Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el (la) autor(a) ha autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que "los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables."

Biblioteca - Bucaramanga
Universidad Santo Tomás

VALIDACIÓN DE METODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACION DE NITRATOS, NITRITOS, ORTOFOSFATOS Y NITROGENO AMONIACAL EN AGUAS, EN EL LABORATORIO DE SIAMA LTDA.

MARIAN MOREINYS ALMEIDA CUJIA

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISION DE INGENIERIAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2016

VALIDACIÓN DE METODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACION DE NITRATOS, NITRITOS, ORTOFOSFATOS Y NITROGENO AMONIACAL EN AGUAS, EN EL LABORATORIO DE SIAMA LTDA.

MARIAN MOREINYS ALMEIDA CUJIA

Trabajo de grado para optar por el título de Químico Ambiental

Director(a) del Proyecto
ROSA MARIA HIGUERA ARDILA
Química, Especialista en Ingeniería Ambiental

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISION DE INGENIERIAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2016

DEDICATORIA

A mi amada hermana,
Martha Marolainys Almeida Cujia

A mis queridas abuelas,
Águeda Rosa Contreras A. & Martha Cecilia Almeida P.

AGRADECIMIENTOS

A Jehová Dios por mantenerme convencida de que ni muerte, ni vida, ni ángeles, ni gobiernos, ni cosas aquí ahora, ni cosas por venir, ni poderes, ni altura, ni profundidad, ni ninguna otra creación pudo ni podrá separarme de su amor, (Romanos 8: 37, 38).

A mis amados padres, por el amor infinito e intangible.

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional en todo momento de mi vida.

A Rosa María Higuera Ardila, Mi Directora, por compartirme su conocimiento labrado en tantos años de experiencia, por la dedicación y entrega, por la paciencia, por más que eso.

A mis amigos, por cada palabra de aliento a lo largo de mi carrera, por hacer magia en cada momento de desesperación e impaciencia. Por alegrar cada momento vivido, que sin duda alguna, quedarán tatuados en mi alma.

A SIAMA LTDA, por abrirme las puertas y regalarme la posibilidad de demostrar mis capacidades y todo el conocimiento aprendido a lo largo de mi carrera.

A todos,

GRACIAS, INFINITAS GRACIAS.

Maarian

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCIÓN 16
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 18
2. JUSTIFICACIÓN 19
3. OBJETIVO 21
3.1 OBJETIVO GENERAL 21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 21
4. MARCO REFERENCIAL 22
4.1. MARCO TEORICO 22
4.1.1. Contaminación Del Recurso Hídrico 22
4.1.2. Aseguramiento y Control De La Calidad 30
4.1.3. Validación De Métodos Analíticos 31
4.2. MARCO DE ANTECEDENTES 40
4.2.1. ANTECEDENTES 40
4.3. MARCO LEGAL 42
5. DISEÑO METODOLOGICO 44
5.1. EQUIPO, MATERIALES Y REACTIVOS 44
5.2. VERIFICACION DE QUIPOS Y MATERIAL DE VIDRIO VOLUMETRICO 44
5.2.1. EQUIPOS 44
5.2.2. Material De Vidrio Volumetrico 44
5.3. METODOLOGIA ANALITICA USADA EN LA VALIDACION 45
5.3.1. Tratamiento de Muestras 46
5.3.2. Determinación de Nitritos 46
5.3.3. Determinación de Nitratos 46
5.3.4. Determinación de Nitrógeno Amoniacal 46

5.3.5. Determinación de Ortofosfatos 47
5.4. DESARROLLO DE LA VALIDACION 47
5.4.1. Verificación de las Condiciones De Análisis 47
5.5. PRE- VALIDACION 48
5.5.1. Determinación del Rango Lineal 48
5.5.2. Determinación del Límite de Detección del Método (LDM) 48
5.5.3. Límite de Cuantificación del Método 49
5.5.4. Rango de Aplicación 49
5.5.5. Sensibilidad 49
5.6. VALIDACION 50
5.6.1. Precisión y Exactitud instrumental 51
5.6.2. Precisión y Exactitud del método 51
5.6.3. Porcentaje de recuperación 52
5.6.4. Rechazo de Datos 53
5.6.5. Metodología para el cálculo de la incertidumbre 53
5.7. EVALUACION DE DESEMPEÑO INTERLABORATORIO 57
6. RESULTADOS Y ANALISIS 58
6.1. NITRITOS 60
6.2. PRE - VALIDACION NITRITOS 60
6.3. VALIDACION NITRITOS 63
6.4. ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE DEL METODO DE NITRITOS 64
6.5 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE PRUEBA INTERLABORATORIO 65
6.6. NITRATOS 71
6.7. PRE - VALIDACION NITRATOS 72
6.8. VALIDACION NITRATOS 73
6.9. ESTIMACION DE LA INCERTIDUMRE DEL METODO DE NITRATOS 75

6.10. RESULTADOS DE LA EVALUACION DE PRUEBA INTERLABORATORIO 80
6.11. ORTOFOSFATOS 82
6.12. PRE - VALIDACION ORTOFOSFATOS 82
6.13. VALIDACION ORTOFOSFATOS 86
6.14. ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE DEL METODO DE ORTOFOSFATOS 94
6.15. RESULTADOS DE LA EVALUACION DE PRUEBA INTERLABORATORIO 91
6.16. NITROGENO AMONIACAL 94
6.17. PRE - VALIDACION NITROGENO AMONIACAL 94
6.18. VALIDACION NITROGENO AMONIACA 94
6.19. ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE DEL METODO DE NITROGENO AMONIACAL 98
6.20. RESULTADOS DE LA EVALUACION DE PRUEBA INTERLABORATORIO 103
6.21 CONCLUSIONES 92
6.22 RECOMENDACIONES 94
BIBLIOGRAFIA 95
ANEXOS 101

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Reacciones presentes durante el proceso para la determinación de Nitrógeno amoniacal en aguas por el método de titulación – destilación 27

Tabla 2. Reacciones en las que se presenta la formación de nitritos por acción de bacterias nitrosomas y nitrobacter. 28

Tabla 3. Volúmenes de acuerdo al rango de concentración en la determinación de Nitrógeno 47

Tabla 4. Estándares preparados durante la validación de los métodos analíticos de nitratos, nitritos, nitrógeno amoniacal y ortofosfatos 48

Tabla 5. Incertidumbre de la alícuota (U_{al}) y el volumen final de aforo -U_a 53

Tabla 6. Rangos de Z Score 54

Tabla 7. Curvas de calibración elaboradas en la pre-validación de nitritos 57

Tabla 8. Análisis estadístico para el límite de detección de Nitritos 58

Tabla 9. Evaluación linealidad y sensibilidad del método 59

Tabla 10. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en la validación de Nitritos 59

Tabla 11. Incertidumbre asociada a las fuentes aleatorias 62

Tabla 12. Incertidumbre asociada a fuentes sistemáticas 62

Tabla 13. Incertidumbre asociada a las medidas volumétricas 63

Tabla 14. Incertidumbre asociada al volumen final de aforo de la alícuota 63

Tabla 15. Incertidumbre asociada a los instrumentos usados al diluir la muestra 64

Tabla 16. Incertidumbre asociada al aforo de la alicuota 64

Tabla 17. Resultado de la evaluación del desempeño interlaboratorio NO_2^- 66

Tabla 18. Curvas de calibración elaboradas en la pre-validación de nitratos. 68
Tabla 19. Análisis estadístico para el límite de detección de nitratos 69
Tabla 20. Evaluación linealidad y sensibilidad del método 70
Tabla 21. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en la validación, estándares y muestras para nitratos 71
Tabla 22. Incertidumbre asociada a las fuentes aleatorias 73
Tabla 23. Incertidumbre asociada a las fuentes aleatorias 73
Tabla 24. Resultado de la evaluación del desempeño interlaboratorio NO_3^- 75
Tabla 25. Curvas de calibración elaboradas en la pre-validación de ortofosfatos 77
Tabla 26. Análisis estadístico del límite de detección establecido para el método de ortofosfatos 78
Tabla 27. Evaluación linealidad y sensibilidad del método 79
Tabla 28. Análisis estadístico de estándares y muestras en la validación para el método de ortofosfatos 79
Tabla 29. Incertidumbre asociada con las fuentes aleatorias 81
Tabla 30. Incertidumbre asociada con las fuentes sistemáticas 82
Tabla 31. Resultado de la evaluación del desempeño interlaboratorio PO_4^- 83
Tabla 32. Análisis estadístico del límite de detección para nitrógeno amoniacal 84
Tabla 33. Análisis estadístico de estándares y muestras en la validación para el método de Nitrógeno Amoniacal 85
Tabla 34. Incertidumbre asociada a fuentes aleatorias 87
Tabla 35. Incertidumbre asociada a medidas sistemáticas 87
Tabla 35. Incertidumbres de Nitrógeno Amoniacal asociadas a las medidas volumétricas 88
Tabla 36. Incertidumbre asociada a la medición 89

Tabla 37. Incertidumbre asociada a los equipos a los equipos 89

Tabla 38. Resultado de la evaluación del desempeño interlaboratorio NH_3 91

LISTA CUADROS

Cuadro 1. Legislación colombiana y parámetros de nitratos, nitritos, ortofosfatos y nitrógeno amoniacal como criterios de calidad del recurso hídrico. 46

Cuadro 2. Selección y preparación de muestras fortificadas para la validación de los métodos analíticos de nitratos, nitritos, nitrógeno amoniacal y ortofosfatos. 56

Cuadro 3. Incertidumbre asociada a los equipos para la validación 89

Cuadro 4. Incertidumbre asociada a la medición 90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de reacción de nitratos empleando el método del salicilato de sodio. 31

Figura 2. Mecanismo de reacción de nitritos empleando el método colorimétrico. Reacción de Shinn. 32

Figura 3. Espectro obtenido en el barrido de longitud de onda para Nitritos 66

Figura 4. Estabilidad del complejo de diazonio para el método de Nitritos 66

Figura 5. Carta de Control para el método colorimétrico de Nitritos 69

Figura 6. Espectro obtenido en el barrido de longitud de onda en la validación de nitratos 75

Figura 7. Estabilidad del complejo p- nitrosalícilato de Sodio 76

77

Figura 8. Gráfico de la curva de calibración seleccionada para el método de Nitratos

Figura 9. Carta de Control para método colorimétrico de Nitratos 81

Figura 10. Espectro obtenido en el barrido de longitud de onda en la validación de ortofosfatos. 85

Figura 11. Estabilidad del complejo fosfomolíbdico 86

Figura 12. Gráfico de la curva de calibración seleccionada para el método de ortofosfatos. 87

Figura 13. Carta de Control para el método colorimétrico Ortofosfatos 91

Figura 14. Carta Control Método Destilación – Titulación de Nitrógeno Amoniacal 98

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Equipos, materiales y reactivos utilizados durante la validación de los métodos analíticos 104

Anexo B. Limpieza y verificación del material usado durante la validación 105

Anexo C. Preparación de reactivos y soluciones usadas en el desarrollo de las metodologías analíticas para la determinación de nitritos, nitratos, ortofosfatos y nitrógeno amoniacal. 106

Anexo D. Valores de la distribución t (99%) para calcular LDM (Limite de Detección del Método 107

Anexo E. Absorbancias obtenidas en la validación de métodos analíticos para la determinación de nitritos, nitratos, nitrógeno amoniacal y ortofosfatos. 108

Anexo F. Lectura de blancos y determinación del límite de detección para el método colorimétrico de nitritos, nitratos y ortofosfatos. 109

Anexo G. Resultados de los estándares y muestras para la determinación de nitritos, nitratos, ortofosfatos y nitrógeno amoniacal. 110

Anexo H. Resultados prueba de desempeño IDEAM para los métodos de nitritos, nitratos, ortofosfatos y Nitrógeno Amoniacal. 113

Anexo I. Equipos Usados en la validación de los métodos analíticos de nitritos, nitratos, ortofosfatos y nitrógeno amoniacal. 115

.

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

IDEAM: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales

SIAMA: Sistemas Integrados para la industria del Agro, Minero – Energética y el Medio Ambiente.

ONU: Organización de las Naciones Unidas

NTC: Norma Técnica Colombiana

ISO: Organización Internacional de Estandarización

IEC: Comisión Electrónica Internacional

LDM: Limite de Detección del Método

OMS: Organización Mundial de Salud

GLOSARIO

ACREDITACION: es un reconocimiento a la competencia técnica e “idoneidad” del ente de certificación e inspección a los laboratorios de ensayo que realizan diferentes análisis en los que se obtienen resultados confiables.

ANALITO: Sustancia (química, física o biológica) buscada o determinada en una muestra, que debe ser recuperada, detectada o cuantificada por el método.

APLICABILIDAD: Los analitos, matrices y concentraciones para los cuales puede utilizarse satisfactoriamente un método de análisis con el fin de determinar su conformidad con una norma.

BLANCO: es una matriz que no contiene el analito de interés u objetivo para el método seleccionado.

CALIBRACION conjunto de operaciones que se establecen, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento o sistema de medición, los valores representados por una medida materializada y los correspondientes de la magnitud, realizados por los patrones.

COMPONENTE DE LA INCERTIDUMBRE: Cada una de las contribuciones a la incertidumbre.

CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD: exigencias de una característica de funcionamiento o comportamiento en función de las cuales se puede determinar que un método analítico es adecuado para la finalidad perseguida y ofrece resultados confiables.

CUERPO LENTICO: Cuerpo de agua cerrado que permanecen en un mismo lugar sin correr ni fluir. Comprenden todas las aguas interiores que no presentan corriente continua como: lagos, lagunas, pantanos, etc.

ESTANDARIZACION: es un proceso que tiene como objetivo determinar o establecer las condiciones de análisis en que se pretende cuantificar y analizar un analito.

EXACTITUD: es el grado de aproximación entre el valor obtenido experimentalmente y el valor real o aceptado; normalmente se expresa en términos de error. Se tendrán como referencia los patrones preparados en el laboratorio, y por lo menos un patrón externo CERTIFICADO. La concentración de estos patrones deberá estar localizada dentro del rango de aplicación del método.

ERROR ALEATORIO: Es aquel error inevitable que se produce por eventos únicos imposibles de controlar durante el proceso de medición. Ejemplo: Errores de apreciación, tales como el paralaje, que depende del observador y su capacidad en cuanto al límite separador del ojo.

ERROR SISTEMATICO: Es aquel que se produce de igual modo en todas las mediciones que se realizan de una magnitud. El error sistemático está condicionado por algún factor distinto al azar. Ejemplo: el error de las masas patrón del laboratorio se transfiere sistemáticamente al momento de calibrar la balanza.

FACTOR DE COBERTURA: factor numérico utilizado como multiplicador de la incertidumbre combinada, para obtener una incertidumbre expandida. (Guía Eurachem).[1]

INCERTIDUMBRE: parámetro asociado con el resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mesurando.

INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR COMBINADA: es el valor de la incertidumbre calculada para un grupo de fuentes individuales relacionadas aplicando la ley de propagación de incertidumbres.

INCERTIDUMBRE EXPANDIDA: intervalo dentro del cual se cree que está el valor del mesurando para un cierto nivel de confianza. Se calcula a partir de los valores obtenidos para todas las fuentes individuales de incertidumbre.[2]

MATERIAL DE REFERENCIA (RM): es el material o sustancia en el cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y están bien definidos para permitir utilizarlos en la calibración del instrumento o en la evaluación de un método de medición.[2]

MESURANDO: cantidad particular sujeta a medición.

MUESTRA ADICIONADA: es una muestra natural o real a la cual se le ha adicionado una cantidad conocida del analito que se estudia. Esta adición debe hacerse en la forma prevista en el diseño de las condiciones de estandarización para que sea reproducible.[2]

REPETIBILIDAD: es una medida de la precisión de datos obtenidos por un solo operador trabajando siempre en las mismas condiciones (equipos, materiales y reactivos). La Reproducibilidad es una medida de la precisión de los datos

obtenidos entre dos o más analistas y/o laboratorios que utilizan el mismo método y SIMILARES CONDICIONES.

RECUPERACIÓN: es la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente una especie química que ha sido adicionada a una muestra. Se expresa como Porcentaje (%R).

VALIDACION: es un proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y que demuestran que un método de análisis es lo suficientemente confiable y “reproducible” para generar el resultado esperado dentro de los intervalos establecidos.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue realizar la validación de métodos analíticos para la determinación de nitratos, nitritos, ortofosfatos y Nitrógeno amoniacal en aguas. La validación de nitritos, nitratos y ortofosfatos, se determinó mediante métodos colorimétricos y el Nitrógeno amoniacal por el método de destilación - titulación.

Este proyecto forma parte del cumplimiento de uno de los requisitos establecidos en la Norma NTC ISO/IEC: 17025- 2005 para que el laboratorio de SIAMA LTDA, pueda ser acreditado. Para el desarrollo de n estas validaciones, se tomaron como referencia los procedimientos analíticos del laboratorio de SIAMA LTDA, el estándar método edición 22 para el análisis de aguas y la guía Eurachem para la validación y determinación de la Incertidumbre en métodos analíticos.

En el proceso de validación de cada una de las metodologías, se establecieron los valores de: Limite de detección, límite de cuantificación, repetibilidad, linealidad, exactitud, recuperación, rango de trabajo y cálculo de la incertidumbre. Se concluyó que los métodos validados en el laboratorio de SIAMA LTDA, son adecuados para su aplicación en el análisis de aguas y generan resultados confiables.

PALABRAS CLAVES: validación, acreditación

ABSTRACT

The objective of this job was perform validation of analytic methods to determinate nitrates, nitrites, orthophosphates and ammoniac nitrogen in water. Validation of nitrites, nitrates and orthophosphates was determined by colorimetric methods and ammoniac nitrogen by distillation – titration method.

This project is part of fulfillment about one of the requirements established by the norm NTC ISO/IEC: 17025 – 2005 for the laboratory SIAMA LTDA, can be accredited. To develop these validations, was taken as reference the analytic procedures of SIAMA LTDA's laboratory, the standard method 22 edition for water analysis and the Eurachem guide for validation and determination to the analytics method uncertainty.

On the validation process, each one of the methodologies, were established values as: Detection limit, limit of quantification, repeatability, linearity, accuracy, recovery, working range, and uncertainty calculation. It concludes that the valid methods of SIAMA LTDA´s laboratory are adequate to apply in the water's analysis and make reliable results.

KEYWORDS: Validation, acreditation

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los recursos hídricos se ven enfrentados a un sinnúmero de amenazas que se originan inicialmente de las actividades humanas, el crecimiento urbano, la contaminación, el cambio climático, la deforestación, etc. Dichas actividades, generan un impacto directo sobre los ecosistemas y los recursos hídricos. La minería, la agricultura, la construcción de puentes y carreteras, ocasionan la acumulación excesiva de residuos en suspensión en los ríos (sedimentación), que promueven el deterioro de la calidad del agua.
La contaminación fisicoquímica del agua genera enfermedades patógenas que causan incluso la muerte de seres humanos. En un informe realizado por la ONU (Organización de las Naciones Unidas), se indicó que los países subdesarrollados son los más afectados por las aguas contaminadas y los que presentan mayor porcentaje de mortalidad al año.

El uso insostenible del agua como recurso hídrico, es un gran desafío debido a los factores que participan en la inestabilidad natural de los recursos. Por ello, es indispensable comprender las propiedades microbiológicas y fisicoquímicas del agua, con el fin de ejercer un mejor manejo del recurso.

Actualmente, en Colombia existe cada vez más la necesidad de evaluar la disponibilidad, calidad y las limitaciones de oferta de las fuentes hídricas, teniendo en cuenta que el deterioro de la calidad del agua es cada vez mayor.[3] En Colombia existe un gran número de laboratorios ambientales que realizan estudios fisicoquímicos y microbiológicos del agua los cuales deben contar con métodos analíticos acreditados como lo establece el Decreto 1600 de 1993 y que menciona al Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia, IDEAM como ente acreditador para los laboratorios que generan información ambiental.[4]

Para que una prueba sea acreditada por el IDEAM, el laboratorio debe demostrar su capacidad y confiabilidad mediante la validación y participación en las pruebas de desempeño anualmente, con el fin de evidenciar que el laboratorio puede ejecutar correctamente el método analítico descrito en la norma estándar.
El laboratorio de SIAMA cuenta con solo 14 parámetros acreditados y con el fin de ampliar la prestación de sus servicios, tiene como objetivo extender la acreditación a la totalidad de las pruebas que realiza.

En el presente proyecto de grado, se validaron métodos analíticos para la determinación de nitratos, nitritos, ortofosfatos y nitrógeno amoniacal empleados en el laboratorio de SIAMA LTDA, los cuales fueron auditados por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia, IDEAM, para su

respectiva acreditación. Este proceso se desarrolló como pasantía mediante un convenio entre la Universidad Santo Tomas seccional Bucaramanga y el laboratorio de SIAMA LTDA (Servicios Integrados para la Industria del Agro, Minero-Energética y el Medio Ambiente) de Bucaramanga.

Las validaciones se realizaron teniendo en cuenta los procedimientos del sistema de calidad del laboratorio y los lineamientos de la norma NTC ISO/IEC 17025:2005.[65] Este proyecto estuvo dirigido exclusivamente al estudio de los cuatro parámetros anteriormente mencionados, bajo las condiciones del laboratorio de SIAMA LTDA.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las aguas superficiales en Colombia reciben y transportan aguas contaminadas sin ningún tipo de tratamiento, las cuales se han ido incrementando debido al crecimiento poblacional y las distintas actividades del hombre. Para ejercer control sobre esta problemática, es necesario realizar un monitoreo continuo que permita reducir el impacto causado principalmente en la salud humana.[5]

Dentro de las principales variables que se monitorean para la determinar la calidad del agua se encuentran el Nitrógeno, Solidos, Fosforo, DBO (Demanda Bioquímica de Oxigeno), DQO (Demanda Química de oxigeno), Oxígeno disuelto, pH y microorganismos entre otros. [5]

Actualmente, los laboratorios ambientales que producen información sobre la calidad del recurso hídrico deben estar acreditados por el IDEAM, según decreto 1600 de 1993.[1] Para obtener esta acreditación, se deben validar los métodos bajo las condiciones del laboratorio, siendo este proceso un requisito de la NORMA NTC-ISO-IEC 17025- 2005.[6]

El laboratorio de SIAMA LTDA participa en pruebas de desempeño que programa el IDEAM (requisito para la acreditación de métodos), obteniendo resultados satisfactorios. A pesar de esto, no cuenta con la acreditación para la determinación de las variables de nitrógeno amoniacal, nitrato, nitrito y fosforo, siendo esta una limitante para prestar el servicio analítico completo. La validación es un requerimiento obligatorio que demuestra que el laboratorio está en capacidad de proporcionar resultados fiables, por lo tanto si no lo son, conducirá a toma de decisiones erróneas y gasto innecesario de recursos.

Para que los métodos empleados en el laboratorio de SIAMA sean acreditados es requisito indispensable validar previamente los métodos antes mencionados de acuerdo con el procedimiento que corresponde en su sistema de calidad.

Debido a lo anterior, el desarrollo del presente proyecto de grado, tiene como propósito, la validación de los métodos analíticos de nitratos, nitritos, ortofosfatos y nitrógeno amoniacal en muestras de aguas. Los parámetros de interés en este estudio fueron: rango de aplicación, límite de detección y de cuantificación, exactitud, precisión, recuperación y estimación de la incertidumbre.

2. JUSTIFICACIÓN

Cada vez las exigencias de los clientes en relación a la calidad de un servicio analítico es mayor, razón por la cual el proceso de validación de metodologías analíticas, en el laboratorio de SIAMA LTDA, asegurara su competencia técnica reconocida por un ente acreditador como el IDEAM.

Al contar con métodos validados y acreditados ante el IDEAM el laboratorio de SIAMA LTDA puede obtener resultados similares y compararlos con otros laboratorios que hayan realizado también este proceso y asegurar de esta manera un control de calidad analítica emitiendo resultados veraces.

Considerando que el Laboratorio de SIAMA se encuentra acreditado por IDEAM bajo la norma NTC-ISO/IEC 17025:2005 en 14 de los ensayos que realiza, incluyendo muestreos y en la búsqueda del mejoramiento continuo para satisfacer la necesidades de los clientes, requiere ampliar su acreditación, en los parámetros de nitritos, nitratos, ortofosfatos y nitrógeno amoniacal, debido a que por requerimientos de la normatividad estos parámetros, son solicitados por las autoridades ambientales a las empresas, para garantizar el cumplimiento de los requisitos de los vertimientos que tienen como destino final fuentes hídricas.[6] Llevar a cabo el proceso de validación en SIAMA LTDA de los parámetros mencionados con fines de acreditación, aumentaría la capacidad de servicio, status y reconocimiento a nivel nacional.

