

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE  
CARBONO ORGÁNICO DISUELTO EN AGUAS MARINAS POR COMBUSTIÓN  
CATALÍTICA CON DETECCIÓN MEDIANTE INFRARROJO NO DISPERSIVO  
(IRND)

JOSIMAR LEANDRO ORTIZ PASQUEL

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
PROGRAMA DE QUÍMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2015

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE  
CARBONO ORGÁNICO DISUELTO EN AGUAS MARINAS POR COMBUSTIÓN  
CATALÍTICA CON DETECCIÓN MEDIANTE INFRARROJO NO DISPERSIVO  
(IRND).

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO AL COMITÉ CURRICULAR Y DE  
INVESTIGACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA COMO REQUISITO  
PARCIAL PARA OPTAR EL TÍTULO DE QUÍMICO

JOSIMAR LEANDRO ORTIZ PASQUEL

DIRECTOR:

M.Sc. ROBINSON FIDEL CASANOVAS ROSERO

CO-DIRECTOR  
DAVID ARTURO PERDOMO  
Químico.

CENTRO DE INVESTIGACIONES OCEANOGRÁFICAS E HIDROGRÁFICAS  
DEL PACÍFICO (Cccp)

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
PROGRAMA DE QUÍMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2015

## **NOTA DE RESPONSABILIDAD**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva del autor”

Artículo 1° del acuerdo No 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

---

Robinson Fidel Casanovas Rocero  
Director

---

David Arturo Perdomo  
Co-director

---

Erika Villarroel  
Jurado

---

Sandra Gómez  
Jurado

**San Juan de Pasto, Junio de 2015**

## **AGRADECIMIENTOS**

Mil gracias a al M.Sc. Robinson Fidel Casanovas Rocero por el voto de confianza y la oportunidad de que me dio de desarrollar esta investigación en el Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico (Cccp), por su valiosa asesoría y total confianza depositada en mí y por cultivarme nuevos conocimientos.

A David Arturo Perdomo por su conocimiento, ayuda total, su valioso tiempo de asesoría, correcciones y por creer en mi capacidades

Gracias por despertar ese espíritu de investigación, disciplina, paciencia y perseverancia.

A la M.Sc Ximena Delgado por creer en mí, dándome la oportunidad de desarrollar esta investigación.

Al químico Jesús Reyes Negrete por su conocimiento y ayuda total en el laboratorio.

A Mónica Polo por su total ayuda en el laboratorio.

A los docentes del programa de química de la Universidad de Nariño por su conocimiento que me brindaron.

A los profesionales del Cccp por hacer parte del desarrollo de esta investigación.

## **DEDICATORIA**

A mi padre Jesús de Nazaret por mostrarme el camino en cada momento de mi vida.

A mi madre NELSY J. PASQUEL CABEZAS y mi hermana KATHERINE R. ORTIZ PASQUEL por su sacrificio y total confianza, por sus palabras confortadoras y sus enseñanzas.

A ustedes por siempre presente en mi mente, mi corazón y mi agradecimiento.

A mi tía ANA LILIANA PASQUEL CABEZAS y DANNIS FABIOLA PASQUEL CABEZAS por tenderme su ayuda, por su cariño y buenos deseos.

A toda la familia por que han estado ahí con preocupación o alegría en cada paso de mi vida.

**Josimar L. Ortiz Pasquel**

## RESUMEN

Para hacer un adecuado diagnóstico de la calidad ambiental marina, se hace necesario además de recolectar la información primaria y establecer las fuentes de contaminación, estandarizar y validar los métodos de análisis; De esta manera el objetivo principal de la presente práctica realizada en el Laboratorio de Química del Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico Cccp, fue la determinación de los parámetros de desempeño analíticos necesarios para validar el procedimiento para la cuantificación de carbono orgánico disuelto (COD) en aguas marinas por combustión catalítica mediante infrarrojo no dispersivo.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluyó que el método analítico estudiado produce resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad: exactitud (93,1% y 95,9%), precisión (RSD<5%), límite de detección (0,06 y 0,08 mg/L de COD), linealidad ( $R= 0,9997$ ); y adicionalmente ofrece resultados con incertidumbres muy bajas.

## ABSTRACT

To properly diagnose marine environmental quality, it is also necessary to collect primary data to establish the water quality and identify and characterize the sources of pollution, to standardize and validate methods of analysis; The main objective of this practice conducted in the Chemical Laboratory of the Research Center of the Pacific Oceanographic and Hydrographic Cccp, was the determination of the analytical performance parameters required, in order to perform validation of procedures for quantifying of Dissolved Organic Carbon (DOC) in marine waters with catalytic combustion technique with detection by non-dispersive infrared (NDIR).

According to the results obtained, it was concluded that the analytical methods studied produced precise and accurate results within the specifications and quality attributes: accuracy (93,1% y 95,9%), precision (RSD<5%), detection limit, linearity (0,06 y 0,08 mg/L de COD), established results additionally provide enough uncertainties sufficiently low.

## CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN .....	20
1. OBJETIVOS.....	21
1.1 OBJETIVOS GENERAL.....	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
2. MARCO REFERENCIAL.....	22
2.1 MARCO TEÓRICO .....	22
2.1.1 Carbono Total (CT). .....	22
2.1.2 Fracciones del carbono total (CT). .....	23
2.1.3 Carbono orgánico disuelto (COD) presente en el ecosistema acuático. ....	24
2.1.4 Principales fuente de COD.....	25
2.1.5 Métodos de análisis de COD. ....	25
2.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. ....	26
2.3.1 Etapas de la validación. ....	26
2.3.3 Sensibilidad.....	27
2.3.4 Selectividad/especificidad.....	28
2.3.5 Límite de detección (LOD). ....	29
2.3.6 Límite de cuantificación (LOQ).....	31
2.3.7 Linealidad y rango lineal. ....	31
2.3.8 Precisión. ....	33
2.3.9 Repetibilidad o Capacidad de Repetición. ....	34
2.3.10 Reproducibilidad o capacidad de reproducción. ....	35
2.3.11 Exactitud .....	36
2.3.12 Robustez.....	36
2.4 INCERTIDUMBRE.....	37
2.4.1 Incertidumbre combinada.....	37

2.5 ERROR ALEATORIO EN LA DIRECCIÓN Y DE LA RECTA DE REGRESIÓN.	38
2.6 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS.....	40
3. ANTECEDENTES.....	41
4. METODOLOGÍA.....	43
4.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA.....	43
4.2 CONTEXTO METODOLÓGICO.....	43
4.3 MUESTREO DE AGUA DE MAR.....	45
4.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	46
4.4.1 Filtración de las muestras.....	46
4.5 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	46
4.5.1 Solución stock de 250 mg/L de biftalato de potasio ( $C_8H_5KO_4$ ).....	46
4.5.2 Agua de mar sintética.....	46
4.5.3 Ácido sulfúrico 9N ( $H_2SO_4$ ).....	47
4.5.4 Preparación de blancos fortificados a un nivel de concentración bajo.....	47
4.5.5 Preparación de agua de mar natural fortificadas a un nivel de concentración bajo.....	47
4.5.6 Preparación de blancos fortificados a un nivel de concentración medio.....	47
4.5.7 Preparación de agua de mar natural fortificadas a un nivel de concentración medio.....	47
4.5.8 Preparación blancos fortificados a un nivel de concentración alta.....	47
4.5.9 Preparación de agua de mar natural fortificadas a un nivel de concentración alto.....	47
4.5.10 Preparación de la curva de calibración para el análisis.....	48
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
4.6 ANÁLISIS DE LA MUESTRA.....	48
4.6.1 Pre-tratamiento de la muestra.....	48
4.6.2 Condiciones del equipo para el análisis.....	49

4.7 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA CUANTIFICAR CARBONO ORGÁNICO DISUELTO (COD) POR COMBUSTIÓN CATALÍTICA CON DETECCIÓN MEDIANTE INFRARROJO NO DISPERSIVO (IRND).....	50
4.7.1 Precisión.....	50
4.7.2 Exactitud.....	50
4.7.3 Sensibilidad.....	51
4.7.4 Selectividad.....	51
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
5.1 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COD EN AGUAS MARINAS POR COMBUSTIÓN CATALÍTICA MEDIANTE INFRARROJO NO DISPERSIVO (IRND). ....	52
5.1.1 Linealidad.....	52
5.1.2 Límites de Detección y Cuantificación. ....	55
5.1.3 Sensibilidad.....	56
5.1.4 Precisión.....	56
5.1.5 Exactitud.....	60
5.2 INCERTIDUMBRE.....	61
5.2.1 Estimación de la Incertidumbre.....	61
5.2.1.2 Determinación del mesurando.....	61
5.2.1.3 Análisis de las Variables Involucradas.....	61
5.2.1.4. Incertidumbre de la Medición.....	62
5.2.1.5 Incertidumbre del estándar.....	63
5.2.1.6 Incertidumbre en la preparación del estándar.....	63
5.2.1.6.1 Incertidumbre del volumen.....	63
5.2.1.6.2 Incertidumbre de la repetibilidad.....	63
5.2.1.6.3 Incertidumbre de la tolerancia.....	64
5.2.1.6.4. Incertidumbre del volumen de muestra asociada a la variación de temperatura.....	64
5.2.1.6.5. Incertidumbre estándar asociada a la balanza.....	65

5.3 INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA PREPARACIÓN DE 100 mL DE SOLUCIÓN STOCK DE 250 mgC/L .....	67
5.9 ROBUSTEZ .....	71
CONCLUSIONES .....	74
RECOMENDACIONES .....	75
PRODUCTOS DE LA PRÁCTICA.....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	77

