$$

$$\text{LDM} = 0,66$$

Este resultado de LDM es el que se utiliza o se registra como límite de detección en la prueba y/o reportes de resultados en fósforo reactivo ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) de cualquier muestra de agua que se analice.

#### 3.4.4. Intervalo de trabajo - $\text{PO}_4^{3-}$ .

Para determinar el intervalo de trabajo del método de fósforo reactivo ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), se analizaron 10 concentraciones independientes de 2,0 mg de P- $\text{PO}_4^{3-}$ /L donde se obtuvieron sus respectivas absorbancias para luego determinar la concentración por medio de la pendiente y el intercepto de la curva de calibración ya evaluada en la tabla 3-36. Obteniendo los siguientes resultados para el intervalo de trabajo un %CV de 0,22 y un % error de 0,91 cumpliendo los criterios del plan de validación (%CV < 15 y % error < 10). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y se acepta la concentración propuesta para el intervalo de trabajo. (tabla 3-40)

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

Tabla 3-40: Intervalo de trabajo  $\text{PO}_4^{3-}$ .

		
<b>DETERMINACION INTERVALO DE TRABAJO</b>		
<b>Método:</b>	Fosforo Reactivo (Agua Continental)	<b>Fecha:</b> 22/04/2022
<b>Equipo:</b>	THERMO SPECTRONIC - UV GENESYS 10	<b>Analista:</b> Sergio Tafur
<b>Concentración Nominal (<math>\mu\text{g P- PO}_4^{3-}/\text{L}</math>):</b>		<b>2000</b>
<b>ITEM</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (<math>\mu\text{g P- PO}_4^{3-}/\text{L}</math>)</b>
1	0,437	1977,2
2	0,439	1986,3
3	0,438	1981,8
4	0,437	1977,2
5	0,439	1986,3
6	0,437	1977,2
7	0,439	1986,3
8	0,438	1981,8
9	0,437	1977,2
10	0,439	1986,3
	<b>PROMEDIO</b>	<b>1982</b>
	<b>DESVIACIÓN (s)</b>	<b>4,3</b>
	<b>%CV</b>	0,22
	<b>%Error relativo</b>	0,91
	<b>Error absoluto</b>	18,233
	<b>%Exactitud</b>	99,088
	<b>Valor Mínimo</b>	1977,2
	<b>Valor Máximo</b>	1986,3
	<b>T de Rechazo de datos (Valor Mínimo)</b>	1,06
	<b>T de Rechazo de datos (Valor máximo)</b>	1,06
	<b>T rechazo al LC 95%</b>	2,18

### 3.4.5. Verificación del método - PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

La cuantificación del método de fósforo reactivo (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) se realizó de acuerdo a lo propuesto en el plan de validación (Anexo 2), para lo cual se utilizó la muestra colectada en el río Aracataca – Aracataca Magdalena, probadas por dos (2) analistas en el laboratorio donde se obtuvieron resultados para ser sometidos a pruebas estadísticas donde se descartan datos atípicos, los resultados de la validación se muestran en la tabla 3-41.

El set de muestras analizado para la validación de fósforo reactivo en agua continental y marina fue el siguiente:

**Blanco de método- BK:** agua de desionizada con los reactivos del ensayo.

**Eb:** Estándar de concentración baja (15% del intervalo lineal) correspondiente a 130 µg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L

**Ea:** Estándar de concentración alta (aproximadamente el 90% del intervalo lineal), correspondiente a 1200 µg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L.

**MR:** Muestra real de agua

**MR+Ab:** Muestra real + adición baja de 400 µg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L.

**MR+Aa:** Muestra real + adición alta correspondiente a 800 µg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L.

Tabla 3-41: Resultados obtenidos en la cuantificación del set de muestra - PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

	
PAGINA 1 DE 1	VALIDACIÓN Y/O VERIFICACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS
<b>Análisis:</b> Fosforo reactivo	<b>Equipo:</b> GENESYS 10 UV – VIS
<b>Analistas:</b> Sergio Tafur - Daniela Palma	<b>Método:</b> DETERMINACIÓN DE FOSFORO REACTIVO POR COLORIMETRIA, MÉTODO DEL

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

ÁCIDO  
ASCÓRBICO.S.M.45  
00-P- E.