Adicionalmente en la norma NTC-ISO/IEC 17025:2005, en el numeral 5.4.5 "*Validación de métodos*" se establece que los laboratorios deben realizar la validación de métodos no normalizados, métodos desarrollados o diseñados por el mismo, métodos normalizados empleados o métodos modificados para confirmar, que son aptos para el fin previsto, por lo tanto con el desarrollo del presente estudio se daría cumplimento a las disposiciones expuestas en esta norma.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Validar los metodos analiticos para la determinacion de nitratos, nitritos, ortofosfatos y nitrogeno amoniacal en aguas potables, naturales y residuales en el laboratorio de SIAMA LTDA., siguiendo los lineamientos de la Norma NTC-ISO/IEC 17025:2005, con el fin de garantizar los resultados obtenidos por el laboratorio.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las condiciones experimentales óptimas para llevar a cabo la validación de cada uno de los métodos analíticos propuestos.

- Validar los métodos analíticos de ortofosfatos, nitritos, nitratos y nitrógeno amoniacal determinando los siguientes criterios de validación: el límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, rango de aplicación y recuperación.

- Estimar la incertidumbre de medición asociada a los métodos validados.

- Ajustar el protocolo con la información de la validación de los métodos analíticos y los controles de calidad para futuros análisis.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1. MARCO TEÓRICO

4.1.1 Contaminación del recurso hídrico: La contaminación del agua se debe a la presencia de organismos patógenos que causan el deterioro de su calidad e inhiben su disponibilidad como recurso hídrico para consumo humano. Dentro de estos contaminantes se encuentran: los materiales inertes, productos químicos, organismos vivos, residuos industriales, entre otros.[7]

Según la OMS el agua está contaminada "cuando su composición se encuentra modificada de tal forma que no cuenta con las condiciones necesarias para su uso". La contaminación del agua provoca graves efectos en los organismos, poblaciones y ecosistemas, alterando los ciclos naturales y generando problemas ambientales, económicos y sociales.[7]

En Colombia, en las diferentes actividades socioeconómicas la mayoría de las aguas utilizadas son descargadas a las fuentes hídricas sin tratamiento alguno. Estos vertimientos se han ido incrementando debido al crecimiento poblacional e industrial, generando degradación y contaminación del recurso hídrico.[8]

Estos vertimientos aportan entre otros, altas cargas de compuestos de nitrógeno y fosforo provenientes de las aguas residuales domésticas, el uso de fertilizantes en la agricultura y de algunos sectores industriales, que provocan eutrofización en los cuerpos lenticos, produciendo un crecimiento excesivo de plantas acuáticas que consumen el oxígeno disponible para los peces, limitando su reproducción y desarrollo en algunos casos causándoles la muerte.[9]

4.1.1.1 Nitrógeno: En Las aguas y aguas residuales las formas de nitrógeno de mayor interés son, en orden decreciente de estado de oxidación: nitrato, nitrito, amoníaco y nitrógeno orgánico. Todas estas formas de nitrógeno, así como gas nitrógeno (N2), son bioquímicamente interconvertibles y son componentes del ciclo del nitrógeno. Ellos son de interés por muchas razones**.**

- **Nitrógeno Amoniacal**

El nitrógeno amoniacal es una forma del nitrógeno en agua superficial y residual. El amoniaco, como ion amonio, es catalogado como el "contaminante nitrogenado" que se presenta con mayor frecuencia en el agua; es un producto natural clave en el ámbito industrial. Se encuentra de manera natural en aguas residuales y superficiales. Se produce en gran parte por la desanimación de los compuestos nitrogenados y por hidrolisis de la urea. Su concentración, es relativamente baja en acuíferos por su absorción en las arcillas, teniendo en cuenta, que no es lixiviado de los suelos. La concentración del ion amonio en el agua varía desde unos 10µg/L en aguas naturales superficiales y subterráneas hasta más de 30 mg/L en aguas residuales industriales y domésticas.[10]

- **Métodos de determinación de Nitrógeno Amoniacal**

Hay factores como la concentración y la presencia de interferencias que determinan la selección del método para determinar nitrógeno amoniacal.
Existen dos técnicas colorimétricas para la determinación de nitrógeno amoniacal en el agua: la nesslerización y el método de la sal de fenol, que se pueden utilizar sin o con destilación previa cuando hay interferencias; el método de titulación con destilación previa, el método del electrodo selectivo de amonio, análisis por inyección de flujo con fenatos y el método del electrodo selectivo de amonio usando adición conocida con o sin destilación previa de la muestra.[11]

- **Determinación del nitrógeno amoniacal por titulación con destilación previa**

El método de titulación para la determinación de nitrógeno amoniacal, es el más apropiado y usado con precisión cuando la concentración de nitrógeno amoniacal existente en el agua, es relativamente alta y solo se utiliza en muestras que han sido destiladas preliminarmente.[12]

Principio del Método: Inicialmente la muestra es tamponada con una solución Buffer de Borato y NaOH a pH 9.5, para disminuir la hidrólisis de compuestos orgánicos de nitrógeno (Ver reacción I). Para posteriormente ser destilada. Durante la destilación se libera amoniaco que se recibe en una solución de ácido bórico (ver reacción II), determinándose luego el nitrógeno amoniacal por titulación con ácido sulfúrico o clorhídrico 0.02N en presencia de un indicador mixto (Ver reacción III).

Tabla 1. Reacciones presentes durante el proceso para la determinación de Nitrógeno amoniacal en aguas por el método de destilación - titulacion

REACCIONES PRESENTES EN LA DETERMINACION DE NITROGENO AMONIACAL EN AGUAS POR EL METODO DESTILACION – TITULACION.		
ETAPAS		**REACCION**
I.	Neutralización	$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \rightarrow 2NH_3 + Na_2SO_4 + H_2O$
II.	Destilación	$3NH_3 + H_3BO_3 \rightarrow (NH_4)_3BO_3$
III.	Titulación	$(NH_4)_3BO_3 + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_3SO_4 + H_2BO_3(Ion\ Borato)$

Fuente: Estándar Métodos, 2012

- **Nitratos y Nitritos**

Los nitratos y nitritos se encuentran en diferentes formas en los sistemas naturales y son los responsables de la contaminación de los recursos hídricos.[13] Dicha contaminación, es palpable en las actividades industriales, pozos sépticos, agricultura, porquerizas, etc.[14]

El nitrógeno total oxidado es la suma del nitrato y nitrito. El nitrato generalmente se presenta en cantidades pequeñas en el agua superficial, pero puede alcanzar altas concentraciones en algunas aguas subterráneas. En exceso, contribuye a la metahemoglobinemia enfermedad conocida en lactantes. El límite de Nitratos de 10mg/L, se ha exigido en el agua potable para prevenir este trastorno. El nitrato se encuentra sólo en trazas en las aguas residuales domésticas frescas, pero en efluentes de plantas de tratamiento de nitrificación biológica, el nitrato puede encontrarse en concentraciones hasta de 30 mg/L. Es un nutriente importante para muchos autótrofos fotosintéticos y en algunos casos se ha identificado un limitante en el crecimiento. En el ambiente, las altas concentraciones de nitratos y nitritos causan la perdida de la biodiversidad.[15]

El nitrito es un estado de oxidación intermedio de nitrógeno, tanto en la oxidación de amoníaco a nitrato y en la reducción de nitrato. Dicha oxidación y la reducción puede ocurrir en plantas de tratamiento de aguas residuales, sistemas de distribución de agua, y las aguas naturales. Además, puede entrar en el sistema

de suministro de agua a través de su uso como un inhibidor de la corrosión en agua de proceso industrial. El nitrito es un agente etiológico actual de metahemoglobinemia.[16]

La formación del nitrito se presenta por la acción de bacterias nitrosomonas. La nitrificación es una etapa importante en la que ocurre la oxidación biológica del amonio con el oxígeno en nitrito. A su vez, las nitrobacter, se encargan de oxidar los nitritos hasta la formación de nitratos.

Tabla 2. Reacciones en las que se presenta la formación de nitritos por acción de bacterias nitrosomas y nitrobacter.

$$\boldsymbol{I.Nitrosomona}:$$
$$55NH_4^+ + 76O_2 + 109HCO_3^- \rightarrow C_5H_7O_2N + 54O_2^- + 57H_2O + 104H_2CO_3$$

$$\boldsymbol{II.Nitrobacter}:$$
$$400NO_2^- + NH_4^+ + 4H_2CO_3^- + HCO_3^- + 195O_2 \rightarrow C_5H_7O_2N + 3H_2O + 400NO_3^-$$

Fuente: autora.

Analíticamente, los nitratos y nitrito pueden ser determinados por métodos de espectrometría ultravioleta-visible (UV/VIS), electroquímicos cromatográficos y enzimáticos entre otros.[17, 18]

Los métodos para la determinación de Nitratos en agua son complejos debido a las interferencias que se puedan encontrar y los rangos de concentración en las diferentes técnicas los cuales limitan su aplicación.[19]

El método del salicilato de sodio descrito en el libro "Análisis de las aguas de J.Rodier, es el que presenta mayor difusión en los laboratorios, debido a su rango de aplicación, no presenta mayores interferencias y es bajo costo.[33] Para la determinación de nitritos el método colorimétrico de Shinn es ampliamente utilizado en los laboratorios ambientales y es el propuesto en el estándar método.[20]

- **Métodos para determinación de nitratos y nitritos en aguas**

Analíticamente, los nitratos y nitritos pueden ser determinados por métodos de espectrometría ultravioleta-visible (UV/VIS), electroquímicos cromatográficos y enzimáticos entre otros.[17, 18]

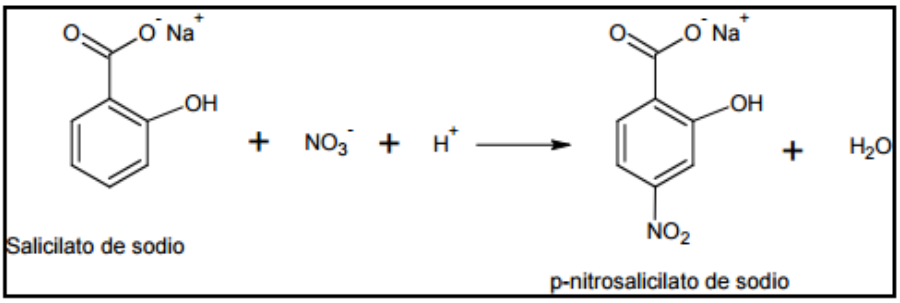
Los métodos para la determinación de Nitratos en agua son complejos debido a las interferencias que se puedan encontrar y los rangos de concentración en las diferentes técnicas los cuales limitan su aplicación.[19] El método del salicilato de sodio descrito en el libro "Análisis de las aguas de J.Rodier, es el que presenta mayor difusión en los laboratorios, debido a su rango de aplicación, no presenta mayores interferencias y es bajo costo.[21]

Para la determinación de nitritos se utilizó el método colorimétrico de Shinn que es ampliamente usado en los laboratorios ambientales y es el propuesto en el estándar métodos.[20]

- **Determinación de nitratos por el Método Colorimétrico - Salicilato Sódico**

Principio del Método: este método está basado en la formación de iones nitronio (NO2-) a partir de la nitración del salicilato de sodio en medio ácido y calentamiento. Los iones nitronio sufren reacciones de diazotación con hidróxido de sodio y tartrato de sodio y potasio, formando el p-nitrosalícilato de sodio evidenciado por una coloración amarilla que se mide por espectrofotometría a una longitud de onda de 415 a 420 nm. (Ver figura 1).[22] La filtración se realiza a través de una membrana de 0,45 micras antes de llevar a cabo las mediciones, cuando las muestras contienen materia organica.[21]

Figura 1. Mecanismo de reacción de nitratos empleando el método del salicilato de sodio.



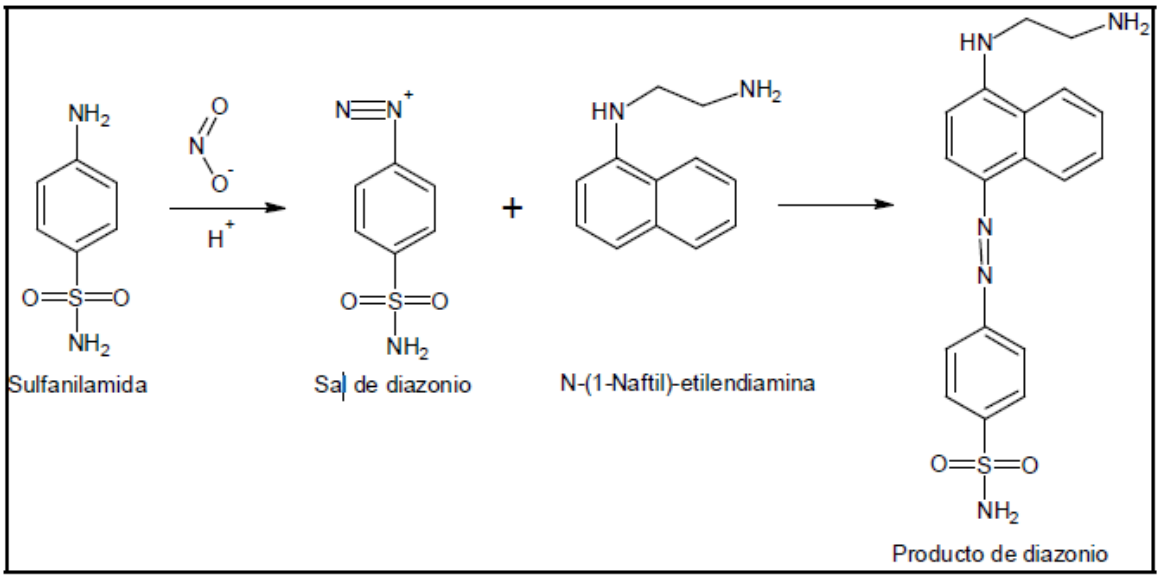
Fuente: Molina S; Estandarización de Métodos de Análisis. TESIS DE GRADO. USTA; 2010.

Este método es aplicable a aguas salinas, superficiales, residuales domésticas y de origen industrial en un intervalo de 0,11 a 2,5 mg NO3-N/L. Las muestras que presentan una concentración mayor a 2,5 mg NO3-N/L se diluyen y el factor de dilución se tiene en cuenta para el cálculo.[21]

- **Determinación de nitritos por el Método Colorimétrico**

Principio del método: El nitrito (NO^{2-}) se determina mediante la formación de un colorante azo de color purpura rojizo mediante el acoplamiento de la sulfanílamida diazotizada con diclorhidrato de N-(1-naftil)- etilendiamina (NED diclorhidrato) a pH entre 2,0 y 2,5 como se muestra en la figura 2. Este método es adecuado para la determinación de nitritos en concentraciones de 0,005 a 1,0 mg NO2–-N/L.[23]

Figura 2. Mecanismo de reacción de nitritos empleando el método colorimétrico. Reacción de Shinn.



Fuente: Molina S; Estandarización de Métodos de Análisis. TESIS DE GRADO. USTA; 2010.

El sistema de color que se manifiesta, obedece la ley de Beer en concentraciones hasta de 0,180 mg NO2–-N/L a una longitud de onda de 543 nm Se pueden determinar concentraciones altas haciendo dilución de la muestra.
En la muestra no deben existir iones coloreados que afecten el sistema de color. Los sólidos suspendidos se deben remover por filtración a través de una membrana de 0,45 micras. Este método es aplicable en la determinación de nitritos en aguas potables, superficiales, salinas y aguas residuales de origen doméstico o industrial. [23]

4.1.1.2. Fosforo: el fosforo forma parte de los nutrientes primarios no tóxicos que ocasionan el crecimiento excesivo de algas y malezas en los cuerpos de agua. La presencia del fosforo en el agua, permite el crecimiento de los organismos fotosintéticos en diferentes cantidades y es limitado. El fosforo crea la agrupación de sedimentos en los cuerpos de agua y en los lodos por el

tratamiento de esta. En el agua, el fosforo se presenta como: ortofosfatos, fosfatos condensados, polifosfatos y fosfatos orgánicos. La forma más elemental de los fosfatos son los ortofosfatos.[24]

La determinación de fosforo en el agua se puede efectuar mediante métodos reportados en la literatura, dentro de ellos se encuentran: método colorimétrico con ácido vanadomolibdofosfórico, método automatizado de reducción de ácido ascórbico, análisis por flujo de inyección de fosforo total con digestión de persulfato y método de persulfato.[25] Para este proyecto se determinó ortofosfatos mediante el método colorimétrico del ácido ascórbico.[26]

- **Métodos para la determinación de fosfatos en aguas**

La determinación de fosforo en el agua se puede efectuar mediante métodos reportados en la literatura, dentro de ellos se encuentran: método colorimétrico con ácido vanadomolibdofosfórico, método automatizado de reducción de ácido ascórbico, análisis por flujo de inyección de fosforo total con digestión de persulfato y método de persulfato.[25] Para este proyecto se determinarán fosfatos mediante el método colorimétrico del ácido ascórbico.[26]

- **Método del Ácido Ascórbico por Colorimetría**

Principio del Método: El rango de concentración para el método del ácido ascórbico es de 0.15 a 1.3 mg/L para un paso de luz de 1cm. La reacción de los iones ortofosfatos (Ver reacción), en conjunto con una solución ácida que contiene iones molibdato y antimonio, produce la formación de un complejo antimonil-fosfomolibdato, que al reducirse con ácido ascórbico, forma un complejo de molibdeno de color azul intenso, adecuado para mediciones fotométricas. Este procedimiento es aplicable a todo tipo de aguas, incluyendo los efluentes y el agua de mar.[26]

$$H_3PO_4 + Mo_7O_{24}.(NH_4)_6 \rightarrow PO_4.\ 12MoO_3(NH_4)_3 \rightarrow Mo(V)(Azul\ de\ molibdeno)$$

4.1.2. Aseguramiento y control de la calidad: El aseguramiento de la calidad es un programa de operaciones de laboratorio que especifica las medidas necesarias para producir resultados con precisión y exactitud.[27]

La norma NTC ISO/IEC17025 de 2005 establece que para se debe contar con una serie de procedimientos que garantice que el proceso llevado a cabo se encuentra bajo control" lo cual, permite vigilar ante todo la exactitud de los

resultados a partir de los materiales de referencia utilizados y la exactitud a partir de un análisis replicados.[28]

Para evaluar la calidad de los resultados en el laboratorio se deben tener dos controles de calidad un interno que incluya entre otros la competencia del analista, la precisión, exactitud, el límite de detección y el rango de aplicación. El control de calidad externo se realiza con muestras de comparación entre laboratorios y evidencia la competencia técnica sobre las metodologías analíticas.[28]

4.1.3. Validación de métodos analíticos: Antes de usar un método es necesario demostrar que este cumple con unos requisitos específicos que dependen de la aplicación que se le quiera dar. Este proceso de verificación se conoce como validación.[29] "La validación, es la confirmación de un método analítico, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto".[30]

Existe un ciclo de validacion que se repite teoricamente de manera indefinida dependiendo de los avances instrumentales y el desarrollo de nuevas tecnicas. Este ciclo sigue el orden: desarrollo del metodo, prevalidacion – validacion y control de calidad del laboratorio.[31, 67]

En los ultimos 20 años la validacion de metodos analiticos ha sido objetivo de investigacion y discusion en el ambito químico, farmacologico, biologico, ambiental, etc. Gracias a los estudios efectuados recientemente ha mejorado en gran manera, la calidad de las mediciones en el estudio de la validacion de metodos analiticos.[32]

4.1.3.1. Importancia de la validación de métodos analíticos: la validación de métodos analíticos es un proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas que demuestran que un método de análisis es lo suficientemente confiable y "reproducible" para generar el resultado esperado dentro de los intervalos establecidos. Las validaciones proporcionan un alto grado de confianza, validez y seguridad en el método analítico.[21]
La validación se constituye, por lo tanto, en un componente esencial de las medidas que un laboratorio debe implementar para producir datos analíticos confiables.[33, 68]

4.1.3.2. Criterios para la validación de métodos analíticos: dentro de los criterios para validación se encuentran: límite de detección, precisión, exactitud, incertidumbre, linealidad, recuperación, rango de trabajo, límite de cuantificación.[34]

La validación de métodos hace inclusión del control interno de la calidad, estadísticas de rendimiento y pruebas inter-laboratorios.[35]

- **Selectividad**

Es la capacidad de un método analítico para cuantificar un analito en presencia de interferencias que se encuentran en la matriz de interés.[32, 36]
Para seleccionar un método se debe tener en cuenta que el rango de aplicación cumpla con las necesidades de los clientes, que sus resultados sean reproducibles, que sea económico, que sus reactivos y materiales se puedan conseguir en el mercado, tener los equipos necesarios y que los residuos que se generen se puedan eliminar fácilmente.[3]

- **Rango**

Son los niveles de concentración superior o inferior que asocian linealidad, precisión y exactitud y que se reflejan en el rendimiento del método usado o la matriz empleada. [37]

- **Linealidad**

La linealidad es la proporcionalidad que se manifiesta entra la concentración y la señal producida por el equipo o instrumento. Es importante realizar la verificación de este, para saber si el laboratorio está cumpliendo con el rango y la linealidad que está reportada en la literatura del método.[38, 39]

- **Sensibilidad**

Es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración. Normalmente se mide como la pendiente de la curva de calibración.[40]

- **Límites de detección**

- **Límite de detección instrumental (LDI**)

Concentración de analito que produce una señal superior a cinco veces la relación señal/ruido del instrumento; es similar al nivel crítico y criterio de detección que es 1,645 veces el valor de la desviación estándar (s) de análisis de blancos.[41]

- **Límite de detección (LDO)**

Se define como la cantidad más pequeña detectable por encima del ruido de un procedimiento y que se encuentra dentro un límite de aceptación; este último se establece de modo que las probabilidades de que se presenten errores de tipo I (falso positivo) y II (falso negativo) sean razonablemente pequeños.[42]

- **Límite de detección del método (LDM)**

El límite de detección es considerado como la concentración de analito que, cuando se procesa a través del método completo, produce una señal con una probabilidad del 99% de ser diferente del blanco.[34]

- **Límite de cuantificación**

Es la menor cantidad del analito de una muestra que puede ser cuantificada, con aceptable precisión y exactitud. Suele expresarse como valor verdadero de la medición que producirá estimaciones con una desviación estándar relativa (RSD) generalmente de 10 % (o 6 %). El límite de cuantificación puede ser igual o mayor al límite de detección, nunca inferior.[43]

Para métodos instrumentales*:* se determina usando muestras de concentración baja y estableciendo el nivel de cuantificación con precisión y exactitud. Es definida como la relación señal/ruido 10:1.

Para métodos no instrumentales*:* en este tipo de método, visualmente se evalúa el análisis de las muestras con concentraciones bajas y conocidas, determinando el nivel en el que el analito se puede cuantificar con precisión y exactitud.[44]

- **Precisión**

Indica el grado de concordancia entre análisis repetidos de una misma muestra, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones establecidas. Usualmente se expresa en términos de la desviación estándar (s). Otra forma de expresar la precisión es la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (cv).[45, 46]

La precisión tiene en cuenta algunos factores:

- **Repetitividad:** es una variación en las mediciones llevadas a cabo por un solo analista y hechas con el mismo instrumento de medición en un intervalo de tiempo corto. La variación se presenta alrededor de la media, puede ser pequeña en relación a la variación en el procedimiento.[6, 47]

- **Reproducibilidad**: es la variación que se presenta entre las medias de las mediciones realizadas por varios operadores o analistas usando el mismo instrumento. Revela la exactitud o similitud entre los resultados de distintos laboratorios.[48]

- **Exactitud**

Es la proximidad que se manifiesta entre el valor obtenido experimentalmente y el valor real, es expresada en términos de error.[39] La exactitud se haya mediante el análisis de una muestra de concentración conocida y es comparada con el valor del promedio en relación al valor real.[49]

- **Recuperación**

Se presenta como el porcentaje rescatado de una concentración conocida de un estándar adicionado a una muestra; permite detectar la presencia de interferencias en la muestra o si hay un efecto matriz. Refleja la exactitud del método.[50]

4.1.3.3. Datos anómalos: en una serie de mediciones, uno o más resultados pueden diferir enormemente de los otros. Técnicamente, una observación no debe retirarse a menos que una investigación halle una causa probable para justificar esta acción. En algunos casos el resultado erróneo puede atribuirse a un error humano, y en la práctica, se permite rechazar el resultado. Si en la investigación no se encuentra una causa probable, se debe realizar un análisis de datos con y sin el valor atípico.

Si las conclusiones son diferentes, entonces se considera que el valor atípico tiene influencia y esto debería indicarse en el informe. Otra opción, es utilizar estimadores rigurosos para caracterizar los grupos de datos. En los estudios ambientales, las concentraciones extremadamente altas y bajas de contaminantes pueden indicar problemas por interferencias que no deben ser rechazados arbitrariamente. [51]

Dos de las pruebas estadísticas utilizadas con mayor frecuencia en un grupo de datos son la prueba de Dixon y la prueba de Grubbs:

- *La prueba de Dixon* utiliza relaciones de las diferencias entre datos que parecen atípicos comparados con los valores del grupo de datos.
- *La prueba de Grubbs* utiliza una estadística de prueba, T, que es la diferencia absoluta entre el valor atípico, X_O, y el promedio de la muestra (X) dividida por la desviación estándar de la muestra, s.