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Análisis de COD en la bahía de Tumaco .....	45
Tabla 2. Niveles de concentración de la curva.....	48
Tabla 3. Datos curva de calibración.....	52
Tabla 4. Análisis de varianza de la recta de regresión lineal. ....	53
Tabla 5. Parámetros asociados a la evaluación de la linealidad de la curva. ....	54
Tabla 6. Señal de blancos de ensayo. ....	55
Tabla 7. Determinación de la precisión en condiciones de repetibilidad.....	56
Tabla 8. Precisión en condiciones de reproducibilidad con blancos fortificados. ...	58
Tabla 9. Prueba t de 2-colas para blancos fortificados. ....	58
Tabla 10. Precisión en condiciones de reproducibilidad con muestra natural fortificada. ....	58
Tabla 11. Prueba t de 2-colas para muestra natural fortificada.....	59
Tabla 12. Determinación de la precisión en condiciones de precisión intermedia .	59
Tabla 13. Determinación de la exactitud por medio del porcentaje de recuperación .....	60
Tabla 14. Incertidumbre de la curva de calibración.....	63
Tabla 15. Incertidumbre debida al balón de 100 mL.....	66
Tabla 16. Incertidumbre debida a los elementos usados en las diluciones. ....	67
Tabla 17. Incertidumbre combinada total.....	70
Tabla 18. Determinación de la robustez. ....	71
Tabla 19. Análisis de COD en la bahía de Tumaco .....	72

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Fracciones del Carbono Total (CT), que muestran los componentes del COT. ....	23
Figura 2. Gráfico de respuesta del analito Vs concentración del analito.....	28
Figura 3. Validación de Métodos de Ensayo y Estimación de La Incertidumbre de Medida Conforme a la Norma ISO/IEC 17025. Límite de decisión y los errores $\alpha$ y $\beta$ suponiendo que la señal analítica sigue una distribución normal. ....	29
Figura 4. Validación de Métodos de Ensayo y Estimación de La Incertidumbre de Medida Conforme a la Norma ISO/IEC 17025, Distribuciones normales del blanco y límite de detección para $\alpha = \beta = 5\%$ , ....	30
Figura 5. Gráfico de linealidad, señal del analito Vs concentración .....	32
Figura 6. Los residuos de y de una regresión lineal.....	39
Figura 7 . Equipo de filtración .....	46
Figura 8. Curva de Calibración. ....	55

## GLOSARIO<sup>1</sup>

**ANALITO:** Sustancia o compuestos que se buscan en el proceso de análisis.

**BLANCO:** Sistema físico que no contiene muestra real y por consiguiente no deberá contener el analito de interés, pero que debe contener todos los reactivos que se utilizan en el método de análisis y son sometidos a las mismas condiciones y al mismo procedimiento que las muestras reales y los estándares.

**CARBONO INORGÁNICO TOTAL (CIT):** El CIT está conformado principalmente por carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), usualmente se encuentra en forma particulada o disuelta<sup>2</sup>.

**CARBONO ORGÁNICO DISUELTO (COD):** Por definición, es la concentración de Carbono que queda en una muestra líquida (sustancia o mezcla de sustancias) después de que todo el carbono particulado ha sido eliminado por filtración y todo el carbono inorgánico ha sido eliminado por acidificación y aireación.

**CARBONO ORGÁNICO NO DISUELTO O PARTICULADO (COND):** Hace referencia al carbono orgánico en partículas, la fracción del COT retenida en un filtro de 0,45 mm.

**CARBONO ORGÁNICO NO PURGABLE (CONP):** Es la cantidad de carbono orgánico remanente después de haber acidificado y burbujeado la muestra. En estas condiciones se remueve el carbono inorgánico total (CIT) y carbono orgánico purgable (COP), quedando en la muestra el CONP que puede ser medido directamente.

---

<sup>1</sup> MINISTERIO DE SALUD DE COSTA RICA. Guía de Validación de Métodos Analíticos. (Consultado: Enero 30 de 2015). <<http://www.ministeriodesalud.go.cr/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>>

<sup>2</sup>Pineda Virginia. Determinación de la evolución térmica de las rocas generadoras de petróleo. [tesis]. Universidad autónoma de México. Facultad de Ingeniería; 2012.

**CARBONO ORGÁNICO PURGABLE (COP):** Hace referencia al carbono orgánico volátil, la fracción del COT extraído de una solución acuosa por eliminación de gases bajo condiciones específicas.

**CARBONO ORGÁNICO TOTAL (COT):** Es la cantidad de carbono unido a un compuesto orgánico y se usa frecuentemente como un indicador no específico de calidad del agua o del grado de limpieza de los equipos de fabricación de medicamentos. Se mide por la cantidad de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) que se genera al oxidar la materia orgánica.

**DISTRIBUCIÓN NORMAL:** Son los resultados de una medición repetida afectada por una o más magnitudes de influencia que varían aleatoriamente, generalmente siguen en buena aproximación una distribución normal (campana de Gauss).

**FORTIFICAR:** Cantidades pequeñas del compuesto de interés que se agregan a la muestra original.

**INCERTIDUMBRE:** una estimación unida al resultado de un ensayo que caracteriza el intervalo de valores dentro de los cuales se afirma que está el valor verdadero.