Validación:   X   Verificación:                   

**DATOS DE CONCENTRACIÓN EN (µg N/L)**

ENSAYO	BCO	E.b (130 µg/L)	E.a (1200 µg/L)	MRAc	MRAc + Ab (400 µg/L)	MRAc + Aa (800 µg/L)
	-	<b>130</b>	<b>1200</b>		<b>400</b>	<b>800</b>
Analista 1	0,00	130,3	1203,7	84,3	484,7	907,9
Analista 2	0,00	130,2	1204,2	83,7	480,4	902,6
Analista 1	0,00	129,8	1202,2	93,4	489,3	903,4
Analista 2	0,00	129,6	1201,1	82,5	481,7	901,3
Analista 1	0,00	130,7	1199,1	88,9	493,8	912,5
Analista 2	0,00	130,9	1200,6	85,1	486,1	910,8
Analista 1	0,00	129,9	1199,6	85,2	486,5	909,2
Analista 2	0,00	129,2	1199,8	83,1	488,3	904,5
<b>Promedio</b>	<b>0,00</b>	<b>130,1</b>	<b>1201,3</b>	<b>85,8</b>	<b>486,4</b>	<b>906,5</b>
<b>Desviación estándar (s)</b>	0,00	0,57	1,90	3,65	4,28	4,13
<b>%CV</b>	-	0,44	0,16	4,25	0,88	0,46
<b>Valor Mínimo</b>	-	129,20	1199,13	82,50	480,40	901,30
<b>Valor Máximo</b>	-	130,90	1204,20	93,42	493,84	912,46
<b>N (Número de datos)</b>	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
<b>T de rechazo de datos (valor mínimo)</b>	-	1,54	1,14	0,90	1,39	1,26
<b>T de rechazo de datos (valor máximo)</b>	-	1,45	1,53	2,10	1,75	1,44
<b>Rango</b>	-	1,70	5,07	-	13,44	11,16
<b>T tabla a 95%</b>	-	2,03	2,03	-	-	-
<b>%Error (relativo)</b>	-	0,06	0,11	-	-	-
<b>Veracidad %</b>	-	99,9	99,9	-	-	-
<b>% Recuperación</b>	-	-	-	-	100,1	102,6

Adicionalmente se establecieron concentraciones para la creación de la carta de control analítico. Para la evaluación de la estabilidad del complejo se analizaron los dos estándares propuestos en el plan de validación (130 y 1200  $\mu\text{g PO}_4^{3-}/\text{L}$ ). luego se graficaron con la finalidad de analizar el comportamiento de los resultados los cuales se registraron en el Anexo 4.

### 3.4.6. Veracidad - $\text{PO}_4^{3-}$ .

La veracidad se evaluó teniendo en cuenta el porcentaje de error y el porcentaje de recuperación para muestras fortificadas. Los resultados de la Tabla 3-42 muestran que la veracidad en función del porcentaje de error estuvo en 99,9% en ambos estándares con un error de 0,06% y 0,11% respectivamente, para los estándares de trabajo, cumpliendo con lo estipulado en el instructivo de validación de métodos analíticos del IDEAM ( $10\% < \% \text{ error}$ ). La Veracidad como porcentaje de recuperación para las muestras reales, se encontró entre 101,1% y 102,6% cumpliendo con los porcentajes de recuperación entre el ( $90 < \% R < 110$ ). indicando que el ensayo cumplió dentro del rango teniendo en cuenta las posibles interferencias a la hora de realizar el análisis de fósforo reactivo.