Estas dos técnicas se diseñaron para detectar un único valor anómalo en un grupo de datos.[51]

4.1.3.4. Gráficos de control (SHEWHART): en la validación de un método analítico como se mencionó antes se determina la exactitud y la precisión, lo cual asegura la trazabilidad de los resultados proporcionados por el método analítico con respecto a un Material de referencia, o a ejercicios interlaboratorio, que no siempre se realizan con frecuencia.

Para asegurar sistemáticamente la trazabilidad de los resultados, una de las herramientas más utilizadas en los laboratorios son los gráficos de control.

Las cartas o gráficos de control que se establecen para los estándares de control, reflejan el desempeño de los métodos, además, permiten especificar límites de control definidos estadísticamente. La carta de control que se aplica en el laboratorio es la de la carta de promedio para estándares.

Se construyen a partir de la media y la desviación estándar de un número especificado de mediciones del analito de interés: El gráfico incluye niveles de advertencia superior e inferior y superior y de control inferior y superior. La práctica común es usar 2s para el límite de advertencia y Límites 3s de control donde s, representa desviación estándar.[52]

Estos valores se derivan de los valores medidos del estándar y el número de mediciones (n), utilizado para determinar desviación el estándar estimado (s) con los límites de confianza del 95% para advertencia y 99% para el límite crítico.[52]

4.1.3.5. Incertidumbre en la medicion: en la Guía Eurachem define la incertidumbre como un parámetro asociado al resultado, es decir, que expresa un intervalo de posibles valores que se pueden atribuir razonablemente al analito. La incertidumbre es una forma de expresar que no existe un solo valor para el mensurando sino un número infinito de valores que se encuentran dispersos alrededor del resultado.[53, 54]

Es un requisito de la norma ISO/IEC 17025: 2005 que para un método validado o verificado se realice la determinación de las diferentes fuentes de incertidumbre presentes en la medición.[55, 64,]

- **Etapas para la estimación de la incertidumbre**

Las siguientes son las etapas a seguir en el laboratorio para la estimación de la incertidumbre:

- Especificación del mesurando
- Identificación de las fuentes de incertidumbre
- Cuantificación de los componentes de la incertidumbre
- Cálculo de la incertidumbre combinada

- **Especificación del mesurando:** en la práctica, la especificación del mesurando, depende de la exactitud requerida de la medición. Este debe definirse con mucha exactitud, de manera que su valor sea único para el fin deseado. Cuando la definición del mesurando es incompleta, su incertidumbre puede ser grande que debe incluirse en la estimación total de la incertidumbre. Por lo tanto se debe selección la metodología adecuada para la determinación del analito.[56]

- **Identificación de las fuentes de incertidumbre:** El resultado de la incertidumbre en la práctica puede estar atribuida a varia fuentes como:

- Muestreo. (Cuando corresponde).
- Condiciones de almacenamiento.
- Efectos atribuibles a los instrumentos de medición
- Pureza de los reactivos.
- Condiciones ambientales
- Efectos de la muestra (matriz).
- Volumen de reactivos y muestra
- Efectos atribuibles al operador
- Errores aleatorios.

- **Cuantificación de los componentes de la incertidumbre**

No todos los componentes de incertidumbre contribuyen significativamente a la incertidumbre combinada, por lo tanto el primer paso que se debe hacer es estimar la contribución de cada componente de la incertidumbre combinada, eliminar aquellas que no son significativas y agrupar las fuentes individuales de incertidumbre cuyos valores se puedan combinar dentro de una fuente característica más global que contribuya parcialmente a la incertidumbre total del resultado. Existen cuatro procedimientos mediante las cuales pueden estimarse las componentes individuales:

- Mediante trabajo experimental por el laboratorio que realiza los análisis.
- Uso de mediciones en materiales de referencia.
- Por utilización de los datos y resultados de trabajos previos realizados en el laboratorio.
- usando el juicio del analista basado en la experiencia

Molina S; Estandarización de Métodos de Análisis. TESIS DE GRADO. USTA; 2010.

- **Cálculo de la incertidumbre combinada:** Después de la estimación de los componentes individuales de incertidumbre, se combinan las incertidumbres estándar.

- **Incertidumbre estándar**: Es la incertidumbre del resultado de una medición expresado como una desviación estándar

- **La Incertidumbre estándar combinada:** Es el valor de la incertidumbre calculada para un grupo de fuentes individuales relacionadas aplicando la ley de propagación de incertidumbres.

- **La incertidumbre combinada expandida:** provee un intervalo dentro del cual, el valor de la medición es dado con un alto nivel de confianza. La incertidumbre expandida es obtenida multiplicando la incertidumbre estándar combinada por un factor *k*. La elección del factor *k* es en el nivel de confianza deseado (para un nivel de confianza del 95%, *k* es 2).

$$\boldsymbol{U_{EXP.MET}} = \pm K * U_{Ctotal} \qquad Donde\ K\ es\ el\ factor\ de\ cobertura\ (k = 2)$$

- **Incertidumbre expandida U en la medición:**

$$\boldsymbol{U} = \pm\ C * U_{EXP.MET} = C * 2 * U_{Ctotal}$$

La incertidumbre expandida se requiere para expresar el intervalo en el cual se espera encontrar una gran fracción de la distribución de valores que razonablemente se podrían atribuir al mesurando. El factor de cobertura K, depende del nivel de confianza requerido. Para este procedimiento se utiliza un factor K igual a 2 para un nivel de confianza del 95%.

4.2. MARCO DE ANTECEDENTES

4.2.1. Antecedentes: EL CEPIS (Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales), efectuó la evaluación de aproximadamente 49 laboratorios de Latinoamérica y 44 vinculados al GEMS/AGUA, un programa de las naciones unidas. El CEPIS[69] reveló una gran inconformidad en la calidad de los resultados analíticos que se obtuvieron en la determinación de diferentes parámetros en muestras de agua. Los resultados obtenidos presentaron errores relacionados con el sistema debido a que, no se llevó a cabo una revisión y confirmación de la eficacia y efectividad en los datos que probara que estos eran confiables y verdaderos.[57,]

En el mundo entero, incluyendo en los países latinoamericanos, ha aumentado la preocupación por la calidad del agua como recurso hídrico esencial para consumo humano. Es imprescindible que los laboratorios ambientales que prestan sus servicios, realicen y mantengan un programa de muestreos y mediciones para el reporte de resultados pertinentes para la toma de decisiones importantes y eficientes.

Con la expedición de la ley 99 de 1993, se crearon y transformaron las autoridades ambientales regionales llamadas “las autoridades ambientales regionales, denominadas: Corporaciones Autónomas Regionales, como entes corporativos de carácter público. Estas autoridades manifiestan una preocupación frente a la fiabilidad de los resultados emitidos por un laboratorio de análisis porque son quienes administran dentro del área de jurisdicción los cuidados del recurso hídrico (agua), de conformidad con las disposiciones legales y las políticas establecidas del Ministerio del Medio Ambiente.[58]

A finales de los años 60 era muy escaso el conocimiento que se tenía con respecto a la necesidad de generar un control de la calidad analítica en los

estudios de agua, en 1967 se creó el comité de validación de métodos y de control de la calidad analítica por la *"Federal Water Pollution Control Adminitration (FWPCA)"* actualmente laboratorio ambiental asociado a la *"Environmental Protection Agency (EPA)"* quien desde 1970 ha estado trabajando para desarrollar y hacer cumplir normas o reglamentos que implantan leyes ambientales establecidas en el congreso, a su vez, responsable en la investigación y establecimiento de estándares nacionales para una diversidad de programas ambientales y da la delegación a estados y tribus, las responsabilidades para otorgar permisos, supervisar y hacer cumplir los acatamientos.[59]

Cuando los estándares no son cumplidos, la EPA emite sanciones y toma medidas para conceder a estados y tribus los niveles de calidad ambiental.[60]

En 1971 *el "Handbook For Analytical Quality Control in Water and Wastewater Laboratories"* mencionó los factores que pueden interferir en la veracidad y calidad de los resultados de los análisis de agua, debido a que estos son de gran importancia y utilidad para los laboratorios al momento de comprobar y evaluar la eficacia de sus resultados. Sin embargo, existen manuales de procedimientos analíticos para aguas y efluentes como el Standard Methods For The An alysis of Water and Wastewater con métodos analíticos desarrollados y adaptados por profesionales a los laboratorios con varios años de experiencia en la realización de análisis en calidad de aguas y efluentes. Actualmente, se sigue incorporando información pertinente con el fin de enriquecer los procedimientos que existen hasta hoy para el estudio de la calidad del recurso hídrico mediante métodos analíticos.[61, 70]

La guía Eurachem del Reino Unido define 6 aspectos importantes en el desarrollo de las "nuevas prácticas de laboratorio", que en unión conforma la mejor de las practicas. Todos los laboratorios analíticos están obligados a seguir los 6 principios básicos de las buenas prácticas de mediciones analíticas:

1. "Las mediciones analíticas deben ser realizadas de acuerdo a requerimientos acordados con el propósito definido".
2. "Las mediciones analíticas deben ser realizadas usando métodos y equipos que han sido probadas para asegurar que son adecuadas para el propósito de la medición".
3. "El personal que realiza las mediciones analíticas debe ser calificado y competente para llevar a cabo sus tareas".
4. "Debe haber regularmente una evaluación independiente del desempeño técnico del laboratorio".
5. "Las mediciones analíticas efectuadas en un lugar deben ser consistentes con aquellas efectuadas en cualquier otro lugar".

6. “Las organizaciones que realizan mediciones analíticas deben tener perfectamente definidos procedimientos de aseguramiento y control de calidad”.

Estos principios son realmente importantes tanto para los laboratorios que trabajan de forma aislada, como para aquellos que generan resultados que necesiten ser comparados con los ob tenidos por otro laboratorio.[62]
La validación de un método es un requisito fundamental en la práctica del análisis químico. Sin embargo, para los químicos analíticos su importancia, es decir, por qué debe hacerse, cuándo, y que se necesita para hacerse, es deficiente. En la literatura técnica existe una amplia información relacionada con la validación de métodos, en lo que concierne a métodos específicos. Muchos analistas creen que la validación de métodos solo debe efectuarse para la colaboración a otros laboratorios, por tanto, no se realizan.[62]

4.3. MARCO LEGAL

El uso de los parámetros nitratos, nitritos, ortofosfatos y nitrógeno amoniacal en términos de calidad del recurso hídrico (agua), para consumo humano, manejo de residuos líquidos, se encuentran descritos en la normatividad vigente. (Ver tabla 3).

En Colombia los criterios de calidad del agua para consumo Humano se encuentran descritos en la resolución 2115 de 2007 y el decreto 1594 de 1984., que sigue vigente aunque ya se expidió el decreto 3930, que busca actualizar los criterios de calidad para los diferentes usos.

Cuadro 1. Legislación colombiana y parámetros de nitratos, nitritos, ortofosfatos y nitrógeno amoniacal como criterios de calidad del recurso hídrico.

PARÁMETROS	**LEGILACION COLOMBIANA**	
	Decreto 1594 de 198	**Resolución 2115 de 2007**
NITRATOS	**Artículos 38 y 39:** criterios de calidad admisibles para la destinación del recurso humano y doméstico: Nitratos 10 mg N /L. **Artículo 41:** criterios de calidad admisibles para la destinación del recurso para uso pecuario: Nitratos 100mg/L.	**Artículo 6:** implicaciones en la salud humana. Valor máximo aceptable 10mg NO_3 /L.

Cuadro 2. (Continuación)

NITRITOS	**Artículos 38 y 39:** criterios de calidad admisibles para la destinación del recurso humano y doméstico Nitritos 1, 0mg/L. **Artículo 41:** criterios de calidad admisibles para la destinación del recurso para uso pecuario: Nitritos 10 mg N /L.	**Artículo 6:** implicaciones en la salud humana. Valor máximo aceptable 0.1 mg NO_2/L
O**RTOFOSFATOS**	**Artículo 42:** El nitrógeno y el fósforo deberán estar en proporción que no ocasión eutrofización.	**Artículo 7**: Características químicas que tienen consecuencias económicas e indirectas sobre la salud humana, valor máximo aceptable: 0.5 mg PO_4/L
NITROGENO AMONIACAL	**Artículos 38 y 39:** criterios de calidad admisibles para la destinación del recurso humano y doméstico amoniaco 1.0 mg/L. **Artículo 49.**	**NA**

FUENTE: Colombia. Ministerio De Salud, Ministerio De La Protección Social, Ministerio De Ambiente, Vivienda Y Desarrollo Territorial.

5. DISEÑO METODOLOGICO

5.1 EQUIPO, MATERIALES Y REACTIVOS

Los materiales y equipos de laboratorios utilizados en la determinación de nitritos, nitratos, ortofosfatos y nitrógeno amoniacal se encuentran relacionados en el anexo 1.

5.1.2. Verificación de equipos y material de vidrio volumétrico

5.1.2.1 Equipos: todos los equipos utilizados en esta validación, fueron calibrados de acuerdo con el programa de calibración donde se establece la periodicidad requerida por el equipo**.** Las calibraciones se realizaron con entidades acreditadas por el organismo nacional de acreditación en Colombia ONAC. La entidad acreditada realiza el servicio de calibración respectivo con materiales de referencia calibrados y teniendo en cuenta las normas metrológicas establecidas para tal fin.

5.1.2.1 Material de vidrio volumétrico: el material de vidrio utilizado se lavó de acuerdo a las indicaciones descritas en cada protocolo. La verificación del material volumétrico se realizó internamente en el laboratorio aplicando las directrices para verificación de material volumétrico indicadas en las instrucciones de calibrado BLAUBRAND – septiembre de 2013. (Ver anexo 2).

5.2. METODOLOGÍA ANALITICA UTILIZADA EN LA VALIDACION

Para la determinación de nitritos se utilizó el método colorimétrico de Shinn, (SM 4500 – NO_2), fosfatos método colorimétrico del ácido ascórbico, (SM 4500 – P-E), nitrógeno amoniacal por el método destilación titulación (SM 4500 – NH_3 B-C) referenciados en el Standard Methods for the examination and water andwastewater APHA-AWWA-WPCF edición 22 de 2012 y para nitratos[66] el método del Salicilato de sodio descrito en el libro análisis de las aguas de J. Rodier de 1998.

5.2.1. Tratamiento de las muestras: las muestras de aguas recolectadas para los parámetros de Nitritos y nitratos fueron refrigeradas a 4°C ; para ortofosfatos y nitrógeno amoniacal la muestra fue preservada con ácido sulfúrico concentrado y refrigeradas a 4°C . Para los análisis colorimétricos se eliminaron los sólidos

suspendidos filtrando la muestra a través de un filtro de membrana de 0,45µm de diámetro de poro. Todas las muestras incluyendo blancos, estándares, duplicados y adicionados, siguieron el siguiente procedimiento:

5.2.2. Determinación de Nitritos: se ajustó el pH de la muestra filtrada de manera estuviera entre 5 y 9, adicionando HCl 1N o NH_4OH y se tomaron 25,0 ml de muestra en un balón volumétrico a los cuales se les adicionó 1 ml de reactivo de coloración agitándose varias veces por inversión. Las lecturas de absorbancia se realizaron entre los 10 y 30 minutos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 543 nm.

5.2.3. Determinación de Nitratos: Se tomaron 10 ml de muestra filtrada en un en un vaso de precipitado de 50ml, se adicionó 1 ml de solución de salicilato sódico al 5% y se llevó a sequedad en un baño maría manteniendo la temperatura entre 80 y 95 °C. Se dejó enfriar y el residuo se disolvió con 2 mililitros de ácido sulfúrico concentrado que se dejó en reposo por 10 minutos. Se adicionaron 15 ml de agua destilada y 15 ml de solución de hidróxido de sodio y tartrato doble de sodio y potasio se agitó suavemente desarrollándose una coloración amarilla estable por 40 minutos, tiempo en el cual se realizaron las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm.

5.2.4. Determinación de Nitrógeno amoniacal: para el análisis de nitrógeno amoniacal se eliminaron interferencias destilando la muestra. Se tomaron 50 ml de muestra en un tubo de destilación al cual adicionó 2.5 mL de solución tampón de borato y 3 gotas de solución indicadora de fenolftaleína. Se ajustó el pH a 9.5 mediante adición de hidróxido de sodio 6N. La muestra fue sometida a destilación y el destilado (aproximadamente 100 ml) se con solución estandarizada de H_2SO_4 0,02 N.

5.2.5. Determinación de Ortofosfatos: se tomaron 25 ml de muestra filtrada en un vaso de 50 mL, se adicionó 1 gota de indicador de fenolftaleína seguido de una solución H_2SO_4 5N gota a gota hasta que desapareciera la coloración roja en el caso que se formara. Se adicionaron 4 ml de reactivo combinado y se mezcló suavemente. La lectura se realizó entre los 20 y 30 minutos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de a 880 nm. La preparación de los reactivos usados en cada una de las metodologías analíticas se encuentra descrita en el anexo 3.

5.3. DESARROLLO DE LA VALIDACION

Se siguió el procedimiento de metodologías analíticas del laboratorio de SIAMA LTDA y el Protocolo para estandarización de métodos analíticos del IDEAM.
La determinación de nitritos, nitratos y ortofosfatos en aguas se lleva a cabo por espectrofotometría empleando un espectrofotómetro Hach modelo DR 3900 con un rango de longitud de onda de 400 a 900 nm. La determinación de nitrógeno amoniacal se realizó por el método de titulación previa destilación, utilizando un destilador de nitrógeno marca Velp y una Bureta Digital marca Brand.

5.3.1. Verificación de las condiciones análisis

5.3.1.1. Barrido de longitud de onda: se realizó un barrido espectral en el rango de longitud de onda a una solución de concentración estándar de 0,1 mg NO_2^- -N /L, 1,0 mg NO_3-N /L y 0,5 mg PO_4^{-3}-P/L para ortofosfatos en el espectrofotómetro Hach DR 3900 utilizando celdas de vidrio de 2,5 cm , con el fin de establecer la longitud de onda en la cual la solución registra su máxima de absorción. Se construyeron los gráficos de absorción para cada complejo, en donde se observa la longitud de onda de máxima absorción.

5.3.1.2. Estabilidad del complejo para métodos colorimétricos: para determinar la estabilidad del complejo con respecto al tiempo para los métodos, se prepararon estándares de concentración de 0,1 mg NO_2^- -N /L, 1,5 mg NO_3-N /L y 0,5 mg PO_4^{-3}-P/L. Se registraron los valores a absorbancia a diferentes tiempos para los métodos colorimétricos. Se eligieron los tiempos en que los complejos presentaban mayor estabilidad

5.3.2. Pre – validación

5.3.2.1. Determinación del rango lineal: para determinar el rango lineal en los métodos colorimétricos se prepararon y analizaron estándares que cubrieran el rango establecido para cada método. Para la determinación de nitritos se prepararon estándares de 0,05 a 0,25 mg NO_2^-N/L, para nitratos de 0,1 a 3 mg NO_3^- N/L y para ortofosfatos de 0,025 a 1,0 PO_4^- -P/L. Las curvas se prepararon cuatro veces y se evaluó intervalo lineal, la linealidad y la sensibilidad del método. Solo se aceptaron las curvas de calibración que presentaron un coeficiente de correlación ≥ 0.995.

5.3.2.2. Determinación Límite de detección del método (LDM): para la estimación límite de detección del método y el límite de detección instrumental, se analizaron 14 blancos en la curva seleccionada para cada método y se calculó el promedio y la desviación estándar de los mismos. Posteriormente, teniendo en cuenta la siguiente ecuación, se calcularon los límites de detección:

$$LDI = 1{,}645 \ * S$$

$$LDM = C_{EB} + \ t_{n-1} * S$$

Dónde:
C_{EB} = Concentración próxima al LDM estimado

- t = **Valores de la distribución t (99%) para calcular LDM (Ver anexo 4)**

5.3.2.3. Límite de cuantificación del método (LQ): teniendo en cuenta el límite de detección del método, se prepararon estándares de concentraciones cercanas o iguales al límite de detección calculado. Se seleccionó la concentración más baja, que leída 14 veces, presentó una exactitud y un coeficiente de variación < 10%.

5.3.2.4. Rango de aplicación: una vez determinada la linealidad de la curva de calibración para los métodos colorimétricos y el límite de cuantificación se determinó el rango aplicación. El rango de aplicación para el método de nitrógeno amoniacal se determinó teniendo en cuenta límite de cuantificación y volúmenes de acuerdo al rango de concentración como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3. Volúmenes de acuerdo al rango de concentración en la determinación de Nitrógeno Amoniacal.

mg NH_3/L	**Volumen**
0,5 – 25	50
30 – 80	25
Mayores de 80	10

Fuente: Estándar Métodos, 2010

5.3.2.5. Sensibilidad

Se calculó como:

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

Dónde:
m, es la pendiente de la curva de calibración.

5.4. VALIDACIÓN

Se analizó el siguiente grupo de muestra para cada método:

- **Bk =** Blanco de reactivos.
- **E.b =** Estándar de concentración baja.
- **E.m =** Estándar de concentración media; aproximadamente 50% del rango de la curva de calibración.
- **E.a =** Estándar de concentración alta; aproximadamente 90% del rango de la curva de calibración.
- **Mb =** Muestra natural de concentración < 50% del rango de la curva de calibración.
- **Ma =** Muestra natural de concentración >> Mb.
- **MbA.b =** Mb adicionada con un nivel bajo de analito
- **MbA.a =** Mb adicionada con un nivel alto de analito.

Se hizo un duplicado para cada muestra durante cada ensayo, completando un total de 16 muestras diarias.

5.4.1. Precisión y exactitud instrumental: para determinar la precisión del Espectrofotómetro y de la bureta digital, se prepararon y analizaron para cada variable estándares de concentración alta, media y baja.

Tabla 4. Estándares preparados durante la validación de los métodos analíticos de nitratos, nitritos, nitrógeno amoniacal y ortofosfatos.

Parámetro	Estándar		
	Bajo	**Medio**	**Alto**
Nitritos	0,01	0,1	0,2
Nitratos	0,20	1,0	2,0
Ortofosfatos	0,05	0,5	0,8

Tabla 4. (Continuación)

Nitrógeno amoniacal	1,0	5,0	80

Fuente: autora

5.4.2. Precisión y exactitud del método: Se prepararon muestras de concentración baja de aguas superficiales y de concentración alta de aguas residuales. A la muestra baja, se le adicionó dos cantidades conocidas de analito de manera que se obtuvieran puntos de concentración por debajo y por encima del punto medio de la curva de calibración, con el fin de comprobar el rendimiento en distintos niveles de concentración. La adición se realizó de manera que el volumen no aumentara en más de un 5%.

5.4.2.1. Cálculo para Precisión: Se Calculó la desviación estándar (S), el promedio y la precisión en términos de coeficiente de variación (CV) para cada analito tomando todos los datos de los 7 ensayos (14 datos).

Ecuación de desviación estándar:

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

La precisión expresada como coeficiente de variación aceptado en el laboratorio es <10%.

5.4.2.2. Cálculo para Exactitud

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

Los resultados no deben exceder el 10% del valor verdadero

5.4.3. Porcentaje de Recuperación: Se Calculó el %R para cada nivel de concentración adicionado. Se calculó la recuperación para estándares y la recuperación para muestras reales. Se reportó la recuperación media, el rango de %R y su desviación estándar.

La recuperación sobre muestras reales se calculó así:

$$\%R_M = \frac{C_{MA} - C_M}{C_A} \; x\, 100$$

CMA = Medida de la concentración en la muestra adicionada
CM = concentración promedio de la muestra no adicionada
CA = Concentración conocida adicionada a la muestra
El porcentaje de recuperación aceptado en el laboratorio es del 85 al 115 %.

Cuadro 2. Selección y preparación de muestras fortificadas para la validación de los métodos analíticos de nitratos, nitritos, nitrógeno amoniacal y ortofosfatos

PARÁMETRO	MB	MA	Estándar mg/L	Adición mL	MBAB mg/L	Adición mL	MBAA mg/L
Nitritos	~0,025	~ 0.11	50	1,0	~ 0,075	2,0	~ 0,125
Nitratos	~ 0,30	~ 1,88	100	3,0	~ 0,6	5,0	~ 0.800
Ortofosfatos	~ 0,24	~ 0,70	50	6,0	~ 0,54	10	~ 0,74
N. Amoniacal	~ 4,70	~ 48,0	1000	5,0	~ 9,70	10	~ 14,7

Fuente: Autora

Las muestras fueron tomadas en los muestreos rutinarios de siama ltda limite utilizando el manual de procedimiento toma de muestras diseñado por el laboratorio.

5.4.4. Origen de las muestras seleccionadas: en el cuadro 3 se especifica el origen de las muestras que fueron seleccionadas para la validación de cada método analítico.