**MATERIAL DE REFERENCIA (ESTANDARES):** Material o sustancia, en el cual una o más de sus propiedades están suficientemente bien establecidas para que sea usado en la calibración de un aparato, la estimación de un método de medición o para asignar valores a los materiales.

**MATRIZ:** El material en el cual el analito o analitos de interés están presente.

**METODO ANALITICO:** Adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado.

**MUESTRA:** El término se refiere a cada sistema físico que sea sometido al procedimiento de análisis siguiendo el método que se está validando.

**PROCEDIMIENTO ANALITICO:** Forma en que se realiza el análisis. Debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Puede incluir, pero no necesariamente los siguientes conocimientos: características de la muestra, preparación de los estándares de referencia y reactivos, uso de los aparatos o instrumentos, generación de la curva de calibración, uso de fórmulas para los cálculos.

**SESGO:** se usa en el sentido de exactitud de un promedio a largo plazo (valor esperado) de una serie de promedios. Es la diferencia en el valor esperado (teóricamente igual al promedio de un número infinito de valores individuales independientes) del valor verdadero, correcto o asumido.

**CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:** Parámetros bajo los cuales el resultado de una prueba será considerado aceptable.

**CURVA DE CALIBRACIÓN:** Es la representación gráfica de la señal medida como una función de cantidad del analito.

**INCERTIDUMBRE:** Estimación que caracteriza el intervalo de valores, dentro de los cuales se encuentra el valor convencionalmente verdadero de la magnitud medida.

**INTERVALO DE TRABAJO:** Intervalo comprendido entre las concentraciones superior e inferior (incluyendo dichas concentraciones) y para las que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de repetibilidad, recuperación y linealidad.

**INTERVALO LINEAL:** Es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado.

**LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN:** Es la concentración más baja a la cual el analito puede cuantificarse con una precisión y veracidad aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas.

**LÍMITE DE DETECCIÓN:** Es la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones experimentales establecidas.

**MÉTODO NORMALIZADO:** Proceso de medición robusto donde pequeñas variaciones en el procedimiento no deben producir de forma imprevista grandes variaciones en los resultados.

**MÉTODO NO NORMALIZADO:** Método alternativo que demuestra o estima el mismo analito tal cual se mide utilizando el método normalizado.

**PARÁMETRO DE DESEMPEÑO:** Parámetro específico a evaluar en una validación.

**RECUPERACIÓN:** Cantidad del analito recuperada en la porción de muestra o muestra adicionada cuando esta es conducida a través del método analítico completo, y que permite evaluar la eficiencia de la extracción, proceso de preparación e interferencias que puedan existir al aplicarlo. Se expresa en términos de porcentaje.

**REPETIBILIDAD:** Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método en intervalos cortos de tiempo.

**REPRODUCIBILIDAD (PRECISIÓN INTERMEDIA):** Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por dos analistas o instrumentos diferentes, usando el mismo método en diferentes días.

**RESPUESTA ANALÍTICA:** Lectura obtenida al aplicar un método analítico, como pueden ser el área o altura del pico en un cromatograma, lectura de absorbancia, cuentas de iones en un Espectro de Masas, lectura en mV, mL gastados en volumetría, diferencia de peso en un gravimétrico, entre otros.

**RESULTADO DE ENSAYO:** Valor de un mensurando obtenido tras la realización de un método de ensayo específico.

**ROBUSTEZ:** Es la medida de la capacidad del método analítico de permanecer inalterado por pequeñas, pero deliberadas variaciones (efecto de cambio en las condiciones) en los parámetros del mismo, proporcionando un índice de su confiabilidad durante su uso normal.

**SELECTIVIDAD:** Es la capacidad de un método analítico para medir solamente lo que se pretende que se mida.

**SENSIBILIDAD:** Es el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito. Es la pendiente del intervalo de trabajo y cuanto mayor es esta, mayor es la sensibilidad del método.

**VALIDACIÓN:** Es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método, satisfacen los requisitos para su aplicación analítica.

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

$\mu_{co}$	Desviación o error aleatorio de la curva de calibración
A1	Analista uno (1)
A2	Analista dos (2)
ADFMC	Agua dulce fortificado a media concentración
ASI-L	Automuestreador del equipo Shimadzu
BCOFAC	Blanco fortificado a alta concentración
BCOFBC	Blanco fortificado a baja concentración
BCOFMC	Blanco fortificado a media concentración
$C_8H_5KO_4$	Biftalato de potasio
Cccp	Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del
Pacífico	
$CO_2$	Dióxido de carbono
COD	Carbono Orgánico Disuelto
CONP	Carbono Orgánico No Purgable
COP	Carbono Orgánico Purgable
CV	Coefficiente de variación
$CV_H$	Coefficiente de Horwitz
$H_2SO_4$	Ácido sulfúrico
IRRND	Infrarrojo No Dispersivo
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de magnesio heptahidratado
MNFAC	Muestra natural fortificada a alta concentración
MNFBC	Muestra natural fortificada a baja concentración
MNFMC	Muestra natural fortificada a media concentración
mV	Mili -voltios
NaCl	Cloruro de sodio
S	Desviación estándar
$S_a$	Desviación o error aleatorio en el intercepto
$S_b$	Desviación o error aleatorio en la pendiente
$S_{y/x}$	Desviación o error aleatorio en la dirección Y de la curva
$t_{tab}$	t-student tabulado
X	media aritmética