Tabla 3-42: Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de validación  $\text{PO}_4$

Muestra	Promedio	Desviación estándar	%CV	%Error	Veracidad	% R promedio
BCO	0,00	0,00	-	-	-	-
E.B	130,1	0,57	0,44	0,06	99,9	-
E.A	1201	1,90	0,16	0,11	99,9	-
MRAc	85,8	3,65	4,25	-	-	-
MRAc + Ab	486	4,3	0,88	-	-	100,1
MRAc + Aa	907	4,1	0,46	-	-	102,6

### 3.4.7. Precisión - $\text{PO}_4^{3-}$ .

#### 3.4.7.1. Repetibilidad - $\text{PO}_4^{3-}$ .

La precisión fue evaluada bajo condiciones de repetibilidad mediante el Coeficiente de variación. Para esto se analizaron los datos obtenidos de la matriz fortificada, cada

uno de los analistas realizo la adición de una concentración baja de un estándar conocido a la muestra real del método de fósforo reactivo  $\text{PO}_4^{3-}$  obteniendo un coeficiente de variación reportado para cada analista de 0,76% y 0,81% lo cual indica el cumplimiento o la precisión en condiciones de repetibilidad con el criterio planteado ( $\text{CV} < 15\%$ ). Ver Tabla 3-43.

Tabla 3-43: resultados de la Repetibilidad -  $\text{PO}_4^{3-}$ .

<b>Precisión en términos de Repetibilidad y precisión intermedia</b>		
<b>Agua continental (MRAc + Ab)</b>		
<b>No Datos</b>	<b>ANALISTA 1</b>	<b>ANALISTA 2</b>
1	484,7	480,4
2	489,3	481,7
3	493,8	486,1
4	486,5	488,3
<b>Promedio</b>	<b>488,6</b>	<b>484,1</b>
<b>S</b>	<b>4,0</b>	<b>3,7</b>
<b>%CV</b>	<b>0,81</b>	<b>0,76</b>

**MRAc + Ab** = Muestra Real Agua superficial continental y marina (Río Aracataca – Aracataca Magdalena) + adición baja ( $400 \mu\text{g P-PO}_4^{3-}/\text{L}$ )

### 3.4.8. Estimación de la incertidumbre del método - $\text{PO}_4^{3-}$ .

Para la identificación de las fuentes de incertidumbre en la cuantificación de Fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), se muestran los resultados de las contribuciones de cada variable asociada al análisis encontrando las siguientes incertidumbres descritas en la tabla 3-44.

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

Tabla 3- 44:Fuentes de incertidumbre para la determinación de fosforo reactivo ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en agua Continental y marina.

Fuentes de incertidumbre	ID Equipo	Incertidumbre Certificado de Calibración	Resolución del Equipo	Incertidumbre de Calibración K=2	Incertidumbre de Instrumento Rectangular res/raíz (3)
<b>INCERTIDUMBRE DEL EQUIPO</b>					
Espectrofotómetro	ESP-02546	0,5	0,001	0,250000	0,00029 <b>0,25000</b>
<b>MEDIDAS VOLUMETRICAS</b>					
Transferpipeta (100-1000uL)	Tranf-CA	0,06	0,04	0,052	0,01155
Matraz volumétrico (100 mL)	CA-UM	0,01		0,010	
					<b>0,01305</b>
<b>SOLUCION ESTANDAR</b>					
Solución MERCK Fosfato PO4 1000mg/L		<b>0,4</b>		<b>0,200000</b>	<b>0,20000</b>
<b>DEBIDO A LA REPETIBILIDAD</b>					
	No. de Datos	Desviación Estándar		Incertidumbre de Repetición	
Estándar bajo	8	0,6		0,2	
Estándar alto	8	1,9		0,7	
					<b>0,70257</b>
				<b>Incertidumbre Total</b>	<b>0,8</b>
				<b>Incertidumbre Expandida</b>	<b>1,5</b>