Cuadro 3. Origen de las muestras seleccionadas para la validacion

TIPO DE MUESTRA	NITRITOS (NO_2)	NITRATOS (NO_3)	NITROGENO AMONIACAL (NH_3)	ORTOFOSFATOS (PO_4)
Muestra de concentración baja	Rio de oro antes de la confluencia con el Rio Suratá (RO-01)		Quebrada Chimitá antes de la confluencia con el	Rio de Oro antes de la confluencia

TIPO DE MUESTRA	NITRITOS (NO_2)	NITRATOS (NO_3)	NITROGENO AMONIACAL (NH_3)	ORTOFOSFATOS (PO_4)
			Rio de Oro (CA-01-1)	con el Rio Frío (R-04)
Muestra de concentración Alta	Efluente de la Planta de Tratamiento POSTOBON			

Fuente: Autora

5.4.5. Rechazo de datos: se Calculó el T estadístico para los valores extremos de cada grupo (máximo y mínimo), de la siguiente manera:

- Calcular x_{prom} y s
- Calcular T como:

$$T = (x_{alto} - x_{prom})/s \text{ para un valor alto}$$
$$T = (x_{prom} - x_{bajo})/s \text{ para un valor bajo}$$

Si el T calculado es mayor que el T de tablas para un nivel de confianza del 95% y n mediciones, el dato se rechaza (Ver anexo 4). NOTA: Se pueden rechazar como máximo dos datos; si la aplicación del criterio de rechazo da positiva para más de dos datos, el ensayo debería repetirse.

5.4.6. Carta de Control del método. con los datos obtenidos para el estándar de concentración media de cada uno de los parámetros validados se construyó la carta de control, con el fin de asegurar la trazabilidad del método, donde se establecieron los límites de advertencia superior e inferior (±2*s*) y los límites de control superior e inferior (±3*s*) del método.

5.5. METODOLOGÍA PARA EL CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE

5.5.1. Metodología aplicada para el cálculo: la metodología utilizada se fundamentó en la estimación de la incertidumbre basada en la contribución de las fuentes resultados de la validación indicado en Guía CG-4 Eurachem – CITAC y en el manual para estimación de la incertidumbre en las mediciones del Laboratorio de SIAMA LTDA.

5.5.2. Especificación del Mensurando

5.5.2.1. Métodos espectrofotométricos (Nitritos, nitratos y ortofosfatos): Para la determinación de nitritos se utilizó el método colorimétrico de Shinn, (SM 4500-NO_2), fosfatos método colorimétrico del ácido ascórbico, (SM 4500 – P-E), referenciados en el Standard Methods for the examination and water andwastewater APHA-AWWA-WPCF edición 22 de 2012 y para nitratos el método del Salicilato de sodio descrito en el libro análisis de las aguas de J. Rodier de 1998.

5.5.2.2. Método de destilación- titulación: Nitrógeno Amoniacal: se utilizó el procedimiento descrito en el estándar métodos 4500 NH3-B, edición 22 de 2012.

5.5.3 Identificación de las fuentes de incertidumbre

U_1= Incertidumbre estimada con datos de validación - Fuentes aleatorias: Incertidumbre estimada con datos de validación – Fuentes aleatorias (U_1) o RSD_t. La cuantificación de este tipo de contribución, se obtuvo utilizando los resultados del análisis de las muestras reales de dos niveles de concentración, bajo y alto obtenidos durante el proceso de su validación.

Con los resultados del análisis de muestras reales Mb y Ma obtenidos durante el proceso de validación del método analítico, se calculó el coeficiente de variación "CV" (desviación estándar relativa RSD) en cada nivel de concentración así:

$$CV_{mb} = \frac{S_{mb}}{XP_{mb}} \qquad \& \qquad CV_{ma} = \frac{S_{mb}}{XP_{ma}}$$

Donde:

CV = Coeficiente de variación o desviación estándar relativa de los resultados de la muestra Ma o Mb
S = Desviación estándar de los resultados de las muestras Mb Y Ma
Xp = Promedio de los resultados de las muestras Ma y Mb

Se calculó la desviación estándar relativa total RSDt los dos niveles de concentración de las muestras) aplicando la siguiente fórmula:

$$RSD_t = \sqrt{\frac{[(CV1)^2 * (n_1 - 1)]1 + [(CV2)^2 * (n_2 - 1)]2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}}$$

Donde:
CV_1 = Coeficiente de variación del grupo # 1 de datos
n_1 = Número de mediciones del grupo # 1 de datos
CV_2 = Coeficiente de variación del grupo # 2 de dato
n_2 = Número de mediciones del grupo # 2 de datos

U_2 = Incertidumbre estimada con datos de validación – fuentes sistemáticas:

Evaluada con la muestra adicionada de mayor rango en la recuperación.

$$U_{Rp} = \frac{S_{Rp}}{\sqrt{n}}$$

Donde:
S_{Rp} = desviación estándar de las mediciones.
n = número de mediciones realizados en la recuperación.

Para evaluar la recuperación, se realizó prueba t de student, en la cual se comparó el t calculado con t crítico para n-1 grados de libertad (n es el número de mediciones realizadas) y un nivel de confianza aproximado del 95% con el valor del t calculado de la siguiente manera:

$$t_{Cal} = \frac{1 - R_p}{U(Rp)}$$

Se Buscó el t-Student teórico en el anexo 4 para grados de libertad (*gl*) con un 95% de confianza.
Si el tcalc > tcrit, la incertidumbre en la recuperación se corrigió aplicando la siguiente ecuación:

$$U(Rp)_{corr} = \sqrt{(U(Rp))^2 + (\frac{1 - Rp}{K})^2}$$

Si tcal < tcrit, no se aplicó factores de corrección, siendo K = 2 factor de cobertura

U_3 = Fuentes relacionadas con medidas volumétricas:

Consideraciones generales: Las siguientes son las consideraciones utilizadas para realizar la estimación de la incertidumbre:

- Los datos del material volumétrico utilizado (clase, volumen, tolerancia y desviación estándar), los volúmenes utilizados y las diluciones son los de uso más frecuente en el laboratorio.

- Los valores de la desviación estándar correspondientes a la verificación del material volumétrico utilizado se obtienen con base en los cálculos de verificación de material volumétrico realizada en el laboratorio (Ver anexo 2).

Tabla 5. Incertidumbre de la alícuota (U_{al}) y el volumen final de aforo -U_{af}

Fuente de Incertidumbre	Cálculo de la incertidumbre estándar
Tolerancia (T) del material volumétrico utilizado, reportado en su certificado o grabado sobre su superficie.	$u1 = T / (3)^{1/2}$
Efecto de la diferencia (X) entre la temperatura ambiente y la temperatura de calibración del material volumétrico (de volumen Y) utilizado.	$u5 = [X * Y * 2*10^{-4}] / (3)^{1/2}$
Dispersión (s) de las mediciones volumétricas (medidas repetidas del volumen del material volumétrico usado).	$u6 = s / (n)^{1/2}$

$2E^{-4}$ = coeficiente de expansión del agua
Fuente: autora

La cuantificación de la incertidumbre combinada (U_{comb}) y la incertidumbre expandida del método (U_{exp}) se calculó así:

$$U_{Comb} = \sqrt{(RSDt)^2 + (U2)^2 + (U3)^2}$$

$$U_{Exp} = 2 * U_{Comb}$$

5.6 AJUSTE AL PROTOCOLO RUTINARIO

Las modificaciones pertinentes al procedimiento técnico, se realizaron en el manual de procedimientos técnicos del laboratorio y son de carácter confidencial.

5.7. EVALUACION DE DESEMPEÑO INTERLABORATORIO

Los programas interlaboratorios realizados por el IDEAM se llevan a cabo con el objetivo de determinar el desempeño de los laboratorios que participan en los análisis y hacen seguimiento de su continuo desempeño. Estos programas también son usados por los laboratorios participantes, para identificar oportunidades de mejora, establecer la efectividad y el grado de comparación cuando se implementan nuevos métodos, además de demostrar la capacidad de medición. Como se mencionó anteriormente, es un requisito que el laboratorio participe en los parámetros que pretende acreditar para poder obtener dicha acreditación.

En la evaluación del desempeño interlaboratorio programado por el IDEAM, se incluyeron las variables de nitritos, nitratos, nitrógeno amoniacal y fosfatos, estos fueron evaluados usando la metodología descrita en la Norma NTC 5755 "Métodos estadísticos para utilizar en los ensayos de aptitud mediante comparaciones interlaboratorios", se utilizó el índice Z score como:

$$z = \frac{(x - X)}{s}$$

Donde:
x= resultado reportado por el laboratorio Para la respectiva prueba
X = valor de referencia
S = desviación estándar o valor estimado de la variabilidad**.**

Si el Z Score absoluto es menor de 2 el resultado se considera satisfactorio. En la tabla 7 se presentan los rangos usados por el IDEAM para identificar el nivel de desempeño del laboratorio.[63]

Tabla 6. Rangos de Z Score

Z Score	Puntos asignados	Desempeño	Puntaje
Menor o igual a 1	5	Satisfactorio	100
Entre 1.01 y 2.00	4	Satisfactorio	80
Entre 2.01 y 2,99	3	Cuestionable	60
Mayor o igual a 3,0	0	Insatisfactorio	0

Fuente: Rangos asignados para pruebas de desempeño

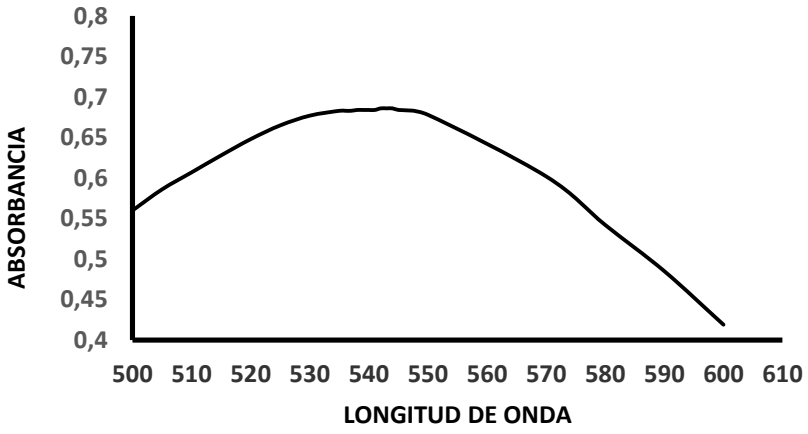
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. NITRITOS

6.1.1. Verificación de las condiciones de análisis: Se verificaron las condiciones de análisis establecidas en la literatura como: barrido de longitud de onda y estabilidad del complejo con respecto al tiempo.

6.1.1.1. Barrido de la longitud de onda: En el espectro se observa que el complejo azo formado absorbe a una longitud de onda de 543nm (Ver figura 3), como lo establece el procedimiento descrito en el estándar método. Por lo tanto, los estándares y muestras se corrieron en esta longitud de onda.

Figura 3**.** Espectro obtenido en el barrido de longitud de onda para Nitritos

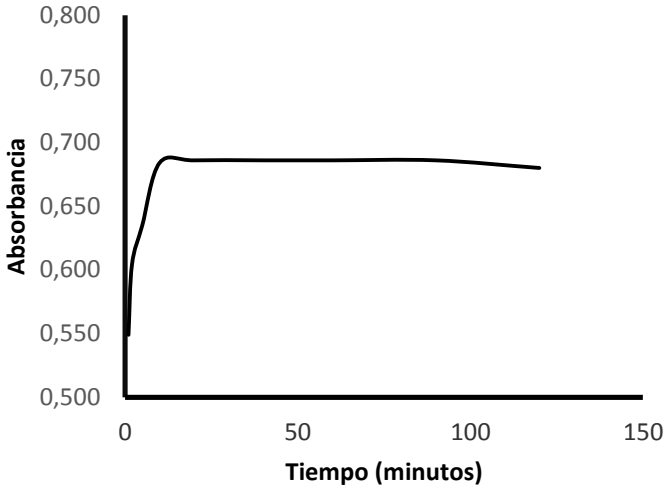


Fuente: autora.

Las Absorbancias obtenidas en el barrido de longitud de onda en la validación de nitritos se encuentran registradas en el anexo E.

6.1.1.2. Estabilidad del complejo

Figura 4. Estabilidad del complejo de diazonio para el método de nitritos



Fuente: autora

Los resultados obtenidos sobre la estabilidad del complejo de diazonio con respecto al tiempo, muestran que las absorbancias permanecen constantes entre 20 y 120 minutos, lo que demuestra estabilidad del complejo de diazonio por lo cual, se determina que las lecturas pueden realizarse en este lapso de tiempo.

6.1.2 Pre – validación: Una vez fueron verificadas las condiciones analíticas establecidas en la literatura se inició la pre validación.

6.1.2.1. Evaluación de la linealidad, sensibilidad y rango aplicación del método: se elaboraron 4 curvas de calibración usando una solución estándar de nitrito, trazable marca Merck. Se seleccionó la curva que presentó mejor coeficiente de correlación (≥0,995) en este caso la curva número cuatro (ver tabla 6) por presentar un coeficiente de correlación r de 0,9999 (r^2 = 0,9998).

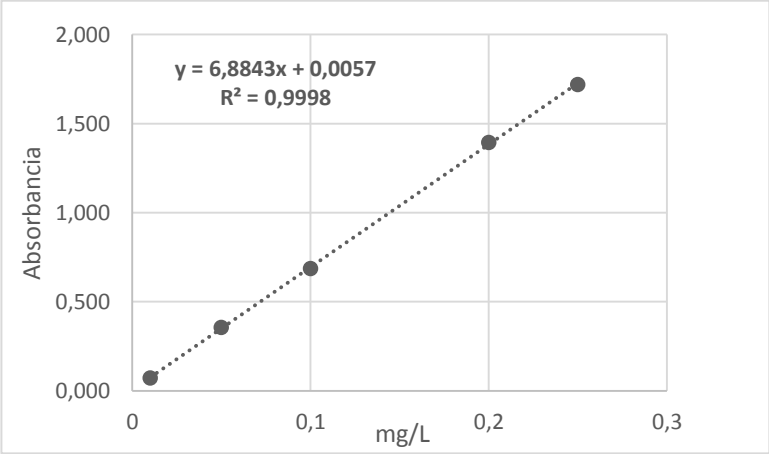
Tabla 7. Curvas de calibración elaboradas en la pre-validación de nitritos.

Estándar	Abs. Curva 1	Abs. Curva 2	Abs. Curva 3	Abs. Curva 4	Curva de trabajo
0,01	0,068	0,071	0,073	0,072	**0,072**
0,05	0,345	0,354	0,354	0,356	**0,356**

0,1	0,549	0,687	0,691	0,686	**0,686**
0,2	1,29	1,402	1,301	1,395	**1,395**
0,25	1,679	1,69	1,687	1,719	**1,719**
R^2	0,9932	0,9992	0,9989	0,9998	**0,9998**

Fuente: autora

Figura 5. Curva de trabajo seleccionada para la determinación de nitritos



- **Determinación de límite de detección y de cuantificación**

La evaluación del límite de detección y de cuantificación se efectuó con base a los criterios y ecuaciones descritas en la sesión 5.3 metodología analítica. La desviación estándar calculada fue de 0,001 de una serie de 14 blancos de reactivos (ver tabla 9).
En la tabla 9 del anexo 6 se observan las lecturas de blancos realizadas para la determinación de límite de detección, su promedio y la desviación estándar. Se realizó el siguiente cálculo para su determinación:

$$LDM = C_{EB} + t_{n-1} * S$$

$$LD\ Nitritos\ \left(\frac{mg}{L}\right) NO_2 = 0.0004 + 2{,}65 * 0,0014 = 0{,}004$$

Teniendo en cuenta el límite de detección calculado, se realizaron lecturas de estándares de 0,002, 0,005 y 0,01mg/l (ver tabla VII del anexo 6), donde el estándar de concentración de 0.005 presentó un coeficiente de variación de 3,66 y un porcentaje de error de 2,71%, lo cual representa mediciones con precisión y

exactitud aceptables para la determinación de nitritos (menores del 10%). En la siguiente tabla se presenta el análisis estadístico:

Tabla 8. Análisis estadístico para el límite de detección de Nitritos

	Blanco	Estándar 0,002 mg/L	Estándar 0,005 mg/L	Estándar 0,01 mg/L
Promedio	0,0004	0,0015	0,0049	0,0099
Desviación estándar	0,0014	0,000	0,000	0,001
CV, %	389,95	13,19	**3,66**	5,29
% Error	---	23,93	**2,71**	0,79
Número de datos	14	14	14	14
Máximo	0,003	0,0018	0,0052	0,0111
Mínimo	-0,002	0,0012	0,0046	0,0092
T bajo	1,69	1,60	1,48	1,37
T alto	1,90	1,39	1,89	2,24
T teórico	2,37	2,37	2,37	2,37
t 95% LDM	2,65	2,65	2,65	-
LDM (Cprom-tn-1*S)	0,0040	0,0021	0,0053	-

Fuente: autora

- **Linealidad y sensibilidad**

Según la literatura el estándar de concentración más alta para la determinación de nitritos es 0,180mg/L. En este estudio se incluyó un estándar de mayor concentración (0,25mg/L), que permitiera evaluar el comportamiento de la linealidad y aumentar el rango útil de la curva. En la curva de calibración se observa que el método conserva la linealidad en la concentración de 0,25mg/L, mostrando una relación directamente proporcional con las absorbancias obtenidas como se observa en la tabla 8.

La sensibilidad corresponde al valor de la pendiente obtenida en la curva de calibración del método colorimétrico.
En la tabla 11 se observa una buena sensibilidad del método, cuyo valor promedio de la relación ABS/C es de 7,01 muy cercano al valor de la pendiente de la recta (6,88).

Tabla 9. Evaluación linealidad y sensibilidad del método

Concentración	ABS	ABS/C
0,01	0,072	7,20
0,05	0,356	7,12

0,10	0,686	6,86
0,20	1,395	6,98
0,25	1,719	6,88

Fuente: autora

- **Rango de aplicación**

El intervalo de concentraciones en el cual es aplicable el método colorimétrico para la determinación de Nitritos en agua, está comprendido entre el límite de cuantificación de 0,005 y 0,25 mg/L, que cubre el rango lineal de la curva de calibración. Las muestras de concentraciones superiores pueden ser analizadas diluyendo la muestra.

6.1.3 Validación: los datos obtenidos de la corrida de estándares y muestras se presentan en la tabla XI del anexo 7.

6.1.3.1 Análisis estadístico de los resultados de la validación, estándares y muestras para Nitritos

Tabla 10. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en la validación de Nitritos

	Blanco	**0,01 mg/L**	**0,1 mg/L**	**0,2 mg/L**	**MB mg/L**	**MBAB mg/L**	**MBAA mg/L**	**MA mg/L**
Promedio	0,0003	0,0095	0,0973	0,2029	0,0245	0,0770	0,1179	0,1149
Desviación estándar	0,0004	0,0004	0,006	0,006	0,002	0,001	0,001	0,005
CV %	149	4,44	6,39	2,94	8,28	1,02	0,91	4,49
% Error	---	4,54	2,71	1,43	---	---	---	---
% Recuperación	---	---	---	---	---	105	93,4	---
No. de datos	14	13	14	14	14	14	14	14
Máximo	0,001	0,010	0,103	0,2111	0 ,026	0,078	0,120	0,121
Mínimo	0,000	0,009	0,084	0,195	0,0210	0,076	0,116	0,106
T bajo	0,67	1,29	2,14	1,32	1,73	1,27	1,80	1,63
T alto	2,46	1,07	0,92	1,38	0,74	1,27	1,93	1,24
T teórico	2,37	2,37	2,37	2,37	2,37	2,37	3,37	2,37

Fuente: autora

6.1.3.2 Precisión: en la tabla 10 se puede observar que la precisión de los datos obtenidos en la validación en términos de coeficiente de variación es aceptable. En ninguno de los casos, superan el valor máximo establecido por el laboratorio de SIAMA LTDA y señalado en la "Guía Técnica No. 1 Validación de métodos y determinación de la incertidumbre en la medición del Instituto de Salud Pública de Santiago de Chile (10%).

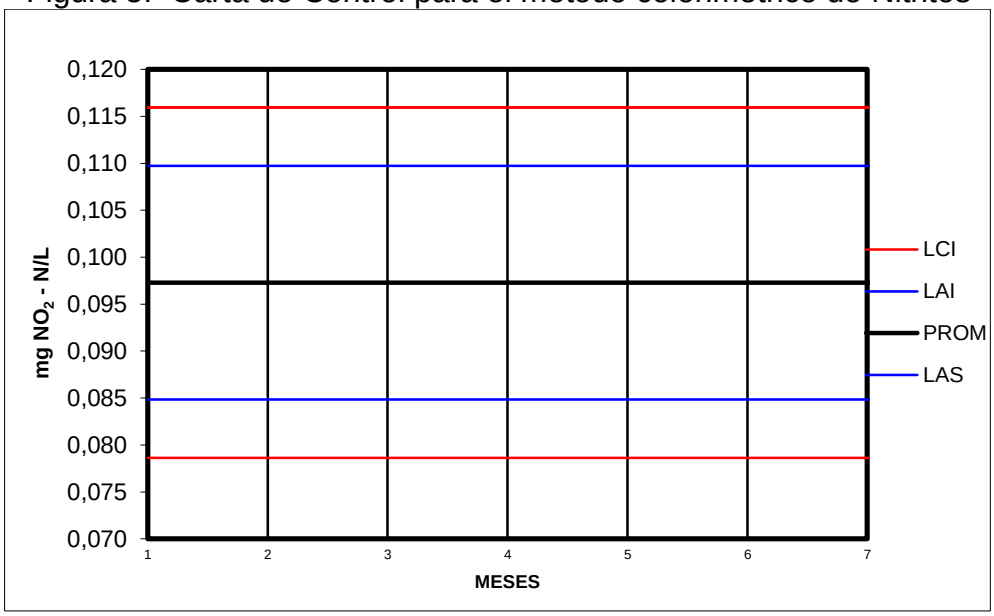
6.1.3.3 Exactitud: analizando la exactitud del método, los porcentajes de error obtenidos en el análisis de los estándares presentaron valores de 4,54, 2,71 y 1,43 para las concentraciones de 0,01, 0,1 y 0,2 respectivamente. Se observa que a menor concentración el % de error es mayor, sin superar el valor del 10% establecido en el laboratorio de SIAMA LTDA.

En términos de recuperación en muestras de aguas residuales fortificadas los porcentajes de recuperación obtenidos en las adiciones baja y alta (105% y 93,4%, respectivamente), se encuentran dentro del rango establecido en el laboratorio de 85 a 115%.

Al calcular el t para rechazo de datos se presentó un dato anómalo en el estándar de 0,01 cuyo valor fue de 2,40 para el t alto, por lo tanto el valor de 0,011 fue rechazado.

6.1.4 Carta de control: la carta de control se elaboró con datos obtenidos del estándar medio en la validación correspondiente al valor de 0,1mg/L.

Figura 5. Carta de Control para el método colorimétrico de Nitritos



Fuente: autora

El valor promedio de la carta de control es de 0,973 y Los límites de advertencia superior e inferior son de 0,101 y 0,085 mg NO_2/L, respectivamente, y los límites de control superior e inferior son de 0,116 y 0,786 mg NO_3/L, respectivamente. Si un valor medido del patrón de control se encuentra fuera de los límites de control establecidos en la carta, es indicador de que el procedimiento analítico esta fuera de control por lo tanto se deben analizar las causas y repetir nuevamente el procedimiento.

.

6.1.5 Estimación de la incertidumbre del método de nitritos

- ✓ **Especificación del mesurando y sus unidades:** Nitritos = NO_2^-/L
- ✓ **Identificación de las fuentes de incertidumbre:**

U_1 = Incertidumbre estimada con datos de validación – fuentes aleatorias
U_2 = Incertidumbre estimada con datos de validación – fuentes sistemáticas
U_3 = Incertidumbre de medidas volumétricas

La cuantificación de incertidumbre para medidas volumétricas fue la misma para la determinación nitritos, nitratos y ortofosfatos y son las que con mayor frecuencia se usan en la preparación y dilución de muestras, en este caso balones de 50 mL y pipetas volumétricas de 10mL, clase A.

U_1 = Incertidumbre estimada con datos de validación – fuentes aleatorias

Como se mencionó en la metodología, la cuantificación de este tipo de contribución se obtuvo, utilizando los resultados del análisis de las muestras reales de dos niveles de concentración, bajo y alto obtenidos durante el proceso de su validación.

Tabla 11. Incertidumbre asociada a las fuentes aleatorias

Muestra	CV	Numero de mediciones
Muestra Baja (MB	0,0828	14
Muestra Alta (MA)	0,0449	14

Fuente: autora

$$RSDt = \frac{\sqrt{(0{,}0828^2) * 13 + (0{,}0449^2) * 13}}{13 + 13}$$

$$RSDt = 0{,}01306187$$

U_2 = Incertidumbre estimada con datos de validación – Sistemáticas

Evaluada con la muestra adicionada de mayor rango en la recuperación en este caso la muestra con adición baja.