## INTRODUCCIÓN

La contaminación por COD es una de las mayores problemáticas del medio ambiente marino costero. El principal inconveniente que presenta este carbono orgánico es que absorbe radiación UV en longitudes cortas afectando a las comunidades planctónicas, la cual es fuente de alimentación de la especie de este ambiente costero. Otro tópico que hay que tener en consideración en la contaminación de las aguas marinas por carbono orgánico disuelto fácilmente oxidable de origen natural y/o antrópico (contaminación por actividad humana), es que ésta puede ser consumida como fuente de alimentación y energía por microorganismos degradadores, generando un fenómeno que disminuye la disponibilidad de oxígeno para el resto de organismos acuáticos de tal forma que, si la cantidad de carbono orgánico a degradar es importante, puede conducir al medio hacia condiciones de hipoxia (diminución del oxígeno disuelto), provocando la muerte a los organismos acuáticos<sup>3</sup>.

Actualmente, la comunidad científica se ha vuelto cada vez más exigente ante la aceptación de estudios que estén relacionados con la toma de decisiones ambientales, sobre todo en lo referente con los niveles de concentración de contaminantes. Para determinar dichos niveles se hace necesario llevar a cabo procesos de estandarización y validación de las metodologías analíticas utilizadas, con objetivo de cumplir con los requisitos de selectividad, sensibilidad, precisión, exactitud y estimación de la incertidumbre<sup>4</sup>.

Como respuesta a lo anterior la presente investigación tiene como propósito determinar los parámetros de desempeño analítico necesarios para la validación de la metodología analítica para la cuantificación de Carbono Orgánico Disuelto (COD) en aguas marinas, con el fin de consolidar, fortalecer y otorgar confiabilidad a la información generada en el Laboratorio de Química del Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico, Cccp.

---

<sup>3</sup> CUBRELLATI. Ricardo O. Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo: Aspectos prácticos de la validación e Incertidumbre en medidas químicas; 2010. ISBN 978-987-96413-8-5.

<sup>4</sup> Aguirre Leticia, García Teresa, Juncadella Marta. AEFI. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria: Validación de Método Analíticos. Monografía. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad; 2001.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 OBJETIVOS GENERAL.**

Validar una metodología analítica para la cuantificación de Carbono Orgánico Disuelto (COD) en aguas marinas, por combustión catalítica con detección mediante infrarrojo no dispersivo NDIR.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

Implementar la metodología analítica para la cuantificación de COD en aguas marinas de la costa Pacífica de Nariño en base al método estándar 5310B "Standard Methods".

Documentar los parámetros de validación para la determinación de COD en aguas marinas en el laboratorio del Cccp

Analizar Carbono Orgánico Disuelto (COD) en muestras de aguas marinas de la costa de Tumaco mediante el método estandarizado.

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1 MARCO TEÓRICO

**2.1.1 Carbono Total (CT).** El CT está presente en todas las aguas superficiales y marinas poco profundas. Todo el material carbonado está compuesto por organismos vivos y muertos, productos de excreción de los microorganismos, materiales biológicos degradados y productos del metabolismo de las algas y hongos. Estos son arrastrados de los suelos circundantes a los cuerpos de aguas donde generan una gran variedad de subproductos orgánicos complejos los cuales son responsables de la contaminación<sup>5</sup>

El CT está formado por sustancias químicas que son polielectrolitos aniónicos de bajo a moderado peso molecular, cuya carga se debe principalmente a los grupos carboxílico y fenólico. Dichas sustancias son ácidos fúlvicos (más solubles) y ácidos húmicos (menos solubles) entre otros, los cuales componen hasta el 80% de la materia orgánica natural en el agua<sup>6</sup>

Los compuestos orgánicos de carbono se encuentran clasificados en tres compartimentos: materia viva en partículas, materia muerta en partículas y materia muerta disuelta.

El CT es el parámetro más significativo y uno de los menos estudiados en la hidrografía mundial. Su importancia radica en que podría decirse que resume las características de cualquier fuente hídrica, pues el carbono orgánico representa la fijación de carbono y la descomposición de materia orgánica, por lo tanto es un indicador de contaminación.