### 3.4.9. Declaración de aptitud del método - $\text{PO}_4^{3-}$ .

El método de Fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), basado en el Standard methods, edición 23 del 2017, S.M.4500-P- E. Ascorbic Acid Method. Y en lo estipulado por Strickland J.D.H. y Parsons T.R. 1972. A PRACTICAL HANDBOOK OF SEAWATER ANALYSIS, BULLETIN 167 (Second Edition). Es válido para su aplicación en el Laboratorios de calidad de aguas de la Universidad Del Magdalena siguiendo el procedimiento

analítico descrito en el Manual de análisis con las siguientes siglas **PR – LABCA – UM – PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>**

**PR**= Procedimiento

**LABCA**= Laboratorio Calidad de Agua

**UM**= Universidad Del Magdalena

**PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>**= Fosforo reactivo - Fosfato

### **3.5. Diseño del Manual de procedimientos.**

Finalmente, para cumplir con el objetivo específico 4 se redactó un manual de procedimientos interno tomando como referencia la información de los resultados experimental obtenidos de la validación de los métodos (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), estos procedimientos son basados en métodos normalizados tomando como referencia el Estándar Método en su edición 23 y lo descrito en el libro de Strickland y Parsons. El presente manual contempla las reglas y pautas de cómo deben ejecutarse los procedimientos teniendo en cuenta los siguientes elementos:

- ✓ Objetivo
- ✓ Alcance y aplicación
- ✓ Fundamento del método
- ✓ Interferencias
- ✓ Toma, preservación y almacenamiento de la muestra
- ✓ Materiales y equipos
- ✓ Reactivos
- ✓ Preparación de patrones (estándares certificados)
- ✓ Curvas de calibración
- ✓ Procedimiento para análisis
- ✓ Cálculos
- ✓ Controles de Calidad

- ✓ Manejo de residuos
- ✓ Referencia Bibliográfica

El presente manual, quedará disponible a verificación y cambios, este será una guía para la implementación del sistema de gestión de calidad que se vaya a realizar en el laboratorio de Calidad de Aguas de la universidad del Magdalena.

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1. Conclusiones

Pese que las condiciones ambientales del laboratorio (Temperatura y humedad relativa), no están controladas que permitan emitir resultados bajo parametrizaciones internacionales bajo distintas técnicas o métodos de ensayo; los resultados obtenidos en las diferentes pruebas de validación son satisfactorios, confiables, al cumplir con las figuras de mérito más importantes.

Se logro validar los métodos de ensayo para la determinación de Amonio, Nitritos, Nitratos y Fósforo reactivo (Fosfato) en aguas continentales y marinas en el laboratorio de Calidad de Aguas de la Universidad del Magdalena., bajo una metodología específica para cada uno de los parámetros de uso interno del laboratorio: Amonio mediante el Standard Method 4500 – NH<sub>3</sub> – F método de Fenato, Nitritos por el Standard Method 4500 – NO<sub>2</sub> – B método colorimétrico, Nitratos por el Standard Method 4500 – NO<sub>3</sub> – E método de reducción de cadmio y Fosfato por el Standard Method 4500 – PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> – E método del ácido ascórbico.

Se establecieron las características de desempeño y criterios de aceptabilidad de acuerdo al Standard Method y a la norma ISO 17025/2017, que incluyen intervalo de trabajo, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, repetibilidad y veracidad; se definió un comportamiento lineal adecuado mediante el coeficiente de determinación R<sup>2</sup>, y se determinó la respectiva incertidumbre para cada método.

Se elaboró los procedimientos de uso interno para el laboratorio de Calidad de Aguas de la Universidad del Magdalena., de los métodos Amonio, Nitritos, Nitratos y Fosfato en aguas continentales y marinas, especificando de manera puntual el objetivo, alcance, descripción del método, uso y detalle de las condiciones

ambientales del equipo utilizado, descripción del método, calibraciones internas y/o externas, preparación de reactivos y curvas de calibración de cada método.