Tabla 12. Incertidumbre asociada a fuentes sistemáticas

Muestra	S_{Rp}	R_p	No. mediciones
MBAB	0,001	1,05	14

Fuente: autora

$$URp = SRp/\sqrt{n}$$

$$URp = 0{,}00026726$$

Para evaluar la recuperación, se realizó prueba t de student, en la cual se comparó el tcalc con t crit para n-1 grados de libertad (n es el número de mediciones realizadas) y un nivel de confianza aproximado del 95% con el valor del t calculado de la siguiente manera:

$$Tcal = \frac{1 - 1{,}05}{0{,}00026726}$$

$Tcal$ = -187

Como $Tcal$ (-187)< t $Tcrit$ (2,16) no se aplicó factor de corrección

Por lo tanto, **U_2** = URp **=** 0,00026726

U_3 = Incertidumbre de medidas volumétricas

La cuantificación de incertidumbre para medidas volumétricas fue la misma para la determinación nitritos, nitratos y ortofosfatos y son las que con mayor frecuencia se usan en la preparación y dilución de muestras, en este caso balones de 50 mL y pipetas volumétricas de 5mL, clase A.

Tabla 13. Incertidumbre asociada a las medidas volumétricas

Volumen Alícuota de la muestra a diluir (Vi) 5 ml		
Tolerancia pipeta volumétrica 5mL.	Tolerancia	0,02
Efecto de la diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura de calibración de la pipeta volumétrica	Volumen x del material volumétrico	5,00
	Diferencia de temperatura	4
Dispersión de las mediciones de la pipeta volumétrica 5mL	Desviación estándar,s	0,00415
	N° de mediciones, n	10

Fuente: autora

Tabla 14. Incertidumbre asociada al volumen final de aforo de la alícuota

Volumen final de aforo de la alícuota (Vf)50ml		
Tolerancia del balón volumétrico 50ml.	Tolerancia T del material	0,06
Efecto de la diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura de calibración del	Volumen x del material Volumétrico	50

material volumétrico utilizado para aforar.	Diferencia de temperatura	4
Dispersión de las mediciones del balón volumétrico 50 ml (Verificación).	Desviación estándar, s número de mediciones, n	0.00321 10
Factor de dilución	F	10

Fuente: autora

Tabla 15. Incertidumbre asociada a los instrumentos usados al diluir la muestra

Vol. Alícuota de la muestra a diluir (Vi) 5ml	**Obtención del valor numérico**
Calculo de Incertidumbre combinada Pipeta de 5ml	**Tolerancia para pipeta de 5 mL** $Up = \frac{0,02}{\sqrt{3}} = 0,0115$ **Dispersión de las mediciones** $\frac{0.00415}{\sqrt{10}} = 0.0013$ **Temperatura** $U\Delta T = \frac{10x\ 4\ x\ 2,1x10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0,0048$
Incertidumbre combinada para medición volumen de muestra	$Ucp = \sqrt{(0,0115)^2 + (0,0013)^2 + (0,0048)^2} = 0,013$

Fuente: autora

Tabla 16. Incertidumbre asociada al aforo de la alicuota

Volumen final de aforo de la alícuota (Vf) 50ml	**Obtención del valor numérico**
Calculo de Incertidumbre combinada	**Tolerancia para el balón de 50 ml**

Volumen final de aforo de la alícuota (Vf) 50ml	Obtención del valor numérico
Balón volumétrico de 50 ml	$Up = \frac{0,06}{\sqrt{3}} = 0,0346$
	Dispersión de las mediciones
	$\frac{0.0385}{\sqrt{10}} = 0.0122$
	Temperatura
	$U\Delta T = \frac{50\ x\ 4\ x\ 2,1x10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0,0242$
Incertidumbre combinada para dilución	$Ucb\ = \sqrt{(0,0346)^2 + (0,0122\ )^2 +\ (0,0242)^2} = 0,044$
	F = Vf / Vi
Factor de dilución	$\frac{50}{5} = 10$
Incertidumbre estándar relativa para dilución de la muestra	$IER\ 1 = 10 * \sqrt{\left(\frac{0,013}{5}\right)^2 + \left(\frac{0,044}{50}\right)^2} = 0.0274$
	U_3= 0.0274

Fuente: autora

Cuantificación de la incertidumbre combinada (U_{comb}) y la incertidumbre expandida (U_{exp}):

$$Ucomb = \sqrt{(0,01306187)^2 + (0,00026726)^2 + (0,0274)^2}$$

$$\boldsymbol{U_{comb}} = 0,0303553$$

$$\boldsymbol{U_{Exp}} = 2 * U_{Comb}\ = 0,06071$$

$$\boldsymbol{U_{Exp} = 0,06}$$

- **Reporte Del Dato Final**

Las concentraciones nitritos se expresan de la siguiente manera:
Obtener la incertidumbre expandida U en la medición así:

$$U = \pm C * Uexp\ met$$

Los resultados se reportarán dela siguiente manera:

Resultado: X ± U (unidades), valor de incertidumbre con un factor de cobertura 2 y un nivel de confianza de aproximadamente el 95%.

6.1.6 Resultados de la evaluación de desempeño interlaboratorio en la determinación de nitritos: como s mencionó anteriormente, la participación en la evaluación de desempeño Interlaboratorio es un requisito para obtener la acreditación y su resultado debe ser satisfactorio. En la tabla 10 se puede observar el valor reportado y el valor de referencia para la prueba de Nitritos.

Tabla 17. Resultado de la evaluación del desempeño interlaboratorio NO_2^-

Valor Reportado	valor de referencia	Desviación Estándar	Z Score	Puntaje obtenido
3,06	3,06	0,18	0,00	100

Fuente: autora

Como se puede observar, no hubo ninguna desviación fue el mismo valor de referencia reportado, por lo tanto, el obtenido puntaje fue del 100%, lo cual indica que el método validado en el laboratorio cumple con los criterios de precisión y exactitud y puede ser acreditado por el IDEAM.

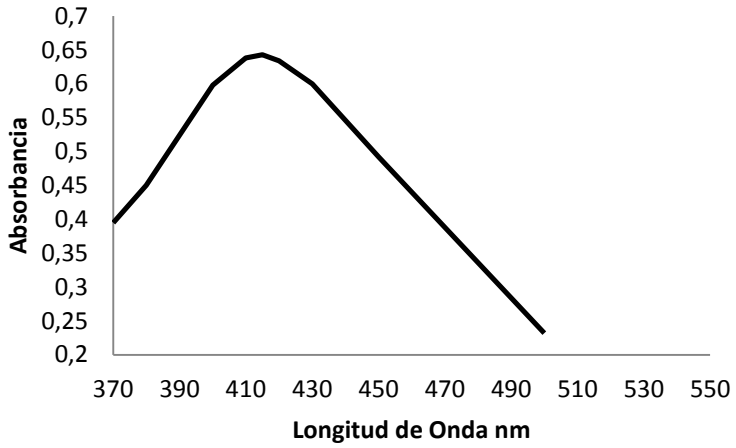
6.2 NITRATOS

6.2.1. Verificación de las condiciones de análisis: se verificaron las condiciones de análisis establecidas en la literatura como: barrido de longitud de onda y estabilidad del complejo con respecto al tiempo.

6.2.1.1 Barrido de la longitud de onda: en el espectro se puede observar que el complejo de p-nitrosalícilato de sodio formado, absorbe a una longitud de onda

de 415 nm (Ver figura 6), como lo establece el procedimiento descrito en el libro análisis de las aguas de J. Rodier. Por lo tanto, los estándares y muestras se corrieron en esta longitud de onda.

Figura 6. Espectro obtenido en el barrido de longitud de onda en la validación de nitratos.

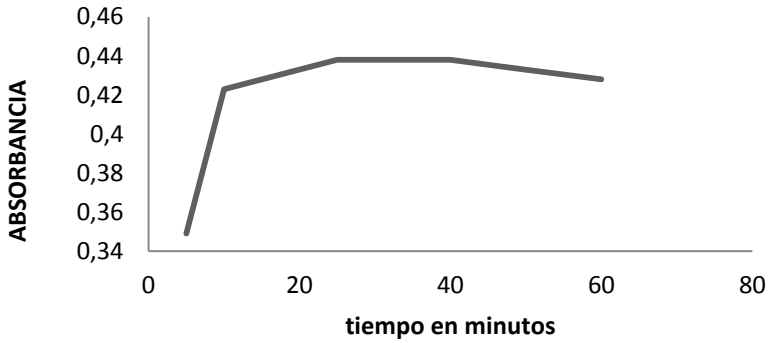


Fuente: autora

Las Absorbancias obtenidas en el barrido de longitud de onda en la validación de nitratos se encuentran registradas en el anexo E.

6.2.1.2 Estabilidad del complejo

Figura 7. Estabilidad del complejo p- nitrosalícilato de sodio.



Fuente: Autora.

Los resultados obtenidos sobre la estabilidad del complejo de complejo p-nitrosalícilato de sodio con respecto al tiempo, muestran que las absorbancias permanecen constantes entre 15 y 50 minutos, lo cual demuestra la estabilidad del complejo de complejo p- nitrosalícilato de sodio lo que determina que las lecturas pueden realizarse en este lapso de tiempo.

6.2.2 Pre – validación: una vez fueron verificadas las condiciones analíticas establecidas en la literatura se inició la validación.

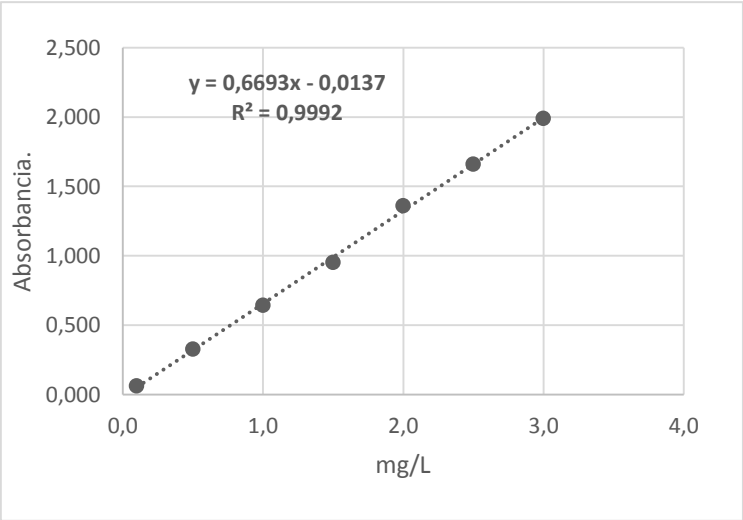
6.2.2.1 Evaluación de la linealidad, sensibilidad y rango de aplicación del método: se elaboraron 3 curvas de calibración de las cuales se seleccionó la curva que presentó mejor coeficiente de correlación ≥0,995. La curva de calibración del método que presento mejor coeficiente de correlación fue y = 0,6693x - 0,0137 en la cual se observó una linealidad alta en el intervalo de concentración de 0,1 y 3,0 mg/L con lo cual se concluye que existe una relación directa entre la señal del instrumento y la concentración.

Tabla 18. Curvas de calibración elaboradas en la pre-validación de nitratos.

Estándar	Abs. Curva 1	Abs. Curva 2	Abs. Curva 3	Curva de trabajo
0,1	0,063	0,061	0,062	0,062
0,5	0,37	0,352	0,328	0,328
1	0,674	0,436	0,643	0,643
1	0,985	0,874	0,954	0,954
2	1,395	0,972	1,361	1,361
2,5	1,685	1,361	1,661	1,661
3	2,011	1,566	1,99	1,99
R	**0,9987**	**0,9829**	**0,9992**	**0,9992**

Fuente: autora

Figura 8. Gráfico de la curva de calibración seleccionada para el método de Nitratos



Fuente: autora

6.2.2.2 Determinación de límite de detección y de cuantificación: la evaluación del límite de detección y de cuantificación para el método de nitratos se efectuó con base a los criterios y ecuaciones descritas en la sesión 5.3 (igual que para nitritos). La desviación estándar calculada fue de 0,009 de una serie de 14 blancos de reactivos (ver tabla VIII anexo 6).

En la tabla VIII del anexo 6, se observan las lecturas de blancos realizada para la determinación de límite de detección, su promedio y la desviación estándar. El límite detección se calculó como sigue:

$$LDM = C_{EB} + t_{n-1} * S$$

$$LD\ Nitratos\ \left(\frac{mg}{L}\right) NO_3 = 0.0021 + 2{,}65 * 0{,}009 = 0{,}026$$

Teniendo en cuenta el límite de detección calculado, se realizaron lecturas de estándares de 0,05, 0,1 y 0,2 mg/L (Ver tabla VIII del anexo 6), donde el estándar de concentración de 0.1 presentó un coeficiente de variación de 9,04 y un porcentaje de error de 7,86 lo cual indica que esta concentración se puede leer con la precisión y exactitud aceptables para la determinación de nitratos (menores del 10%).

Tabla 19. Análisis estadístico para el límite de detección de nitratos

	Blanco	**Estándar 0,05 mg/L**	**Estándar 0,1 mg/L**	**Estándar 0,2 mg/L**
Promedio	0,0021	0,0432	0,1079	0,2000
Desviación estándar	0,009	0,0061	0,010	0,008
CV, %	416,54	14,07	**9,04**	3,92
% Error	---	13,57	**7,86**	0,00
Número de datos	14,0	14,0	14,0	14,0
Máximo	0,0100	0,0500	0,1200	0,2100
Mínimo	-0,0200	0,0300	0,0900	0,1900
T bajo	2,48	2,17	1,83	1,27
T alto	0,88	1,12	1,25	1,27
T teórico	2,37	2,37	2,37	2,37
t 95% LDM	2,65	2,65	2,65	
LDM (Cprom-tn-1*S)	0,0258	0,0593	0,1037	

Fuente: autora

6.2.2.3 Linealidad y sensibilidad: según la literatura la curva de nitratos puede ser hasta 10 mg/L, sin embargo teniendo en cuenta que en el laboratorio solo se trabaja con curvas que presenten un coeficiente de correlación mayor a 0,999 , este proceso se realizó la curva de calibración hasta un estándar de (3,0mg/L), teniendo en cuenta además que las muestras que ingresan al laboratorio presentan concentraciones no mayores de 1,0 En la curva de calibración se observa que el método presenta una fuerte linealidad en una concentración de 3,0 mg/L, donde se evidencia una relación directamente proporcional con las absorbancias obtenidas como se observa en la tabla 13.
La sensibilidad corresponde al valor de la pendiente obtenida en la curva de calibración del método colorimétrico de nitratos.

En la tabla 21 se observa la sensibilidad del método, cuyo valor promedio de la relación ABS/C es de 0,65 muy cercano al valor de la pendiente de la recta que es de 0,66.

Tabla 20. Evaluación linealidad y sensibilidad del método

Concentración	ABS	ABS/C
0,1	0,062	0,62
0,5	0,328	0,66
1	0,643	0,64
1,5	0,954	0,64
2	1,361	0,68
2,5	1,661	0,66
3	1,99	0,66

Fuente: autora

6.2.2.4 Rango de aplicación: el intervalo de concentraciones en el cual es aplicable el método colorimétrico para la determinación de Nitratos en aguas, está comprendido entre el límite de cuantificación de 0,1 y 3,0 mg/L, que cubre el rango lineal de la curva de calibración. Las muestras de concentraciones superiores pueden ser analizadas realizando diluciones.

6.2.3 Validación: Se corrieron tres concentraciones de estándares que cubrieran tres niveles de concentración que estuvieran dentro del rango lineal. Las muestras seleccionadas también cubrieron el rango lineal y las muestras fortificadas se corrieron para determinar el rendimiento y exactitud del método. En la tabla XII del anexo 7 de presentan los resultados obtenidos durante el proceso de validación.

6.2.3.1 Análisis estadístico de los resultados de la validación, estándares y muestras.

Tabla 21. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en la validación, estándares y muestras para nitratos

	Bk	0,2 mg/L	1,0 mg/L	2,0 mg/L	MB mg/L	MBAB mg/L	MBAA mg/L	MA mg/L
Promedio	0,00	0,21	1,03	2,04	0,30	0,62	0,77	1,88
Desviación estándar	0,012	0,014	0,069	0,027	0,023	0,048	0,034	0,154
CV, %	270,2	6,88	6,70	1,30	7,71	7,80	4,44	8,20
% Error	---	4,64	2,86	1,88	---	---	---	---

	Bk	0,2 mg/L	1,0 mg/L	2,0 mg/L	MB mg/L	MBAB mg/L	MBAA mg/L	MA mg/L
Concentración adicionada	---	---	---	---	---	0,30	0,50	---
% Recuperación	---	---	---	---	---	106,0	93,0	---
Número de datos	14,0	14,0	14,0	13,0	14,0	14,0	13,0	14,0
Máximo	0,02	0,23	1,15	2,09	0,35	0,70	0,82	2,11
Mínimo	-0,02	0,18	0,92	1,99	0,26	0,56	0,70	1,70
T bajo	2,10	2,03	1,58	1,80	1,86	1,27	2,01	1,15
T alto	1,36	1,44	1,76	1,97	1,98	1,62	1,51	1,50
T teórico	2,37	2,37	2,37	2,37	2,37	2,37	2,37	2,37

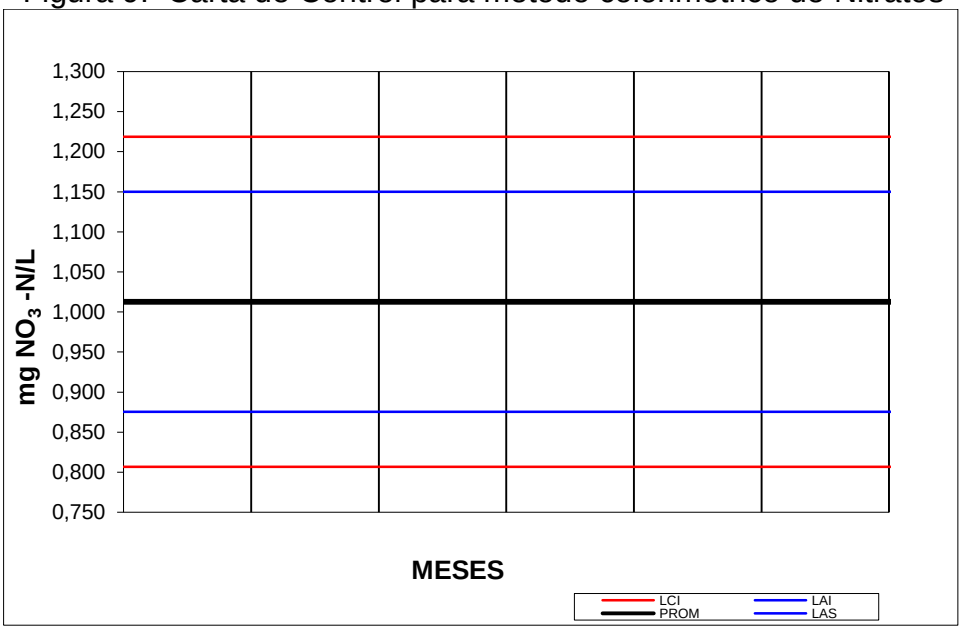
Fuente: autora

6.2.3.2 Precisión: en la tabla 13 se observa que la precisión de los datos obtenidos en la validación en términos de coeficiente de variación es aceptable. Estos datos no superan el valor máximo establecido por el laboratorio de SIAMA LTDA y señalado en la "Guía Técnica No. 1 Validación de métodos y determinación de la incertidumbre en la medición del Instituto de Salud Pública de Santiago de Chile (10%).

6.2.3.3 Exactitud: analizando la exactitud del método, los porcentajes de error obtenidos en el análisis de los estándares presentaron valores de 4,64, 2,86 y 1,88 para las concentraciones de 0,2, 1,0 y 2,0 respectivamente. Se observa que estos % de error no superan el valor del 10% establecido en el laboratorio de SIAMA LTDA. En términos de recuperación de muestras de aguas residuales fortificadas los porcentajes de recuperación obtenidos en las adiciones baja y alta (106% y 93%, respectivamente), se encuentran dentro del rango establecido en el laboratorio de 85 a 115%.

6.2.4 Carta de control: la carta de control se elaboró con datos obtenidos del estándar medio en la validación correspondiente al valor de 1,0 mg/L.

Figura 9. Carta de Control para método colorimétrico de Nitratos



Fuente: autora

El valor promedio de la carta de control es de 1,013 y Los límites de advertencia superior e inferior son de 1,15 y 0,875 mg NO_3/L, respectivamente, y los límites de control superior e inferior son de 1,219 y 0,807mg NO_3/L, respectivamente. Si un valor medido del patrón de control se encuentra fuera de los límites de control establecidos en la carta, es indicador de que el procedimiento analítico esta fuera de control por lo tanto se deben analizar las causas y repetir nuevamente el procedimiento.

.

6.2.5 Estimación de la incertidumbre del método de nitratos

- ✓ **Especificación del mesurando y sus unidades:** Nitratos = NO_3/L
- ✓ **Identificación de las fuentes de incertidumbre:**

U_1 = Incertidumbre estimada con datos de validación – fuentes aleatorias
U_2 = Incertidumbre estimada con datos de validación – fuentes sistemáticas
U_3 = Incertidumbre de medidas volumétricas

Como se mencionó anteriormente, las medidas volumétricas fueron las mismas para todos los métodos colorimétricos.

U_1 = Incertidumbre estimada con datos de validación – fuentes aleatorias

La cuantificación de este tipo de contribución se obtuvo, utilizando los resultados del análisis de las muestras reales de dos niveles de concentración, bajo y alto obtenidos durante el proceso de su validación.

Tabla 22. Incertidumbre asociada a las fuentes aleatorias

Muestra	CV	Numero de mediciones
Muestra Baja (MB	0,0771	14
Muestra Alta (MA)	0,082	14

Fuente: autora

$$RSDt = \frac{\sqrt{(0{,}0771^2) * 13 + (0{,}082^2) * 13}}{13 + 13}$$

$$RSDt = 0{,}01560844$$

U_2 = Incertidumbre estimada con datos de validación – Sistemáticas
Evaluada con la muestra adicionada de mayor rango en la recuperación en este caso la muestra con adición baja.

Tabla 23. Incertidumbre asociada a las fuentes aleatorias

Muestra	S_{Rp}	R_p	No. mediciones
MBAB	0,048	1,06	14

Fuente: autora

$$URp = SRp/\sqrt{n}$$

$$URp = 0{,}01282854$$

Para evaluar la recuperación, se realizó prueba t de student, en la cual se comparó el tcalc con t crit para n-1 grados de libertad (n es el número de mediciones realizadas) y un nivel de confianza aproximado del 95% con el valor del t calculado de la siguiente manera:

$$Tcal = \frac{1 - 1{,}06}{0{,}01282854}$$

$$Tcal = -4{,}67$$

Como $Tcal$ (-4,67)< t $Tcrit$ (2,16) no se aplicó factor de corrección

Por lo tanto, **U_2** = URp **=** $0{,}01282854$

U_3 = Incertidumbre de medidas volumétricas = U_3 para nitratos

Cuantificación de la incertidumbre combinada (U_{comb}) y la incertidumbre expandida (U_{exp}):

$$Ucomb = \sqrt{(0{,}01560844)^2 + (0{,}01282854)^2 + (0{,}0274)^2}$$

$$\boldsymbol{U_{comb}} = 0{,}0340434$$
$$\boldsymbol{U_{Exp}} = 2 * U_{comb} = 0{,}068$$

$$\boldsymbol{U_{Exp}} = 0{,}07$$

- **Reporte del dato final**

Las concentraciones de nitratos se expresan de la siguiente manera:
Obtener la incertidumbre expandida U en la medición así:

$$U = \pm C * Uexp\ met$$

Los resultados se reportarán de la siguiente manera:
Resultado: X ± U (unidades), valor de incertidumbre con un factor de cobertura 2 y un nivel de confianza de aproximadamente el 95%.

6.2.6 Resultados de la evaluación de desempeño interlaboratorio en la determinación de nitratos: como s mencionó anteriormente, la participación en la evaluación de desempeño Interlaboratorio es un requisito para obtener la acreditación y su resultado debe ser satisfactorio. En la tabla 17 se puede observar el valor reportado y el valor de referencia para la prueba de Nitratos.