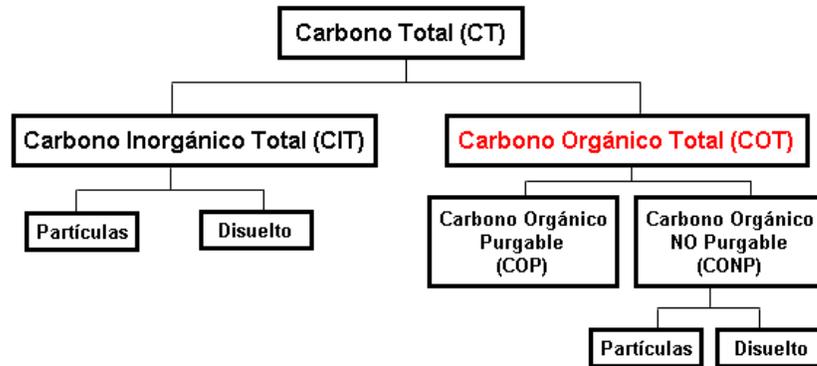
---

<sup>5</sup> Roger N, REVEE, (2002). Introduction to environmental analysis. Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd.

<sup>6</sup> Martínez Andrés Alfonso. Modelamiento del proceso de remoción de materia orgánica natural – NOM – mediante la adición de carbón activado en polvo – PAC. [tesis]. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de minas. Ingeniero Químico. Medellín; 2006.

**2.1.2 Fracciones del carbono total (CT).** El CT está compuesto de diferentes fracciones de carbono, tanto orgánico como inorgánico como se observa en la figura 1:

**Figura 1. Fracciones del Carbono Total (CT), que muestran los componentes del COT.**



**Fuente:** <http://www.kossodo.com/pdf/SkalarFormacsTOCTNSpanish.pdf>

De acuerdo con la figura 1 se muestra a continuación sus definiciones:

**Carbono Orgánico Total (COT):** Es la cantidad de carbono unido a un compuesto orgánico y se usa frecuentemente como un indicador no específico de calidad del agua o del grado de limpieza de los equipos de fabricación de medicamentos. Se mide por la cantidad de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) que se genera al oxidar la materia orgánica.

**Carbono Orgánico No Purgable (CONP):** Es la cantidad de carbono orgánico remanente después de haber acidificado y burbujeado la muestra. En estas condiciones se remueve el carbono inorgánico total (CIT) y carbono orgánico purgable (COP), quedando en la muestra el CONP que puede ser medido directamente.

**Carbono Orgánico Disuelto (COD):** Por definición, es la concentración de Carbono que queda en una muestra líquida (sustancia o mezcla de sustancias) después de que todo el carbono particulado ha sido eliminado por filtración y todo el carbono inorgánico ha sido eliminado por acidificación y aireación.

Carbono Orgánico No Disuelto O Particulado (COND): Hace referencia al carbono orgánico en partículas, la fracción del COT retenida en un filtro de 0,45 mm.

Carbono Orgánico Purgable (COP): Hace referencia al carbono orgánico volátil, la fracción del COT extraído de una solución acuosa por eliminación de gases bajo condiciones específicas.

Carbono Inorgánico Total (CIT): El CIT está conformado principalmente por carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), usualmente se encuentra en forma particulada o disuelta<sup>7</sup>.

### **2.1.3 Carbono orgánico disuelto (COD) presente en el ecosistema acuático.**

La presencia de COD tiene muchos efectos sobre los ecosistemas, disminuyen el oxígeno disuelto impidiendo la producción de nutrientes y absorben la radiación solar en longitudes de onda corta UV, dañinas para el fitoplancton, zooplancton los cuales son fuente de alimentación para peces, llegando a alterar los ecosistemas acuáticos. A su vez, altas concentraciones de COD reducen la productividad primaria cambiando la estructura de las comunidades planctónicas.<sup>8</sup>

Las altas concentraciones de COD por lo general se encuentran en aguas superficiales debido a las actividades del mismo ecosistema, generalmente estos cambios en concentración se debe por ejemplo a la excreción de algas y descomposición orgánica de partículas. El fitoplancton es el principal productor de COD, bajo condiciones rápidas de crecimiento, y considerablemente bajo un número limitado de nutrientes, el incremento de COD puede exceder debido a la fijación de carbono en la incorporación como material celular. Por lo tanto la concentración de COD es el resultado de un conjunto amplio de los procesos de producción, de consumo y de transformación, debido a la actividad biológica en las diferentes capas del agua<sup>9</sup>

---

<sup>7</sup> Molina G. Luz Karime. Estudio Preliminar del Carbono Orgánico Disuelto en los Ríos Orinoco, Bitá y Meta, en el Área de Influencia de Puerto Carreño [tesis]: Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias Biológicas. Bogotá-Colombia; 2002.

<sup>8</sup> *Ibíd.*

<sup>9</sup> Cinzia De Vittor, Alessandro Paoli, Serena Fonda Umani. Dissolved Organic Carbon Variability in a Shallow Coastal marine System (Gulf Of Trieste, Northern Adriatic Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 78; 2008. p 280-290.

**2.1.4 Principales fuente de COD.** Las fuentes alóctonas y autóctonas, son las principales fuentes COD en los sistemas acuáticos. Las fuentes alóctonas son nutrientes o material orgánico que se han incorporado al ecosistema acuático de forma artificial, provienen de aguas, atmosfera, hojas, troncos, cortezas, entre otros. Las fuentes autóctonas son seres vivos propios del ecosistema acuático, evolutivamente adaptados al ecosistema<sup>10</sup>. Básicamente cada una de estas fuentes mencionadas acrecienta el aumento en la concentración de COD generando alteraciones a los ecosistemas costeros.