Se confirma la validez de los métodos de ensayo: Amonio, Nitritos, Nitratos y Fosfato debido a que los resultados de repetibilidad son menores al objetivo planteado  $CV \leq 15\%$ , veracidad con un porcentaje de recuperación entre 90% y 110%, una adecuada correlación entre los datos mediante un coeficiente de determinación  $\geq 0,995$  y una estimación de la incertidumbre  $\leq 15\%$

#### **4.2. Recomendaciones**

Organizar capacitaciones periódicas hacia el personal del laboratorio y estudiantes de grado con respecto al uso de reactivos, equipos y material potencialmente peligroso.

Mantener controladas las condiciones ambientales de cada método de ensayo dentro del laboratorio para evitar interferencias que puedan afectar los resultados de los análisis.

Utilizar material volumétrico para cada parámetro, para evitar alguna contaminación de un método con otro analito, con ello se favorecerá la confiabilidad de los resultados.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Ardila Osorio, V., & Castaño Moreno, E. (2015). Diseño de la documentación primaria del sistema de gestión de calidad basado en la norma NTC/ISO/IEC 17025: 2005 para el laboratorio de microbiología de la Universidad Libre Seccional Pereira.
- Azcarate, M. P., Kloster, N. S., Ostinelli, M., & Carreira, D. (2011). GUIA PARA LA VERIFICACION DE ESPECTOFOTOMETROS UV-VISIBLE UTILIZADOS EN EL ANALISIS DE SUELO Y AGUA. In *VI Iberolab. Congreso virtual Iberoamericano*.
- Bejarano Rivera, J. M., & López Ochoa, D. R. (2019). Propuesta de un modelo de gestión para la prestación del servicio de los laboratorios de ingeniería bioquímica de la Universidad Icesi basado en la Norma ISO 9001: 2015 e ISO 17025: 2017.
- Benítez-Fernández, D., Vilasó-Cadre, J. E., Arada-Pérez, M. D. L. Á., Arce-Castro, J., & Rodríguez-de la Rosa, H. (2021). Método voltamperométrico para el análisis de cadmio en aguas residuales. *Revista Cubana de Química*, 33(3), 415-436.
- Blanco, D. (2012). *Validación de los Métodos de Análisis DQO Reflujo Cerrado, Sulfatos y Nitratos en Aguas*, en el Laboratorio de Análisis Químico de Aguas Residuales de la Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Cundinamarca (Doctoral dissertation, tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia).
- Camargo, J. A., & Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas*, 16(2).
- Chambers, P. (2019). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Scientific e-Resources.
- Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., ... & Fiñana, I. T. (2010). Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Universidad de Córdoba*, 1-8.
- Eugene, W. R., Rodger, B. B., & Andrew, D. E., (2017). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association, American Water Works Association, Water environment federation, 23rd edn Washington DC, USA Google scholar*.
- Garay Tinoco, J. A., Pinilla González, C. A., & Díaz Merlano, J. M. (2003). Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos (aguas, sedimentos y organismos).
- Gómez Salazar, M. C. (2019). Validación del método del ácido ascórbico para la determinación de fósforo total y ortofosfato en agua potable, natural y residual en el licam sena-ccit.
- Hernández, M. M. P. (2012). Estimación de incertidumbres. Guía GUM. *Revista Española de Metrología*, 1(3), 113-130.
- Jurado, J. M. (2008). Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos. *Sevilla: Universidad de Sevilla-Departamento de Química Analítica*.

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
LABORATORIO DE CALIDAD DE AGUA DE LA UNIVERSIDAD DEL  
MAGDALENA.