Tabla 24. Resultado de la evaluación del desempeño interlaboratorio NO_3^-

Valor Reportado	valor de referencia	Desviación Estándar	Z Score	Puntaje obtenido

15,2	15,53	0,96	0,34	100

Fuente: autora

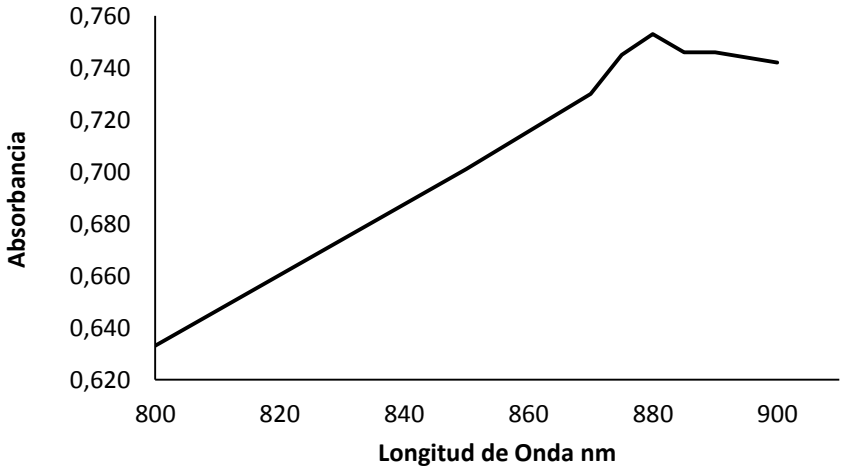
Como se puede observar, hubo una pequeña desviación con un valor de 0,34.Sin embargo el valor reportado estuvo muy cerca al valor de referencia, el puntaje obtenido fue del 100%, lo cual indica que el método validado en el laboratorio cumple con los criterios de precisión y exactitud y puede ser acreditado por el IDEAM.

6.3 ORTOFOSFATOS

6.3.1 Verificación de las condiciones de análisis: se verificaron las condiciones de análisis establecidas en la literatura como: barrido de longitud de onda y estabilidad del complejo con respecto al tiempo.

6.3.1.1. Barrido de la longitud de onda: en el espectro se observa que el complejo antimonil-fosfomolibdato formado, absorbe a una longitud de onda de 880nm (Ver figura 12), como lo establece el procedimiento descrito en el estándar método. Por lo tanto, los estándares y muestras se corrieron en esta longitud de onda para el método de ortofosfatos.

Figura 10. Espectro obtenido en el barrido de longitud de onda en la validación de ortofosfatos.

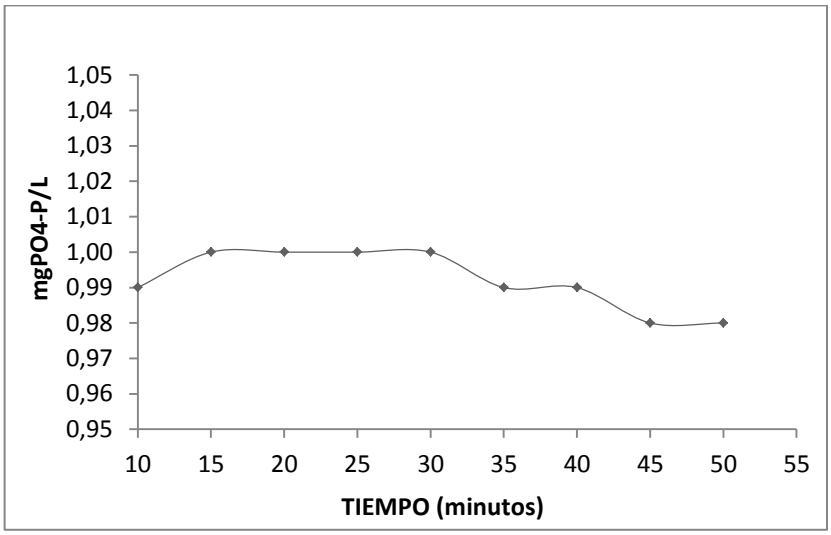


Fuente: autora

Las Absorbancias obtenidas en el barrido de longitud de onda en la validación de nitratos se encuentran registradas en el anexo 5.

6.3.1.2 Estabilidad del complejo

Figura 11. Estabilidad del complejo fosfomolíbdico



Fuente: autora

Los resultados obtenidos sobre la estabilidad del complejo fosfomolíbdico con respecto al tiempo, demuestran que las absorbancias permanecen constantes entre 15 y 30 minutos, después de este tiempo el complejo empieza a degradarse y las lecturas serán erróneas.

6.3.2 Pre – validación: una vez fueron verificadas las condiciones analíticas establecidas en la literatura para el método de colorimétrico de ortofosfatos se inició la validación.

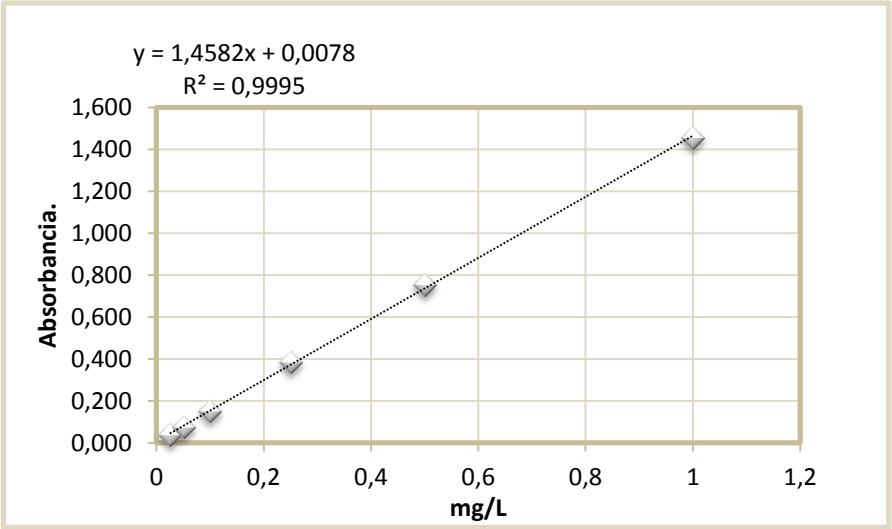
6.3.2.1 Evaluación de la linealidad, sensibilidad y rango de aplicación del método: se elaboraron 3 curvas de calibración de las cuales se seleccionó la curva que presentó mejor coeficiente de correlación ≥0,995. La curva de calibración del método que se obtuvo fue $y = 1,4582x + 0,0078$ en la cual se observó una linealidad alta en el intervalo de concentración de 0,5 y 1,0 mg/L con lo cual se concluye que existe una relación directa entre la señal del instrumento y la concentración.

Tabla 25. Curvas de calibración elaboradas en la pre-validación de ortofosfatos

Estándar	Abs. Curva 1	Abs. Curva 2	Curva de trabajo	
0,5	0,071	0,069	0,025	0,037
0,1	0,13	0,143	0,05	0,074
0,25	0,351	0,374	0,1	0,15
0,625	0,924	0,94	0,25	0,389
1	1.412	1,376	0,5	0,753
	-	-	1	1,456
R	**0,9989**	**0,9965**	**R**	**0,9995**

Fuente: autora

Figura 12. Gráfico de la curva de calibración seleccionada para el método de ortofosfatos.



Fuente: autora

6.3.2.2 Determinación de límite de detección y de cuantificación: la evaluación del límite de detección y de cuantificación para el método de ortofosfatos se efectuó con base a los criterios y ecuaciones descritas en la sesión 5.3 metodología analítica. La desviación estándar calculada fue de 0,02 de una serie de 14 blancos de reactivos (ver anexo 6).

En la tabla IX del anexo 6 se observan las lecturas de los blancos realizadas para la determinación del límite de detección así como la desviación estándar y su promedio. El límite detección del método se calculó de la siguiente manera:

$$LDM = C_{EB} + t_{n-1} * S$$

$$LD\ Ortofosfatos\ \left(\frac{mg}{L}\right) PO_4 = 0.0062 + 2{,}65 * 0{,}02 = 0{,}0374$$

Teniendo en cuenta el límite de detección anterior se prepararon una serie de estándares de 0.01, 0.025 y 0.05mg/L (Ver tabla IX del anexo 6). El estándar de 0,025 presento un coeficiente de variación de 6,88 y un porcentaje de error de 0,025, lo que indica que se puede leer con la precisión y exactitud establecida por el laboratorio (<10%).

Tabla 26. Análisis estadístico del límite de detección establecido para el método de ortofosfatos

	Blanco	**Estándar 0,01 mg/L**	**Estándar 0,025 mg/L**	**Estándar 0,05 mg/L**
Promedio	-0,0062	0,0154	0,0255	0,0510
Desviación estándar	0,02	0,003	0,002	0,004
CV, %	-260,6	22,27	**6,88**	7,46
% Error	---	54,43	**2,14**	2,00
Número de datos	14	14	14	14
Máximo	0,00	0,03	0,03	0,06
Mínimo	-0,06	0,01	0,02	0,05
T bajo	3,32	1,00	1,95	1,58
T alto	0,51	3,13	1,97	1,05
T teórico	2,37	2,37	2,37	2,37
t 95% LDM	2,65	2,65	2,65	
LDM (Cprom-tn-1*S)	0,037	0,02	0,03	

Fuente: autora

6.3.2.3 Linealidad y sensibilidad: Según la literatura el comportamiento lineal por el método del ácido ascórbico va hasta 1,2 mg/L. Sin embargo, por fines prácticos la curva se construyó solo hasta el estándar de 1,0mg/L en la curva se observa una linealidad muy buena donde se muestra una relación directamente proporcional con las absorbancias obtenidas como se observa en la tabla 28.

La sensibilidad reportada corresponde al valor de la pendiente obtenida en la curva de calibración del método colorimétrico de ortofosfatos.
En la tabla 28 se observa una buena sensibilidad para este método, donde el valor promedio de la relación ABS/C es de 1.498 muy cercano al valor de la pendiente de la recta que es de 1.458.

Tabla 27. Evaluación linealidad y sensibilidad del método

Concentración	ABS	ABS/C
0,025	0,037	1,48
0,05	0,074	1,48
0,1	0,15	1,50
0,25	0,389	1,56
0,5	0,753	1,51
1,0	1,456	1,46

Fuente: Autora

6.3.2.4 Rango de aplicación: el intervalo de concentraciones en el cual es aplicable el método colorimétrico para la determinación de Ortofosfatos en aguas, está comprendido entre el límite de cuantificación de 0,03 y 1,0 mg/L, concentraciones que cubren el rango lineal de la curva de calibración. Las muestras de concentraciones superiores pueden ser analizadas realizando diluciones.

6.3.3. Validación: los resultados obtenidos de la validación se encuentran en la tabla XIII del anexo 7.

6.3.3.1 Análisis estadístico de los resultados de la validación, estándares y muestras

Tabla 28. Análisis estadístico de estándares y muestras en la validación para el método de ortofosfatos

	Blanco	Estándar 0,05 mg/L	Estándar 0,5 mg/L	Estándar 0,8 mg/L	MB mg/L	MBAB mg/L	MBAA mg/L	MA mg/L
Continuación tabla 28.	0,0003	0,05	0,52	0,8	0,24	0,55	0,75	0,70
Promedio								
Desviación estándar	0,00	0,003	0,017	0,006	0,00	0,02	0,03	0,02
CV, %	149,13	6,70	3,16	0,76	1,86	3,51	4,03	2,80
% Error	---	5,14	4,83	1,11	---	---	---	---
Concentración adicionada	---	---	---	---	---	0,30	0,50	---

%Recuperación	---	---	---	---	---	103	101	---
Número de datos	14	14	14	14	14	14	14	14
Máximo	0,00	0,05	0,55	0,82	0,25	0,59	0,80	0,73
Mínimo	0,00	0,05	0,50	0,80	0,24	0,51	0,69	0,66
T bajo	0,67	0,76	1,46	1,45	1,26	2,06	1,92	2,10
T alto	2,46	2,07	1,62	1,66	2,31	2,03	1,73	1,78
T teórico	2,37	2,37	2,37	2,37	2,37	2,37	3,37	2,37

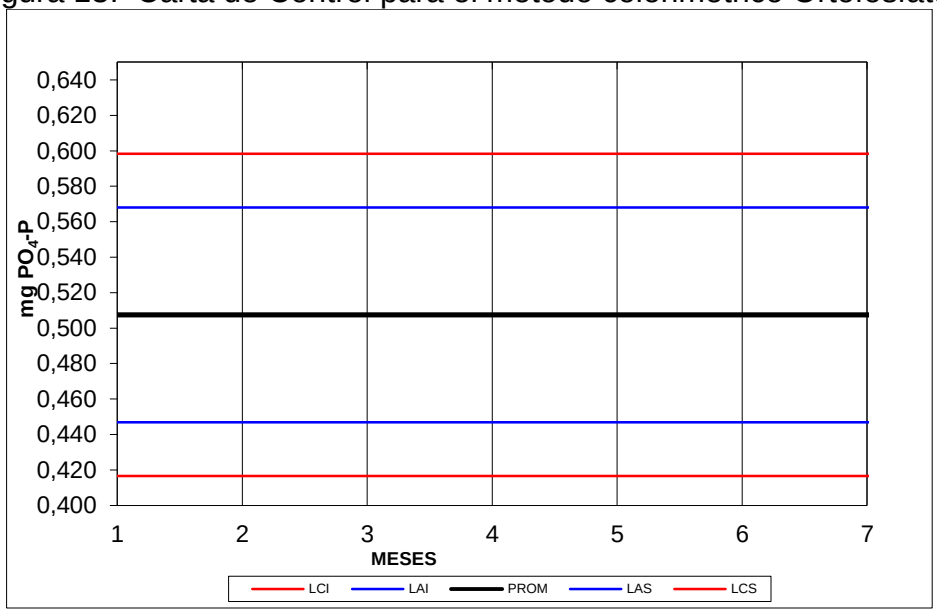
6.3.3.2 Precisión: en la tabla 29 se observa que la precisión de los datos obtenidos en la validación en relación con el coeficiente de variación es aceptable. Estos datos no superan el valor máximo establecido por el laboratorio de SIAMA LTDA y señalado en la "Guía Técnica No. 1 Validación de métodos y determinación de la incertidumbre en la medición del Instituto de Salud Pública de Santiago de Chile (10%).

6.3.3.3 Exactitud: al evaluar la exactitud del método, se observa que los porcentajes de error obtenidos en el análisis de los estándares presentaron valores de 5.14, 4.83 y 1,11 para las concentraciones de 0.05, 0.5 y 0.8 respectivamente. Estos % de error no superan el valor del 10% establecido en el laboratorio de SIAMA LTDA.

En la recuperación de muestras de aguas residuales fortificadas los porcentajes de recuperación obtenidos en las adiciones baja y alta (103% y 101%, respectivamente). De lo anterior, se puede deducir que los porcentajes de recuperación obtenidos en la validación del método colorimétrico de ortofosfatos se encuentran dentro del rango establecido en el laboratorio (de 85 a 115%).

6.3.4 Carta de control: la carta de control se elaboró con datos obtenidos del estándar medio en la validación correspondiente al valor 0,5 mg/L.

Figura 13. Carta de Control para el método colorimétrico Ortofosfatos



Fuente: autora

El valor promedio de la carta de control es de 0,508 y Los límites de advertencia superior e inferior son de 0,57 y 0,447 mg P/L, respectivamente, y los límites de control superior e inferior son de 0,598 y 0,417 mg P /L, respectivamente. Si un valor medido del patrón de control se encuentra fuera de los límites de control establecidos en la carta, es indicador de que el procedimiento analítico esta fuera de control por lo tanto se deben analizar las causas y repetir nuevamente el procedimiento.

6.3.5 Estimación de la incertidumbre del método de ortofosfatos

✓ **Especificación del mesurando y sus unidades:** Ortofosfatos = PO_4/L

Identificación de las fuentes de incertidumbre:

U_1 = Incertidumbre estimada con datos de validación – fuentes aleatorias
U_2 = Incertidumbre estimada con datos de validación – fuentes sistemáticas
U_3 = Incertidumbre de medidas volumétricas

U_1 = Incertidumbre estimada con datos de validación – fuentes aleatorias

La cuantificación de este tipo de contribución se obtuvo, utilizando los resultados del análisis de las muestras reales de dos niveles de concentración, bajo y alto obtenidos durante el proceso de su validación.

Tabla 29. Incertidumbre asociada con las fuentes aleatorias

Muestra	CV	Numero de mediciones
Muestra Baja (MB	0,0186	14
Muestra Alta (MA)	0,028	14

Fuente: autora

$$RSDt = \frac{\sqrt{(0{,}0186^2) * 13 + (0{,}028^2) * 13}}{13 + 13}$$

$$RSDt = 0{,}00466154$$

U_2 = Incertidumbre estimada con datos de validación – Sistemáticas

Evaluada con la muestra adicionada de mayor rango en la recuperación en este caso la muestra con adición baja.

Tabla 30**.** Incertidumbre asociada con las fuentes sistemáticas

Muestra	S_{Rp}	R_p	No. mediciones
MBAB	0,019	1,03	14

Fuente: autora

$$URp = SRp/\sqrt{n}$$

$$URp = 0{,}00507796$$

Para evaluar la recuperación, se realizó prueba t de student, en la cual se comparó el tcalc con t crit para n-1 grados de libertad (n es el número de mediciones realizadas) y un nivel de confianza aproximado del 95% con el valor del t calculado de la siguiente manera:

$$Tcal = \frac{1 - 1{,}03}{0{,}00507796}$$

$$Tcal = -5{,}90$$

Como $Tcal$ (-5,90) < t $Tcrit$ (2,16) no se aplicó factor de corrección.

Cuantificación de la incertidumbre combinada (U_{comb}) y la incertidumbre expandida (U_{exp})

$$Ucomb = \sqrt{0{,}00466154^{\,2} + 0{,}00507796^2 + 0{,}0274^2}$$

$$U_{comb} = 0{,}0285698$$

$$U_{Exp} = 2 * U_{comb} = 0{,}05713964$$

$$U_{Exp} = 0{,}06$$

- **Reporte del dato final**

Las concentraciones de nitratos se expresan de la siguiente manera:
Obtener la incertidumbre expandida U en la medición así

$$U = \pm C * Uexp\ met$$

Los resultados se reportarán de la siguiente manera:
Resultado: X ± U (unidades), valor de incertidumbre con un factor de cobertura 2 y un nivel de confianza de aproximadamente el 95%.

6.3.6 Resultados de la evaluación de desempeño interlaboratorio en la determinación de ortofosfatos: como se mencionó anteriormente, la participación en la evaluación de desempeño Interlaboratorio es un requisito para obtener la acreditación y su resultado debe ser satisfactorio. En la tabla 22 se puede observar el valor reportado y el valor de referencia para la prueba de Ortofosfatos.

Tabla 31. Resultado de la evaluación del desempeño interlaboratorio PO_4^-

Valor Reportado	valor de referencia	Desviación Estándar	Z Score	Puntaje obtenido
2,5	2,47	0,17	0,22	100

Fuente: autora

Teniendo en cuenta los datos obtenidos para la prueba de desempeño IDEAM para ortofosfatos, se observa una pequeña desviación con un valor de 0,17.Sin embargo, el valor reportado estuvo muy cerca al valor de referencia, el puntaje obtenido fue del 100%, lo cual indica que el método validado en el laboratorio cumple con los criterios de precisión y exactitud y puede ser acreditado por el IDEAM.

6.4 NITROGENO AMONIACAL

- **Condiciones Experimentales**

En el desarrollo de la validación se tomó un volumen de muestra de 50 ml y el pH fue ajustado a 9,5 en todos los casos.

6.4.1 Pre – validación

6.4.2 Determinación del límite de detección y cuantificación: la evaluación del límite de detección y de cuantificación para el método de nitrógeno amoniacal se efectuó con base a los criterios y ecuaciones descritas en la sesión 5.3 metodología analítica. La desviación estándar calculada fue de 0,0182 de una serie de 14 blancos de reactivos (ver tabla X del anexo 6).
En la tabla X del anexo 6 se observan las lecturas de blancos realizadas para la determinación de límite de detección, su promedio y la desviación estándar. Se realizó el siguiente cálculo para su determinación:

$$LDM = C_{EB} + t_{n-1} * S$$

$$LD\ Nitrogeno\ amoniacal\ \left(\frac{mg\ NH3 - N}{L}\right) = 0.046 + 2{,}65 * 0{,}0182 = 0{,}085$$

Teniendo en cuenta el límite de detección calculado, se realizaron lecturas de estándares de 0.5 y 1.0 mg/L (Ver tabla X del anexo 6. En la tabla 20 se presentan el análisis estadístico donde el estándar de concentración de 0.5 presentó un coeficiente de variación de 8,5 y un porcentaje de error de 1,6, donde se muestran mediciones con precisión y exactitud aceptables para la determinación de nitrógeno amoniacal (menores del 10%).

Tabla 32. Análisis estadístico del límite de detección para nitrógeno amoniacal

	Blanco	Estándar 0,5 mg/L	Estándar 1,0 mg/L
Promedio	**0,036**	0,508	0,964
Desviación estándar	0,0182	0,04	0,06
CV, %	**50,0**	8,05	6,52
% Error	**-**	1,60	3,60
Tabla 32 (continuación)			
Número de datos	14	14	14
Máximo	0,02	0,6	1,1
Mínimo	0,08	0,4	0,8
T bajo	0,90	1,47	1,97
T alto	2,39	1,27	1,59
T teórico	2,37	2,37	2,37
t 99% LDM	2,65	2,65	2,65
LDM*	0,085	0,616	
LDC =2,5 LDM	0,212		

Fuente: autora

6.5 VALIDACIÓN

Los datos obtenidos en la validación de nitrógeno amoniacal se encuentran en el anexo 7 tabla XIV.

6.5.1 Análisis estadístico de la validación, estándares y muestras.

Tabla 33. Análisis estadístico de estándares y muestras en la validación para el método de Nitrógeno Amoniacal

	Blanco	Estándar 1,0 mg/L	Estándar 5,0 mg/L	Estándar 80 mg/L	MB mg/L	MBAB mg/L	MBAA mg/L	MA mg/L
Promedio	0,023	0,964	4,924	76,56	4,68	8,93	13,20	48,50
Desviación estándar	0,00	0,06	0,07	0,94	0,21	0,16	0,03	0,66
CV, %	20,51	6,52	1,51	1,23	4,57	1,78	0,20	1,36
% Error	---	3,60	1,52	4,30	---	---	---	---
Concentración adicionada	---	---	---	---	---	5	10	---
%Recuperación	---	---	---	---	---	85,0	85,2	---
Número de datos	14	14	14	14	14	13	13	14
Máximo	0,03	1,1	5,0	77,3	5,1	9,30	13,2	49,7
Mínimo	0,02	0,8	4,8	74,6	4,4	8,74	13,2	47,7

	Blanco	Estándar 1,0 mg/L	Estándar 5,0 mg/L	Estándar 80 mg/L	MB mg/L	MBAB mg/L	MBAA mg/L	MA mg/L
T bajo	0,61	1,97	2,21	2,08	1,44	1,19	1,44	1,20
T alto	1,52	1,59	0,81	0,76	1,96	2,33	0,64	1,86
T teórico	2,37	2,37	2,37	2,37	2,37	2,37	2,37	2,37

Fuente: autora

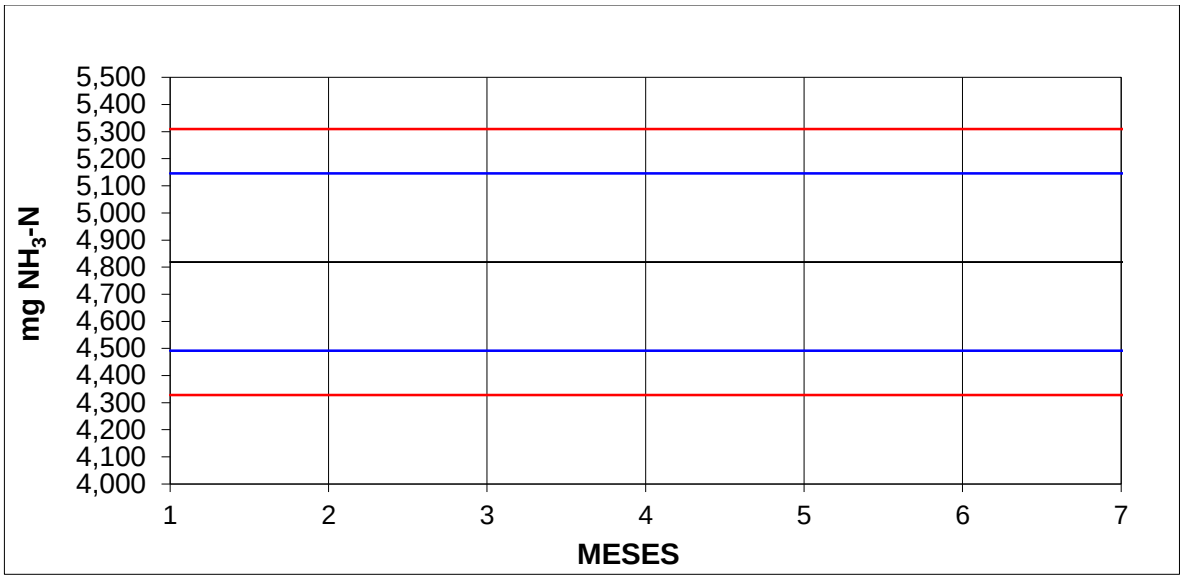
6.5.2 Precisión: en la tabla 21 se observa que la precisión de los datos obtenidos en la validación para los estándares y muestras es aceptable. Estos datos no superan el valor máximo establecido por el laboratorio de SIAMA LTDA y señalado en la "Guía Técnica No. 1 Validación de métodos y determinación de la incertidumbre en la medición del Instituto de Salud Pública de Santiago de Chile (10%).