**2.1.5 Métodos de análisis de COD.** Los primeros métodos para el análisis de carbono orgánico disuelto fueron poco refinados comparados con los métodos actuales. Estos trabajos iniciales consistieron en una oxidación química, así como la detección de carbono orgánico disuelto resultante por valoración volumétrica del CO<sub>2</sub>. Generalmente después de una titulación el gas reaccionaba con sulfatos. Este enfoque alcanzó un mayor rendimiento, al utilizar un método de oxidación, que se realizaba con una mezcla de dicromato de potasio y ácido sulfúrico (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) seguida de una valoración colorimétrica. Otros métodos fueron posteriormente propuestos para el análisis de carbono orgánico disuelto mediante la oxidación con persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) catalizada por radiación ultravioleta determinando la medición de CO<sub>2</sub>. Posteriormente un método por combustión a altas temperaturas, fue realizado para la determinación del carbono orgánico disuelto en muestras de agua de mar.<sup>11</sup>

## **2.2 ESTÁNDAR MÉTODO (CARBONO ORGÁNICO DISUELTO 5310B)**

Son organismos internacionales de normalización que proporciona métodos oficiales de ensayo en el análisis de aguas que se deben aplicar en laboratorio, para garantizar el control de calidad del agua como: captación de la muestra, tiempos máximos de almacenamiento de muestras, metodologías analíticas el desarrollo y validación de métodos analíticos para alcanzar la visión de “confianza internacional en resultados analíticos”.

Con lo anterior se determinó el método de análisis de COD, denominado por este organismos como 5310B, se utilizó en el Laboratorio del centro de investigación Oceanográfico e Hidrográfico del Pacífico para el proceso de validación. Es importancia no ignorar que el método mencionado no se debe utilizar para

---

<sup>10</sup> Hosny I. Emara. Total Organic Carbon Content in the Waters of the Arabian Gulf. Environment International, Vol 24, No. ½, pp. 97-103; 1998. PII S0160-4120(97)00125-6.

<sup>11</sup> Sharp Jonathan H. Total Organic Carbon in Seawater- Comparacion of Measurements Using Persulfate Oxidation and High Temperature Combustion. Marine Chemistry, 1; 1973. 211-229.

analizar COD sin una validación adicional, por medio del método de oxidación a alta temperatura<sup>12</sup>.

## 2.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas, mediante estudios sistemáticos de laboratorio y demostrativos, de que un método de análisis es lo suficientemente fiable y reproducible para generar resultados confiables dentro de intervalos definidos. El proceso de validación permite el conocimiento de las características de funcionamiento del método y proporciona un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo<sup>13</sup>. La validación permite evaluar el funcionamiento del método analítico con base a unos pilares denominados parámetros analíticos, permitiendo así la obtención de resultados confiables<sup>14</sup>.

### 2.3.1 Etapas de la validación.

Dentro de la validación de un método analítico existen diferentes etapas que son:

**Selección del método a validar:** para ello se realiza la respectiva revisión bibliográfica, con el objeto de analizar y estudiar los procedimientos reportados y aplicados con anterioridad y definir los parámetros (condiciones por cumplir) de los procedimientos a validar, de acuerdo con las necesidades en cuanto a rango del método y precisión. Posteriormente se procede a elaborar los protocolos en donde se define los objetivos específicos de las evaluaciones a efectuar, se establecen las variables de interés que se quieren monitorear, además de incluir los criterios de aceptación o la comparación de resultados con los niveles permisibles o resultados esperados.

---

<sup>12</sup> Standard methods. For the Examination of Water & Wasterwater, 22<sup>nd</sup> Edition. American Public Healt Association, Washington, DC 20001-3710. Método 5310B "High-Temperaure Combustion Method; 2012 p 5-23 a 5-25.

<sup>13</sup> Aguirre Leticia, García Teresa, Juncadella Marta. AEFI. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria: Validación de Método Analíticos. Monografía. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad; 2001.

<sup>14</sup> Hernández Ballesteros Bertha Angélica. Validación de Método Analítico por HPLC Para Disolución de Levonorgestrel 1.5 mg Grageas. Universidad de Veracruzana [tesis]. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. Veracruz-Mexico; 2014.

**Montaje del método:** consiste en la realización de todas las pruebas experimentales. En este ítem se encuentra también incluida la cuantificación de los parámetros de interés en muestras reales y el análisis de interferencias.