---

- Lahura, E. (2003). *El coeficiente de correlación y correlaciones espúreas* (Vol. 218). Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Economía.
- Monti, M. S. (2021). Amonio en agua.
- Moreta Pozo, J. C. (2011). *La eutrofización de los lagos y sus consecuencias. Ibarra 2008* (Bachelor's thesis).
- Ospina Botero, D. (2001). *Introducción al muestreo* (No. 519.52 Os6i Ej. 1). UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
- Pabón, J. D., & Chaparro, R. (1998). *Colombia en el ambiente global* (No. PDF 251)).
- Pacheco Villegas, E. J., & Torres Julio, M. B. (2020). Validación de un método analítico para la determinación de hierro (Fe) total y manganeso (Mn) en agua potable, natural y residual por espectroscopía de absorción atómica.
- Pacheco Conde, J. I., & Ramos, O. E. *Validación del método espectrofotométrico UV-VIS para la determinación de amonio en aguas naturales* (Doctoral dissertation).
- Pardo Sanabria, L. J. (2020). Validación del método analítico 3111b-sm para la determinación de cobalto en agua natural, residual y potable por espectroscopía de absorción atómica.
- Pérez Hernández, M<sup>a</sup> Mar. (2012). *Estimación de incertidumbres. Guía GUM*.
- Pérez, C., León, F., & Delgadillo, G. (2013). Tratamiento de aguas Manual de laboratorio. *Tratamiento De Aguas Manual De Laboratorio*, 71-75.
- Primost, J. E. (2019). *Dinámica de nutrientes en aguas superficiales del Delta del Paraná* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Richter, P. (2017). Validación de métodos analíticos. *Presentación, Santiago de Chile*.
- Romero, J. (2009). *Calidad del agua*, [3a. ed.]. Bogotá, Colombia: Escuela Colombiana de Ingeniería.
- Sandoval, S. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos".
- Severiche-Sierra, H., & González-García. (2012). Determinación de fosfatos en aguas por método colorimétrico. Validación del método. *Química Hoy. Chemistry Sciences*.
- Sierra, C. A., Jara, J. Y. L., & García, H. G. (2013). Evaluación analítica para la determinación de fósforo total en aguas por el método del ácido ascórbico.
- Sierra, C. S., & Garcia, H. G. (2012). Determinación de Fosfatos en Aguas por Método Colorimétrico. Validación del Método. *Química Hoy*, 2(3), 28-32.
- Socarras, J., & Pretelt, F. M. (2020). Validación del Método Analítico para la Determinación de Nitritos en Agua Natural y Potable, por Espectrofotometría Visible en El Laboratorio de Investigación y Calidad Ambiental del Centro de Comercio, Industria y Turismo del Sena, Regional [Universidad de Córdoba]. *Regional Córdoba. Obtenido de <https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/3041/Pretelt, 2>*.

Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis.

VELAZCO ARMENDÁRIZ, G. L. A. D. Y. S. (2017). Monitoreo  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  para identificar la interacción del agua nativa y el agua superficial en la porción sur donde se localiza la planta de tratamiento de aguas residuales de Chihuahua, México (doctoral Dissertation, universidad Autonoma de Chihuahua).

Velasco Monar, D. M. (2021). Validación de métodos para determinar temperatura, cromo hexavalente, nitrógeno total, amonio, fósforo total, arsénico, selenio, estaño, mercurio en aguas-suelos (Bachelor's thesis, Quito: UCE).

## **ANEXOS**

Los anexos se encuentran dispuestos en una carpeta la cual se dividen en subcarpetas con las siguientes descripciones:

**Anexo 1. Procedimientos de los métodos de ensayo**

**Anexo 2. Planes de validaciones**

**Anexo 3. Informes de validaciones**

**Anexo 4. Cartas Controles de los métodos de ensayo**

**Anexo 5. Formatos de captura de datos de los métodos de ensayo**

**Anexo 6. Instructivos**

**Anexo 7. Verificación del material volumétrico (IN, EX)**

**Anexo 8. Diagnóstico del Laboratorio**