6.5.3 Exactitud: al evaluar la exactitud del método, se observa que los porcentajes de error obtenidos en el análisis de los estándares presentaron valores de 3.60, 1.52 y 4,30 para las concentraciones de 1.0, 5.0 y 80 respectivamente. Estos % de error no superan el valor del 10% establecido en el laboratorio de SIAMA LTDA.

En la recuperación de muestras de aguas residuales fortificadas los porcentajes de obtenidos en las adiciones baja y alta 85% y 85,2%, respectivamente, indica que los porcentajes de recuperación del método de destilación –titulación de Nitrógeno Amoniacal se encuentran dentro del rango establecido en el laboratorio (de 85 a 115%).

6.5.3. Carta Control para el Método de Titulación – Destilación

Figura 14. Carta Control Nitrógeno Amoniacal



Fuente: autora

6.6 ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE DEL METODO DE NITROGENO AMONIACAL

- ✓ **Especificación del mesurando y sus unidades:** Ortofosfatos = PO_4/L

Identificación de las fuentes de incertidumbre:
U_1 = Incertidumbre estimada con datos de validación – fuentes aleatorias
U_2 = Incertidumbre estimada con datos de validación – fuentes sistemáticas
U_3 = Incertidumbre de medidas volumétricas

✓ **Especificación del mesurando y sus unidades:** Nitrógeno Amoniacal = NH_3/L

U_1 = Incertidumbre estimada con datos de validación – fuentes aleatorias: La cuantificación de este tipo de contribución se obtuvo, utilizando los resultados del análisis de las muestras reales de dos niveles de concentración, bajo y alto obtenidos durante el proceso de su validación.

Tabla 34. Incertidumbre asociada a fuentes aleatorias

Muestra	CV	Numero de mediciones
Muestra Baja (MB	0,0457	14
Muestra Alta (MA)	0,0136	14

Fuente: autora

$$RSDt = \frac{\sqrt{(0{,}0457^2) * 13 + (0{,}0136^2) * 13}}{13 + 13}$$

$$RSDt = 0{,}00661212$$

U_2 = Incertidumbre estimada con datos de validación – Sistemáticas

Evaluada con la muestra adicionada de mayor rango en la recuperación en este caso la muestra con adición baja.

Tabla 35. Incertidumbre asociada a medidas sistemáticas

Muestra	S_{Rp}	R_p	No. mediciones
MBAB	0,16	0,85	14

Fuente: autora

$$URp = SRp/\sqrt{n}$$

$$URp = 0{,}043$$

Para evaluar la recuperación, se realizó prueba t de student, en la cual se comparó el tcalc con t crit para n-1 grados de libertad (n es el número de mediciones realizadas) y un nivel de confianza aproximado del 95% con el valor del t calculado de la siguiente manera:

$$Tcal = \frac{1 - 0{,}85}{0{,}043}$$

$$Tcal = 3{,}51$$

Como $Tcal$ (3,51) > t $Tcrit$ (2,16) se aplicó factor de corrección asi:

$$U(Rp)_{corr} = \sqrt{(U(Rp))^2 + (\frac{1-Rp}{K})^2} \quad == \; 00075$$

K= 2

Por lo tanto, **U_2** = $URpcorregida$ **=** $0{,}086633407$

U_3 En este caso la incertidumbre se obtiene del volumen de muestra y blanco tomado en la medición y del volumen gastado en la titulación

Tabla 36. Incertidumbres de Nitrógeno Amoniacal asociadas a las medidas volumétricas

Volumen de la muestra 50 ml ml		
Tolerancia probeta de 50 mL.	Tolerancia	0,5
Efecto de la diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura de calibración de la pipeta volumétrica	Volumen x del material volumétrico	50,00
	Diferencia de temperatura	4
Dispersión de las mediciones de la pipeta volumétrica 5mL	Desviación estándar,s	0,1056
	N° de mediciones, n	10

Fuente: autora

Tabla 37: Incertidumbre asociada a los equipos usados en la validación

Bureta digital		
Efecto de la diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura de calibración del material volumétrico utilizado para aforar.	Volumen x del material Volumétrico	20
	Diferencia de temperatura	4
Dispersión de las mediciones para un volumen de 12,5 ml	Desviación estándar, s	0.0056
	número de mediciones, n	10

Fuente: autora

Cuadro 3. Incertidumbre asociada a la medición

Medición del volumen de muestra	
Tolerancia para de la probeta de 50 ml $$Up = \frac{0,5}{\sqrt{3}} = 0,2887$$ **Dispersión de las mediciones** $$\frac{0.1056}{\sqrt{10}} = 0.0334$$ **Temperatura** $$U\Delta T = \frac{50\ x\ 4\ x\ 2,1x10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0,0242$$	
Incertidumbre combinada volumen de muestra	$Ucb = \sqrt{(0,2887)^2 + (0,0334)^2 + (0,0242} = 0,29161$
Incertidumbre estándar volumen de Muestra	Volumen tomado para el blanco : 50mL IER $_1$= $\frac{0,29161}{50} =$ **0,005832**

Fuente: autora

Cuadro 4. Incertidumbre asociada a los equipos

Incertidumbre de la Bureta digital
Dispersión de las mediciones $$\frac{0.0270}{\sqrt{10}} = 0.0085$$ **Temperatura** $$U\Delta T = \frac{12,5\ x\ 4\ x\ 2,1x10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0,0061$$

Cuadro 4 (continuación)
Incertidumbre combinada en la Titulación de la muestra $Ucb = \sqrt{(0{,}0085)^2 + (0{,}0061)^2} = \mathbf{0{,}0105}$
Incertidumbre estándar relativa para para la titulación de la muestra Volumen de estándar para la titulación muestra 10mL
IRE 2 $\frac{0{,}0105}{10} = 0{,}001$
Incertidumbre combinada total
$\boldsymbol{Uctotal} \sqrt{(0{,}00583)^2 + (0{,}001)^2} = \mathbf{0{,}006}$

Fuente: autora

Cuantificación de la incertidumbre combinada (U_{comb}) y la incertidumbre expandida (U_{exp})

$$Ucomb = \sqrt{0{,}00661112^{\,2} + 0{,}086^2 + 0{,}00586^2}$$

$$U_{comb} = 0{,}0865$$

$$U_{Exp} = 2 * U_{comb} = 0{,}17$$

- **Reporte del dato final**

Las concentraciones de nitratos se expresan de la siguiente manera:
Obtener la incertidumbre expandida U en la medición así:

$$U = \pm C * Uexp\ met$$

Los resultados se reportarán de la siguiente manera:
Resultado: X ± U (unidades), valor de incertidumbre con un factor de cobertura 2 y un nivel de confianza de aproximadamente el 95%.

6.7 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE DESEMPEÑO INTERLABORATORIO

6.7.1 En la determinación de nitrógeno amoniacal: como se mencionó anteriormente, la participación en la evaluación de desempeño Interlaboratorio es un requisito para obtener la acreditación y su resultado debe ser satisfactorio. En la tabla 25 se puede observar el valor reportado y el valor de referencia para la prueba de Nitrógeno Amoniacal.

Tabla 38. Resultado de la evaluación del desempeño interlaboratorio NH_3^-

Valor Reportado	valor de referencia	Desviación Estándar	Z Score	Puntaje obtenido
14,6	16,08	1,17	1,27	80

Fuente: autora

Teniendo en cuenta los datos obtenidos para la prueba de desempeño IDEAM para el método de Nitrógeno Amoniacal, se observa una desviación con un valor de 1,17. La prueba de desempeño fue satisfactoria con un el puntaje del 80, lo cual indica que el método validado en el laboratorio cumple con los criterios de precisión y exactitud y puede ser acreditado por el IDEAM.

7. CONCLUSIONES

Se realizó la validación de los métodos analíticos de nitritos, nitratos, ortofosfatos y Nitrógeno amoniacal. La validación de dichos métodos, se llevó a cabo mediante las condiciones de análisis del laboratorio de SIAMA LTDA y las reportadas en la literatura. Se analizaron y compararon las pruebas de desempeño del laboratorio de SIAMA LDTA, con las efectuadas en otros laboratorios y se calculó la incertidumbre para cada uno de los métodos analíticos.

Se realizaron curvas de calibración para cada uno de los métodos colorimétricos y se estudiaron variables como el barrido de longitud de onda y estabilidad del complejo con respecto al tiempo. Los métodos espectrofotométricos se estudiaron bajo las siguientes condiciones:

- NITRITOS - Método colorimétrico de Shinn, (SM 4500 – NO_2)
  Longitud de onda de máxima absorción: 543nm.
  Estabilidad del complejo con respecto al tiempo: 10 – 30min.

- NITRATOS - Método del Salicilato de sodio descrito en el libro análisis de las aguas de J. Rodier de 1998.
  Longitud de onda de máxima absorción: 415nm
  Estabilidad del complejo con respecto al tiempo: 15 – 40min.

- NITRÓGENO AMONIACAL - método destilación titulación (SM 4500 – NH_3 B-C): pH ajustado de la muestra: 9,5

- ORTOFOSFATOS - Método colorimétrico del ácido ascórbico, (SM 4500 – P-E).
  Longitud de onda de máxima absorción: 880nm
  Estabilidad del complejo con respecto al tiempo: 15 – 30min.

- Los límites de detección para los métodos analíticos fueron: Nitritos 0.004mg NO2/L, Nitratos 0,026mg NO3/L, Ortofosfatos 0,02 mg PO4/L y Nitrógeno Amoniacal 0.21 mg NH3/L. Dichos valores demuestran la viabilidad de los métodos analíticos validados. A su vez, se evidencia que estos pueden ser detectables en concentraciones bajas o mínimas en aguas.

- Se identificaron las fuentes y se calcularon las incertidumbres para cada método analítico. Para el método de nitritos la incertidumbre combinada fue de 0,0303553 e incertidumbre expandida de 0,06. Nitratos presentó una incertidumbre combinada de 0,0340434 e incertidumbre expandida de 0,07. Para el método de Ortofosfatos la incertidumbre combinada fue de 0,0285698 e

incertidumbre expandida de 0,06. De esta manera se demostró la confiabilidad de las mediciones y resultados obtenidos y se cumplió con el requisito de la norma ISO /IEC 17025.

- Las metodologías analíticas validadas presentaron coeficientes de variación aptos para el estudio de criterios como la precisión y exactitud, así como la sensibilidad y linealidad de los métodos.

- Los porcentajes de recuperación obtenidos se encontraron dentro del rango establecido en el laboratorio de SIAMA LTDA de 85% – 115%. Esto demuestra que los métodos analíticos son exactos y confiables, por lo tanto, son adecuados para la determinación de nitritos (105%; 93,4%), Nitratos (106%; 93%), Nitrógeno Amoniacal (85%; 85,2) y Ortofosfatos (103%; 101%), en aguas.

- El método colorimétrico de Shinn para nitritos resulto preciso en el intervalo de concentración de 0,005 – 0,25mgNO2/L y exacto con porcentajes de error de 4.54, 2.71 y 1.43 menores al 10%. A partir de una serie de blancos de reactivos, se determinaron los límites detección y límites de detección instrumental para cada método y se determinó que en el desarrollo de los mismos, se pueden analizar muestras cuyas concentraciones se encuentren dentro de los límites de detección y cuantificación establecidos. De esta forma, se comprobó que los métodos analíticos proporcionan resultados adecuados y confiables.

8. RECOMENDACIONES

Antes del desarrollo de cada metodología analítica es primordial la limpieza y lavado de material (Ver anexo 2), así como el uso de todos los elementos de protección personal y de seguridad dentro del laboratorio.

Para asegurar la calidad analítica de los resultados es indispensable la capacitación del personal, adaptar los procedimientos a las condiciones ambientales y del laboratorio, realizar periódicamente las verificaciones y calibraciones del material volumétrico y los equipos utilizados en el laboratorio.

9. BIBLIOGRAFIA

Aguilar, M. Análisis de agua – Determinación de Nitrógeno de Nitritos en aguas naturales y residuales – Métodos de prueba (cancela a la nmx-aa-099-1987). México D.F. 2006; p1-3.

Aguinaga, S.; Manual de Procedimientos Analiticos para Aguas y Efluentes. Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente; Direccion Nacional del Medio Ambiente. Bogotá, 2000; p3.

AWWA.; APHA.; WEF. *"Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater".* 22a Edition. Estados Unidos. 2012; p4-143.

AWWA.; APHA.; WEF. *"Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater".* 22a Edición. Estados Unidos. 2012; p4-18.

Báez, María Fernanda. Validación de Métodos de Ensayo para el Análisis de Parámetros Físico-químicos en Aguas Limpias y Residuales en el Laboratorio de Medio Ambiente: Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador, 2009.

Benito, V. Manual de Técnicas Analíticas para la Determinación de Parámetros Fisicoquímicos y Contaminantes Marinos (aguas, sedimentos y organismos). Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras – INVEMAR; Santa Marta – Magdalena, Julio de 2003; p43 – 45.

Belgrano, R.; Colasurdo, V.; Diaz, O. *Métodos Ultravioleta Selectivo y de Reducción con Hidracina en la Determinación del Ión Nitrato en Aguas Subterráneas.* Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 5. 2003; p766-768.

Boris, D.; Rojas, F.; Guerrero, L.; Roa, L.; Rodriguez, L.; Soto, M.; Aguilera, M.; Sandoval, S. Validacion de Metodos y Determinación de la Incertidumbre de la Medición: "Aspectos Generales sobre validacion". Santiago, Chile; Diciembre, 2010; p50.

CENAM (Centro Nacional de Metodología). Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito: Guía de validación de métodos y temas relacionados. Desarrollado por: EURACHEM (A Focus Analytical Chemistry In Europe), 2ª edición. México, Nov. 2005; p5.

CDMB (Corporación Autónoma Regional para la defensa de la meseta de Bucaramanga). Estandarización y validación de técnicas analíticas. Bucaramanga. 2009; p10.

Chairman.; De Halleux.; Diamondstone. Haesselbarth. Kaarls.; Mansson.; Taylor. Cuantificación de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas. Desarrollado por: EURACHEM (A Focus Analytical Chemistry In Europe), 2ª edición. CENAM - México, Nov. 2000; p3.

Colin, B. Química Ambiental: Universidad Autónoma de Barcelona. Edición N°2; Reverté S.A. Barcelona, 2001; p450.

Coy, G. Protocolo estandarización de métodos analíticos. IDEAM. Bogotá D.C. 1999 – [citado 5 Nov. 2014].

CDMB. Corporación Autónoma Regional para la Defensa de la Meseta de Bucaramanga. Validación de Métodos Analíticos (terminologías). Versión 1. Elaborado por: equipo de laboratorio CDMB; Bucaramanga – Santander; p3- p12.

Departamento de asuntos económicos y sociales de las Naciones Unidas (ONU – DAES). Decenio Internacional para la Acción "El agua fuente de vida 2005 – 2015". Consulta: 19 Octubre de 2015.

De Esparza, María Luisa. Evaluación del desempeño de los laboratorios de Latinoamérica que miden trazas de metales en agua mediante muestras de control. HDT 31. [online]. CEPIS (Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente). Junio 2000 – [citado 1 Nov., 2014].

DECRETO 1600 De 1993. Sistema Nacional Ambiental (SINA): Sistemas Nacionales de Investigación Ambiental y de Información Ambiental,

Eugene, W.R.; Baird, R.B.; Eaton, A.D.; Clesceri, L. Standard Methods For The Examination Of Water and Wastewater. 22ND Edition. American Public Health Association. Washington, D.C. 2012; p4-110

Eugene, W.R.; Baird, R.B.; Eaton, A.D.; Clesceri, L. Standard Methods For The Examination Of Water and Wastewater. 22ND Edition. American Public Health Association. Washington (Nitrites); D.C. 2012; p4-155.

Eugene, W.R.; Baird, R.B.; Eaton, A.D.; Clesceri, L. Standard Methods For The Examination Of Water and Wastewater. 22ND Edition. American Public Health Association. Washington (Phosphorus); D.C. 2012; p4-118.

Eugene, W.R.; Baird, R.B.; Eaton, A.D.; Clesceri, L. Standard Methods For The Examination Of Water and Wastewater. 22ND Edition. American Public Health Association. Washington, D.C. 2012; p4-120.

Eugene, W.R.; Baird, R.B.; Eaton, A.D.; Clesceri, L. Standard Methods For The Examination Of Water and Wastewater. 22ND Edition. American Public Health Association. Washington, D.C. 2012; p4-125.

Eugene, W.R.; Baird, R.B.; Eaton, A.D.; Clesceri, L. Standard Methods For The Examination Of Water and Wastewater. 22ND Edition. American Public Health Association. Washington (Assurance and quality control); D.C. 2012; p4-122.

Eugene, W.R.; Baird, R.B.; Eaton, A.D.; Clesceri, L. Standard Methods For The Examination Of Water and Wastewater. 22ND Edition. American Public Health Association. Washington (Detection Limit – Analiticals Methods); D.C. 2012; p4-122.

EURACHEM. Métodos Analíticos Adecuados a Su Propósito: Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. 2ª Edición. Publicación Técnica CNM-MRD-PT-030 (Nov. 2005); México, p5.

EURACHEM-CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3ra Edición. Reino Unido. 2012; p 66.

EURACHEM/CITAC Guide on the Use of uncertainty information in compliance assessment EURACHEM Secretariat, BAM; Berlín, 2007

EURACHEM-CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3ra Edición. Reino Unido. 2012. p 66.

EURACHEM. Métodos Analíticos Adecuados a Su Propósito: Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. 2ª Edición. Publicación Técnica CNM-MRD-PT-030 (Nov. 2005); México, p25.

EPA: Environmental Protection Agency. United States; [citado 16 Dic, 2014].

Font, A.; Saez, S. Incertidumbre en la Medición: teoría y práctica, 1ª edición; Estado Aragua. Consultores C.A. Capacidad de Gestión y Mejora. Maracay, Feb. 2001.

González, G. "*Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards*". [base de datos en línea]. España. Elsevier. Agosto 2010 – [citado 10 Enero, 2015]; p176.

González, G. "*Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards*". [base de datos en línea]. España. Elsevier. Agosto 2010 – [citado 10 Enero, 2015]. 45 p.

IDEAM (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales). Estudio Nacional del Agua. 2010.

ICONTEC. NTC/ISO/IEC 17025:2005. "Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayo y calibración". Bogotá DC.

IDEAM. Redes de Monitoreo Para Calidad Del Agua.

IDEAM (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales). Estudio Nacional del Agua. 2000.

IDEAM (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales). Estudio Nacional del Agua realizado en el año 2010. Capítulo 6 (2010).
Jiménez, E. La contaminación Ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada; LIMUSA NORIEGA EDITORES. Mexico D.F.; 2005, p67, 68.

IDEAM (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales). Estudio Nacional del Agua. Estandarización de Métodos Analíticos 2006.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificacion. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de Ensayo y Calibracion. NTC-ISO/IEC 17025. Bogotá, 2005; p17.

Jurado, José. Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica. [en línea]. España: Departamento de Química Analítica. 2008 [consulta y cita: 22 Mayo 2012].

Kirchmer, Cliff. Control de calidad en los análisis de agua. HDT 24. [online]. CEPIS (Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente). Octubre 2012 – [citado 15 Dic., 2014].

Kumar, A. "*Method development and validation: Skills and tricks"*. [base de datos en línea]. India. *Chronicles of Young Scientists*. Vol 3.; Junio de 2012 [citado 10 Enero, 2015].

Kumar, A. "*Method development and validation: Skills and tricks"*. [base de datos en línea]. India. *Chronicles of Young Scientists*. Vol 3.; Junio de 2012 [citado 10 Enero, 2015]; p5.

Lacouture, H. M.; Hugues, M. Aproximación a las autoridades ambientales regionales en Colombia. Revista de Derecho N°25. Universidad del Norte; Barranquilla, 2006; p310.

Maroto, A.; Bogré, R.; Jordi, R.; Rius, X. Incertidumbre y precisión: Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados. Universidad Virgili. Tarragona, España: 2000; p4.

Maroto, A.; Bogré, R.; Jordi, R.; Rius, X. Incertidumbre y precisión: Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados. Universidad Virgili. Tarragona, España: 2000; p4.

Miller, J. Estadistica y Quimiometria para Química Analitica. Pearson Education S.A.; 4ta Edicion. Madrid – España, 2002; p100, 125

Molina, S. Estandarización de Métodos de Análisis nitratos, nitritos, compuestos Fenólicos, Grasas y Aceites, como Indicadores de Contaminación en Aguas naturales y residuales Industriales, Tesis de grado. UIS: *FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE QUIMICA*, Bucaramanga: 2010; p29, 30, 42, 43.

Nagaraja.; P.; Prakash, J. S.; Bhaskara, B. L. Rapid Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Nitrate-Nitrogen using Dapsone and a-Naphthol. En: E- Journal of Chemistry. Vol. 3; 2006, p146 – 153.

NTC – ISO/IEC 17025 (Norma Técnica Colombiana). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. (ICONTEC). Bogotá, D.C, p17.

NTC – 5755 (Norma Técnica Colombiana). Métodos Estadísticos para Utilizar en Ensayos de Actitud Mediante Comparaciones Interlaboratorio. 21 de Abril de 2010. Bogotá, D.C.

NTC – ISO/IEC 17025 (Norma Técnica Colombiana). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. (ICONTEC). Bogotá, D.C, p17.

Pacheco, J.A.; Armando, C. Fuentes principales de nitrógeno de nitratos en aguas subterráneas**,** Rev. Científica**.** Pacheco J., et. al. / Ingeniería 7-2, 2003; [Consultado 6 Diciembre, 2014]; p47-54.

Riu, J. Gráficos de Control de SHEWART. Grupo de Quimiometría, Cualimetría y Nanosensores Universitat. Rovira i Virgili; Campus Sescelades C/ Marcel·lí Domingo s/n 43007-Tarragona.

Rodier, J. Análisis de aguas; OMEGA S.A. Barcelona, 1998; p180.

Rozet, E. "*Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods*". [base de datos en línea]. Bélgica. Elsevier; 21 de diciembre de 2010 [citado 20 Dic., 2014].

Rozet, E. "*Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods*". [base de datos en línea]. Bélgica. Elsevier; 21 de diciembre de 2010 [citado 10 Enero., 2015].

Rozet, E. "*Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods*". [base de datos en línea]. Bélgica. Elsevier; 21 de diciembre de 2010; p849. [citado 15 Enero., 2015].

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation (Nitrites). 22ed, New York, 2012.

Styarini, D. "*Validation and Uncertainty Estimation of Analytical Method for Determination of Benzene in Beverages".* [base de datos en línea]. Indonesia. *Eurasian J Anal Chem*.; Marzo 2011; p165. [citado 10 Dic., 2015].

Styarini, D. "*Validation and Uncertainty Estimation of Analytical Method for Determination of Benzene in Beverages".* [base de datos en línea]. Indonesia. *Eurasian J Anal Chem*.; Marzo 2011; p162. [citado 9 Dic., 2015].

Shakhashir. B. Ammonia: Chemical of The Week (*General Chemistry).* 2008; p1, 2

Solís, Y. *Validación De Métodos Analíticos Para La Determinación De Boro, Fluoruros Y Nitritos En Agua Mediante Espectrofotometría De Luz Visible.* Universidad CentraL Del Ecuador Facultad De Ciencias Químicas; Tesis de grado. Quito – Ecuador. (Enero. 2013); p4, p5.

Veena.; J. Narayana, B. Spectrophotometric Determination of Nitrite Using New Coupling Agents. En: Ind. Journal of Chemical Technology. Vol. 16; 2009, p89 – 92.

Zoonen, P. *"Some practical examples of method validation in the analytical laboratory".* [base de datos en línea]. Países bajos. *Trends in analytical chemistry*, vol. 18; 2000 - [citado 10 febrero., 2015]; p5

ANEXOS

ANEXO A. Equipos, materiales y reactivos utilizados durante la validación de los métodos analíticos.

EQUIPOS			
NOMBRE	**MARCA**	**MODELO**	**RANGO DE OPERACIÓN**
Espectrofotómetro	Hach	3900	400-900,
Baño de María	Memert	WNB10	20-95°C
Bomba de Vacío	Thomas	1630	1800 RPM
Transfer pipeta	Human	Humapette	100 - 1000 µl
pH-metro	HACH	H-160	0-14 Unidades de PH
Bureta Digital	Brand	Titrette	0,05- 25 ml
Destilador de Nitrógeno	Velp	UDK-129	-

Fuente: Autora

MATERIALES			
MATERIAL	**MARCA**	**CLASE**	**TAMAÑO**
Balones volumétricos	Schott	A	25, 50, 100, 500 y 1000 mL
Pipetas volumétricas	Schott	A	1, 2, 5, 10 y 25 mL.
Probetas	Brand	A	50 y 100 ml
Vasos de precipitados	Boeco	-	50, 100, 150 y 250ml
Erlenmeyers	Boeco	-	125 ml
Erlenmeyer con salida lateral	Brand	-	250 ml
Embudo de Filtración	Buchner	-	50 mm de Ø
Filtros de membrana	Sartorius	Nitrato de celulosa	0,45 µm- 4cm de Ø
Frasco lavador	-	-	500 ml

Fuente: Autora

REACTIVOS		
DESCRIPCION	**MARCA**	**LOTE**
	NITRITOS	
Solución Patrón Trazable a SRM de NISt $NaNO_2$ en H_2O 1000 mg/L NO_2	MERCK	HC42633599
N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato	PANREAC	0000523078
Sulfanilamida	ALFA AESAR	10172745
Ácido Fosfórico del 85%	PANREAC	0000468528
	NITRATOS	
Solución Patrón Trazable a SRM de NISt $NaNO_3$ en H_2O 1000 mg/L NO_3	MERCK	A5005

REACTIVOS		
DESCRIPCION	**MARCA**	**LOTE**
Salicilato de sodio 5%	MERCK	K44838001411
Tartrato de sodio y potasio	PANREAC	0000497734
Hidróxido de sodio	MERCK	B1104098448
Ácido sulfúrico concentrado 97%	MERCK	K45493631416
NITROGENO AMONIACAL		
Solución Patrón Trazable a SRM de NISt NH_4Cl en H_2O 1000 mg/L NH_4^+	MERCK	A4352
Alcohol etílico	YEQUIM	1596
Cloruro de Amonio	MERCK	A0176345228
Hidróxido de sodio	MERCK	B1104098448
Tetraborato de sodio 0,95%	PANREAC	374391
Ácido Bórico	YEQUIM	6314
Indicador mixto de azul de metileno rojo de metilo	-	-
ORTOFOSFATOS		
Solución Patrón Trazable a SRM de NISt KH_2PO_4en H_2O 1000 mg/L PO_4^{3-}	MERCK	A5007
Tartrato de antimonio y potasio 1,76%	MERCK	
Ácido ascórbico 0,14%	PANREAC	4Q015227
Fosfato de Potasio	BIOPACK	1412207
Molibdato de amonio 4%	BIOPACK	1492010
Solución de Fenolftaleína	-	-

Fuente: Autora

ANEXO B. Limpieza y verificación del material usado durante la validación

Limpieza del material de vidrio: teniendo en cuenta la importancia de la limpieza en el material usado en el desarrollo de cada uno de los procedimientos analíticos de nitritos, nitratos, nitrógeno amoniacal y ortofosfatos, el material de vidrio se lavó de la siguiente manera:

- **Nitritos, Nitratos y Nitrógeno Amoniacal**

1. Se lavó el material con abundante agua del grifo y jabón neutro al 5%.
2. Más tarde, el material se sumergió en ácido sulfúrico al 5% por unos minutos.
3. Se enjuagó nuevamente el material con agua del grifo y se purgó varias veces con agua destilada.
4. Finalmente, se dejó secar y se almacenó.

- **Ortofosfatos**

1. Inicialmente, se lavó el material con abundante agua del grifo.
2. El material se sumergió por unos minutos en una solución de ácido clorhídrico al 10%.

3. Después, se lavó el material con agua del grifo y se enjuagó con varias porciones de agua destilada.
4. El material se dejó secar y se almacenó

Verificación del material volumétrico aforado clase A: se llevó a cabo en todo el material volumétrico usado (pipetas y balones aforados) en el desarrollo de los métodos analíticos, teniendo en cuenta el procedimiento para estandarización. El proceso para la verificación del material volumétrico se describe a continuación:

- **Probetas, pipetas y balones aforados**

1. Se lavó y secó al material antes de iniciar su calibración
2. Se taró la balanza analítica con el material volumétrico seco
3. Se midió la temperatura ambiente y la temperatura del agua empleada para la calibración
4. El material a calibrar se llenó de agua hasta su aforo y se pesó
5. El procedimiento anterior se realizó 10 veces por cada material

Tabla I. Verificaciones el material de vidrio usado en el proceso de Validación

Mediciones	Balón de 50mL clase A	Pipeta aforada de 5mL clase A	(25mL)	Bureta Digital (12,5mL)	(2,5mL)
1	49,7911	5,0103	24, 9084	12,4896	2,4950
2	49,7821	5,0075	24,9455	12,4812	2,5012
3	49,8173	4,9995	24,9367	12,4796	2,4889
4	49,7813	5,0059	24,8990	12,4689	2,4970
5	49,7908	5,0077	24,9566	12,4827	2,4980
6	49,7906	5,0100	24,9656	12,4796	2,4908
7	49,8167	5,0043	24,9360	12,4789	2,4878
8	49,807	5,0032	24,8870	12,4670	2,4955
9	49,7957	5,0030	24,9384	12,4685	2,4930
10	49,7809	5,0054	24,8989	12,4622	2,4968
Promedio	**49,7953**	**5,0057**	**24,9272**	**12,4758**	**2,4954**
Factor de corrección Z*	**1,00408**	**1,00371**	**-**	**1,0020**	**-**
Desviación Estándar	**0,0138**	**0,0058**	**0,0270**	**0,0086**	**0,0037**
Exactitud real %	**- 0,0030**	**0,1998**	**0,09≤0,2**	**0,01≤0,4**	**0,02≤2**

Coeficiente V. real %	**0,0276**	**0,0230**	**0,0181≤0,1**	**0,069≤0,2**	**0,1463≤1**
T° ambiente	**26**	**24,6**	**-**	**23,8**	**-**
T° del agua	**25,2**	**23,7**	**-**	**23,4**	**-**

ANEXO C. Preparación de reactivos y soluciones usadas en el desarrollo de las metodologías analíticas para la determinación de nitritos, nitratos, ortofosfatos y nitrógeno amoniacal.

Tabla II. Procedimientos para la preparación de reactivos y soluciones usadas en el desarrollo de las metodologías analíticas.

PARAMETRO	REACTIVO	PREPARACION
Nitritos	Reactivo Colorante	Se añadió 10mL de ácido fosfórico al 85% y 1g de sulfanilamida a 50mL de agua. Tras disolver completamente la sulfanilamida, se adicionó 0,10g de diclorohidrato de N-(1-naftil)-etilendiamida. Posteriormente, se mezcló para disolver y diluir con agua hasta 100mL. Se almacenó en recipiente ámbar y refrigerada por un mes.
Nitratos	Salicilato de sodio al 5%	Se disolvió 2,5g de salicilato de sodio en agua destilada y se diluyó a 50mL.
	Hidróxido de sodio más tartrato doble de sodio y potasio	Se disolvió 400 g de NaOH y 60 g tartrato de sodio y potasio en agua destilada y se diluyó a 1000 ml. La solución se conservó en un frasco de polietileno.
Nitrógeno Amoniacal	Solución tampón de borato	Se agregó 88 mL de solución de NaOH 0,1N a 500 mL de solución de tetraborato de sodio ($Na_2B_4O_7$) aproximadamente 0,025 M (9,5 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$/L) y se diluyó a 1 L. Finalmente la solución se almacenó en un frasco ámbar.
	Solución absorbente de Ácido bórico	Se disolvió 20 g de H_3BO_3 en aproximadamente 800 ml de agua destilada, y se añadió 10 ml de solución indicadora mixta y se diluyó a un 1 litro, se preparó mensualmente.
Ortofosfatos	Ácido sulfúrico 5N	Se diluyó 70mL de H_2SO_4 concentrado a 500 mL de agua destilada.

PARAMETRO	REACTIVO	PREPARACION
	Solución de tartrato antimonio y potasio	Se disolvió 0.2743 g de $K(SbO)C_4H_4O_6$* ½H_2O en 80 mL de agua destilada, y se diluyó en 100mL de agua destilada. Se Almacenó en un frasco de vidrio oscuro y tapado.
	Solución de Molibdato de amonio	Se disolvió 4.0 g de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$*4H_2O en 100 ml de agua destilada. Se almacenó en un frasco ámbar.
	Ácido ascórbico	Se disolvió 0.88 g de ácido ascórbico en 50 mL de agua destilada. La solución es estable por una semana a 4ºC.
	Reactivo Combinado	Se mezclaron los siguientes reactivos en su orden y proporciones en un vaso de precipitados, como sigue: 50 mL de H_2SO_4 5N, 5mL de solución de tartrato antimonio y potasio, 15 mL de solución de molibdato de amonio, 30 mL de solución de ácido ascórbico.

ANEXO D. Valores de la distribución t (99%) para calcular LDM (Limite de Detección del Método).

Tabla III. Valores correspondientes a la distribución t (99%) para el cálculo del Límite de Detección

Valores de la distribución t para calcular LC 95%

Gl	95%	gl	95%	gl	95%	Gl	95%
1	12,71	11	2,20	21	2,08	50	2,01
2	4,30	12	2,18	22	2,07	∞	1,96
3	3,18	13	2,16	23	2,07		
4	2,78	14	2,14	24	2,06		
5	2,57	15	2,13	25	2,06		
6	2,45	16	2.12	26	2,06		
7	2,36	17	2,11	27	2,05		
8	2.31	18	2,10	28	2,05		
9	2,26	19	2,09	29	2,05		
10	2,23	20	2,09	30	2,04		

ANEXO E. Absorbancias obtenidas en el barrido de longitud de onda para el método analítico de nitritos, nitratos y ortofosfatos.

Tabla IV. Absorbancias obtenidas en el barrido de longitud de onda para el método de nitritos

Longitud de onda λ	Absorbancia
500	0,56
505	0,586
510	0,607
515	0,628
520	0,648
525	0,665
530	0,677
535	0,683
536	0,683
537	0,683
538	0,684
539	0,684
540	0,684
541	0,684
542	0,686

Longitud de onda λ	Absorbancia
543	0,686
544	0,686
545	0,684
550	0,678
570	0,602
580	0,542
590	0,485
600	0,419

Tabla V. Absorbancias obtenidas en el barrido de longitud de onda para el método de nitratos.

Longitud de onda λ	Absorbancia
370	0,395
380	0,45
400	0,598
410	0,638
415	0,643
420	0,634
430	0,6
450	0,492
500	0,232

Tabla VI. Absorbancias obtenidas en el barrido de longitud de onda para el método de ortofosfatos

Longitud de onda λ	Absorbancia
800	0,633
850	0,701
870	0,730
875	0,745
880	0,753
885	0,746
890	0,746
900	0,742

ANEXO F. Lectura de blancos y determinación del límite de detección para el método colorimétrico de nitritos, nitratos y ortofosfatos.

Tabla VII. Datos para determinación del límite de detección del método colorimétrico de nitritos

Límite detección para el método colorimétrico de nitritos				
No. De Muestra	**Bk**	**Estándar 0,002 mg/L**	**Estándar 0,005 mg/L**	**Estándar 0,01 mg/L**
1	0,000	0,0016	0,0048	0,0111
2	-0,001	0,0014	0,0049	0,0102
3	0,0010	0,0017	0,0047	0,0098
4	0,003	0,0018	0,0046	0,0095
5	0,001	0,0012	0,0048	0,0096
6	-0,001	0,0013	0,0052	0,0095
7	0,001	0,0015	0,0049	0,0099
8	0,002	0,0012	0,0051	0,0096
9	0,001	0,0014	0,0046	0,0095
10	-0,001	0,0016	0,0049	0,0103
11	-0,002	0,0016	0,0048	0,0092
12	0,001	0,0018	0,0051	0,0102
13	0,001	0,0015	0,0048	0,0107
14	-0,001	0,0017	0,0049	0,0098

Tabla VIII. Datos para determinación del límite de detección del método colorimétrico de nitratos

Límite de detección para el método colorimétrico de nitratos				
No. De Muestras	**Bk**	**Estándar 0,05 mg/L**	**Estándar 0,1 mg/L**	**Estándar 0,2 mg/L**
1	0,00	0,04	0,11	0,21
2	0,01	0,05	0,10	0,21
3	-0,02	0,04	0,12	0,20
4	0,01	0,05	0,12	0,19
5	0,01	0,04	0,10	0,21
6	0,00	0,05	0,10	0,21
7	0,01	0,03	0,12	0,20
8	0,01	0,04	0,11	0,19
9	0,00	0,05	0,10	0,20
10	-0,01	0,04	0,11	0,20
11	0,00	0,05	0,09	0,20
12	0,00	0,04	0,11	0,20
13	0,00	0,04	0,12	0,19
14	0,01	0,045	0,10	0,19

Tabla IX. Datos para determinación del límite de detección del método colorimétrico de Ortofosfatos.

Límite de detección para el método colorimétrico de ortofosfatos

No. De Muestras	Bk	Estándar 0,01 mg/L	Estándar 0,025 mg/L	Estándar 0,05 mg/L
1	0,002	0,013	0,0246	0,046
2	0,002	0,013	0,0246	0,049
3	0,002	0,014	0,0221	0,045
4	-0,009	0,012	0,0280	0,055
5	-0,001	0,016	0,0290	0,051
6	-0,009	0,015	0,0250	0,047
7	-0,060	0,015	0,0270	0,054
8	-0,009	0,016	0,0260	0,045
9	-0,001	0,014	0,0260	0,053
10	0,002	0,013	0,0240	0,054
11	0,002	0,016	0,0260	0,053
12	0,002	0,016	0,0240	0,055
13	-0,009	0,017	0,0250	0,054
14	-0,001	0,026	0,0262	0,053

Tabla X. Datos para determinación del límite de detección del método de destilación – titulación de Nitrógeno Amoniacal.

	Límite de detección para el método de Destilación – Titulación de Nitrógeno Amoniacal		
No. De Muestras	**Bk**	**Estándar 0,5 mg/L**	**Estándar 1,0 mg/L**
1	0,02	0,50	1,0
2	0,03	0,56	0,9
3	0,03	0,56	1,0
4	0,03	0,50	1,0
5	0,03	0,50	1,0
6	0,03	0,56	1,0
7	0,03	0,50	1,0
8	0,02	0,45	1,0
9	0,02	0,45	0,9
10	0,02	0,50	0,9
11	0,02	0,45	0,8
12	0,0	0,50	1,0
13	0,03	0,50	1,0
14	0,02	0,56	1,1

ANEXO G. Resultados de estándares y muestras para la determinación de nitritos, nitratos, ortofosfatos y Nitrógeno Amoniacal

Tabla XI. Resultados obtenidos en la validación de nitritos, estándares y muestras

Blanco	Estándar 0,01 mg/L	Estándar 0,1 mg/L	Estándar 0,2 mg/L	MB mg/L	MBAB mg/L	MBAA mg/L	MA mg/L
0,0010	0,0096	0,1020	0,2100	0,0250	0,0760	0,1170	0,1203
0,0005	0,0098	0,1030	0,2080	0,0250	0,0770	0,1200	0,1213
0,0000	0,0097	0,1020	0,1990	0,0260	0,0770	0,1180	0,1188
0,0003	0,0100	0,1030	0,2080	0,0260	0,0770	0,1190	0,1195
0,0000	0,0100	0,0980	0,2111	0,0260	0,0780	0,1160	0,1186
0,0000	0,0090	0,0980	0,1980	0,0250	0,0760	0,1170	0,1198
0,0001	0,0100	0,1010	0,1950	0,0260	0,0780	0,1180	0,1147
0,0005	0,0100	0,0950	0,1960	0,0260	0,0770	0,1190	0,1156
0,0013	0,0097	0,0950	0,2010	0,0260	0,0770	0,1180	0,1142
0,0002	0,0092	0,0920	0,1980	0,0260	0,0760	0,1170	0,1143
0,0000	0,0091	0,0860	0,2108	0,0220	0,0770	0,1190	0,1096
0,0000	0,0090	0,0840	0,2040	0,0210	0,0780	0,1180	0,1091
0,0000	0,0090	0,1020	0,1960	0,0220	0,0760	0,1180	0,1066
0,0000	0,0110	0,1010	0,2050	0,0210	0,0780	0,1170	0,1065

Tabla XII. Resultados obtenidos en la validación, estándares y muestras para el método de nitratos.

Blanco	Estándar 0,2 mg/L	Estándar 1,0 mg/L	Estándar 2,0 mg/L	Muestra baja mg/L	Muestra baja ad baja mg/L	Muestra baja ad alta mg/L	Muestra alta mg/L
0,00	0,22	1,13	2,06	0,29	0,61	0,78	1,75
0,00	0,22	1,15	2,05	0,28	0,61	0,82	1,74
0,01	0,23	0,97	2,05	0,31	0,60	0,74	1,75
0,01	0,23	0,95	2,01	0,29	0,60	0,89	1,89
-0,01	0,21	0,97	1,99	0,30	0,58	0,75	1,76
0,02	0,20	1,06	2,03	0,29	0,58	0,76	1,72
-0,01	0,21	1,01	2,03	0,31	0,57	0,70	1,73
0,01	0,19	1,03	2,02	0,26	0,56	0,82	1,70
0,01	0,20	1,08	2,03	0,34	0,69	0,79	2,00
-0,02	0,22	1,05	2,07	0,32	0,70	0,75	2,07
0,02	0,18	0,96	2,09	0,31	0,66	0,74	1,98
0,01	0,21	1,08	1,93	0,31	0,59	0,79	2,11
0,01	0,20	1,04	2,04	0,35	0,66	0,76	2,04
0,00	0,21	0,92	2,02	0,29	0,69	0,79	2,04

Fuente: autora

Tabla XIII. Resultados obtenidos en la validación, estándares y muestras para el método de ortofosfatos

Blanco	Estándar 0,05 mg/L	Estándar 0,5 mg/L	Estándar 0,8 mg/L	MB mg/L	MBAB mg/L	MBAA mg/L	MA mg/L
0,0010	0,045	0,511	0,818	0,235	0,511	0,780	0,701
0,0005	0,045	0,518	0,812	0,243	0,553	0,800	0,704
0,0000	0,047	0,514	0,814	0,236	0,565	0,790	0,687
0,0003	0,045	0,518	0,819	0,240	0,552	0,740	0,658
0,0000	0,045	0,517	0,807	0,240	0,543	0,750	0,712
0,0000	0,047	0,518	0,800	0,242	0,556	0,720	0,734
0,0001	0,045	0,510	0,807	0,238	0,546	0,720	0,709
0,0005	0,046	0,500	0,812	0,239	0,542	0,770	0,690
0,0013	0,050	0,520	0,810	0,237	0,523	0,720	0,695
0,0002	0,045	0,520	0,811	0,243	0,556	0,690	0,714
0,0000	0,046	0,550	0,807	0,239	0,570	0,740	0,709
0,0000	0,052	0,551	0,800	0,238	0,590	0,750	0,675
0,0000	0,054	0,548	0,807	0,248	0,543	0,750	0,718
0,0000	0,052	0,543	0,800	0,251	0,561	0,750	0,682

Tabla XIV. Resultados de estándares y muestras Nitrógeno Amoniacal

Fecha	Blanco	Estándar 1,0 mg/L	Estándar 5,0 mg/L	Estándar 80 mg/L	MB mg/L	MBAB mg/L	MBAA mg/L	MA mg/L
26/02/15	0,02	0,95	4,98	76,6	4,48	8,85	13,2	49,6
	0,03	0,90	4,98	76,0	4,59	8,79	13,2	49,4
27/02/15	0,03	1,01	4,98	77,2	5,10	9,86	13,2	48,2
	0,02	1,01	4,93	77,3	4,93	8,85	13,2	49,7
28/02/15	0,03	0,95	4,82	74,6	4,37	8,79	13,2	48,4
	0,02	1,01	4,76	74,6	4,70	9,02	13,2	48,6
03/03/15	0,02	1,01	4,98	77,3	4,59	8,96	13,2	48,5
	0,02	1,01	4,93	76,0	4,59	8,74	13,2	48,2
04/03/15	0,02	0,90	4,98	76,6	4,59	9,02	13,1	47,7
	0,02	0,90	4,98	77,3	4,65	8,96	13,2	47,8
05/03/15	0,02	0,84	4,87	77,3	4,48	9,13	13,2	48,6
	0,02	0,95	4,98	76,6	4,98	8,79	13,2	48,2
06/03/15	0,03	1,01	4,87	77,2	4,54	9,30	13,2	48,5
	0,02	1,06	4,87	77,3	4,87	8,85	13,2	47,7

ANEXO H. Resultados prueba de desempeño IDEAM para los métodos de nitritos, nitratos, ortofosfatos y Nitrógeno Amoniacal.

IDEAM	INFORME DE RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EVALUACION DE DESEMPEÑO - AÑO 2014	Código: M2-SAF-37 Versión: 1.0 Fecha: 2013-02-06

NOMBRE DEL OEC: SIAMA LTDA E-MAIL: info@siamaltda.com, direccintecnica@siamaltda.com

FECHA DE ESTUDIO: 2015-11-04 CODIGO: L96

PRIMERA PARTE: MATRIZ AGUA:

Grupos	Variables / Métodos	Código Muestra	Valor Refer.	Desviac. Estándar	Límite Inferior	Límite Superior	Unidades	Valor Report	Z Score	Ptos Asig	ICS	Puntaje Comp.
1. Iones Principales o Minerales	Alcalinidad total SM 2320 B (Indicador)	LRAA6590	17,03	1,38	14,27	19,78	mg CaCO3/L	16,1	0,67	S	S	100
	Conductividad Eléctrica a 25 ºC SM 2510 B	LRAA6588/89	146,24	3,55	139,14	153,34	µS/cm	141,2	1,42	4	S	80
	Cloruro SM 4500-Cl B	LRAA6588/89	26,82	1,28	24,25	29,39	mg Cl-/L	26,3	0,40	S	S	100
	Calcio Disuelto SM 3111 B	LRAA6588/89	5,03	0,42	4,18	5,88	mg Ca+2/L	4,82	0,49	S	S	100
	Calcio Disuelto SM 3500-Ca B	LRAA6588/89	5,03	0,42	4,18	5,88	mg Ca+2/L	4,98	0,11	S	S	100
	Magnesio Disuelto SM 3111 B	LRAA6588/89	6,27	0,39	5,48	7,05	mg Mg+2/L	6,12	0,37	S	S	100
	Magnesio Disuelto SM 3500-Mg B	LRAA6588/89	6,27	0,39	5,48	7,05	mg Mg+2/L	6,24	0,07	S	S	100
	Potasio SM 3111 B	LRAA6588/89	4,38	0,44	3,50	5,26	mg K+/L	4,32	0,13	S	S	100
	Sodio SM 3111 B	LRAA6588/89	7,82	0,79	6,24	9,40	mg Na+/L	7,71	0,14	S	S	100
	Dureza total SM 2340 C	LRAA6588/89	38,32	1,58	35,16	41,48	mg CaCO3/L	38,1	0,14	S	S	100
	Dureza Cálcica SM 3500-Ca B	LRAA6588/89	12,54	0,88	10,78	14,29	mg CaCO3/L	12,43	0,12	S	S	100
	Dureza Magnésica SM 3500-Mg B	LRAA6588/89	26,26	1,64	22,99	29,53	mg CaCO3/L	25,67	0,36	S	S	100
	Sulfato SM 4500-SO42- E	LRAA6588/89	8,57	0,98	6,62	10,52	mg SO4-2/L	8,54	0,03	S	S	100
5. Nutrientes Simples	Nitrato Salicilato de Sodio - Rodier	LRAA2731	15,53	0,96	13,62	17,44	mg NO-3-N/L	15,2	0,34	S	S	100
	Amonio SM 4500-NH3 B,C	LRAA2731	16,08	1,17	13,75	18,41	mg NH3-N/L	14,6	1,27	4	S	80
	Amonio SM 4500-NH3 D	LRAA2731	16,08	1,17	13,75	18,41	mg NH3-N/L	15,2	0,76	S	S	100
	Ortofosfato como P SM 4500-P E	LRAA2731	2,47	0,17	2,13	2,80	mg PO4-P/L	2,5	0,22	S	S	100
6. Nutrientes Complejos	Nitrógeno Total Kjeldahl SM 4500-Norg C, 4500-NH3 B, C	LRAA6593	26,05	1,54	22,97	29,13	mg N/L	25,4	0,42	S	S	100
	Nitrógeno Total Kjeldahl SM 4500-Norg C, 4500-NH3 B, D	LRAA6593	26,05	1,54	22,97	29,13	mg N/L	26,4	0,23	S	S	100
	Fósforo total SM 4500-P B, E	LRAA6593	3,92	1,91	0,09	7,75	mg P/L	5,38	0,76	S	S	100
7. Nitrito.	Nitrito SM 4500-NO2- B	LRAA6594	3,06	0,18	2,70	3,43	mg NO-2-N/L	3,06	0,01	S	S	100
8. pH	pH SM 4500-H+ B	LRAA6633	4,03	0,04	3,94	4,12	unidades de pH	3,96	1,59	4	S	80

ANEXO I. Equipos Usados en la validación de los métodos analíticos de nitritos, nitratos, ortofosfatos y nitrógeno amoniacal.

Imagen I. Destilador de Nitrogeno Marca VELP. Modelo: UDK – 129

Imagen II. Baño Maria marca Memmert. Modelo: WNB10

Imagen III. Espectrofotómetro Marca HACH. Modelo: 3900

Imagen IV. Bureta Digital marca Brand. Modelo: Titrette