**Validación del método:** comprende el tratamiento estadístico de los datos obtenidos experimentalmente. Para realizar la validación de un metodología analítica se debe tener en cuentas parámetros relacionados con los resultados obtenidos en un ensayo. A continuación se mencionan cada uno de los parámetros de validación:

- Sensibilidad
- Selectividad/especificidad
- Límite de detección y cuantificación.
- Intervalo lineal y linealidad.
- Exactitud: Veracidad (sesgo)
- Precisión (repetibilidad, reproducibilidad)
- Recuperación
- Incertidumbre
- Robustez

**2.3.3 Sensibilidad.** La sensibilidad se define como la capacidad que presenta un método analítico para discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito presente en la muestra<sup>15</sup>. La sensibilidad se encuentra relacionada con la pendiente [m] que arroja la curva de calibración y también es un parámetro estadístico que corresponde a la desviación estándar de la señal del analito en una concentración dada<sup>4</sup>. El valor de sensibilidad obtenido [m] debe permitir una adecuada discriminación de los valores de concentración en base a la lectura<sup>16</sup>. Para evaluar la sensibilidad se debe tener en cuenta la pendiente de la curva de calibración así como los límites de detección y cuantificación.

En figura 2, se puede observar que mientras más próxima al eje de las Y este la recta, significa que a ligeros cambios en las concentraciones esperadas habrá grandes variaciones en los resultados de las lecturas observadas [m2] En el caso

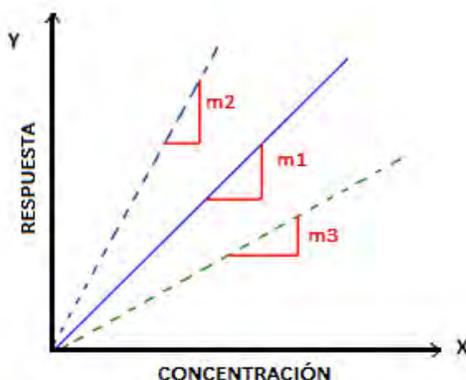
---

<sup>15</sup> Medina J. Jessica, Quinto Jorge Berrocal. Validación de Método Analítico de Valoración de Naproxeno Sódico 550 mg. Tableta por Cromatografía Líquida de Alta Performance. [tesis]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento Académico de Química Básica y Aplicada. Lima -Perú; 2008.

<sup>16</sup> Duffau Boris, Rojas Fabiola, Guerrero Isabel. Instituto de salud pública. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos. Chile; 2010.

de [m3] grandes cambios en la concentración no son significativos para la lectura.<sup>17</sup>

**Figura 2. Gráfico de respuesta del analito Vs concentración del analito.**



**Fuente:** HERNÁNDEZ Marta. Valladolid-España; 2013. Validación de Métodos de Ensayo y Estimación de La Incertidumbre de Medida Conforme a la Norma ISO/IEC 17025. Curva de calibración (respuesta vs concentración)

**2.3.4 Selectividad/especificidad.** La selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra. Por otro lado tenemos un término especificidad este se utiliza como sinónimo del anterior, aunque debería reservarse para aquellas situación donde la respuesta obtenida solo se puede producir con una única entidad química, algo que no es posible cuando se refiere procedimientos analíticos que emplea instrumentación no específica. Como hay pocos métodos que den respuesta sólo a un único analito, el termino selectividad es normalmente más apropiado<sup>18</sup>. Este parámetro es muy importante al validar una metodología porque permite identificar y eliminar interferencias en la matriz de estudio.

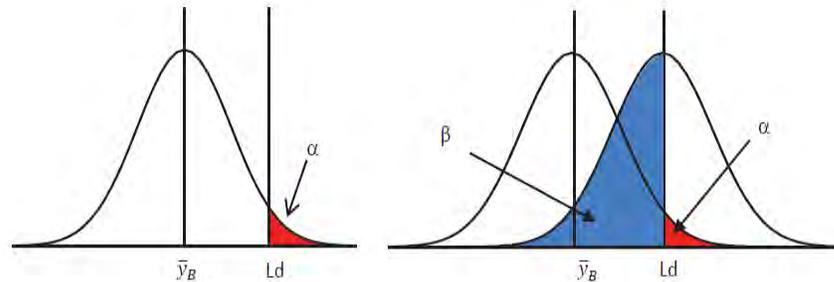
<sup>17</sup> Skoog, D., West, D.M., Holler, F.J., & Crouch, S.R. Fundamentos de Química analítica. Octava edición. México. Thompson editores S.A; 2005. p. 94-96, 218,219.

<sup>18</sup> Eurachem/Citac. Guide the fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics.1998.<http://www.eurachem.org/images/stores/Guides/pdf/valid.pdf> consultado en 20 abril de 2015.

**2.3.5 Límite de detección (LOD).** El límite de detección (LOD) se define como la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar. Aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales. Este parámetro comprueba que la cantidad del analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón, entre otras)<sup>19</sup>.

En la figura 3 se muestra los errores (tipo I y II) al determinar el límite de detección, Si el error es de tipo I o  $\alpha$  significa que hay probabilidad de que se dé falsos positivos (es el error que se comete cuando el investigador rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) siendo ésta verdadera) y si el error es de tipo II o  $\beta$  hay probabilidad de dar falsos negativos (este error se comete cuando el investigador no rechaza la hipótesis nula siendo ésta falsa)<sup>20</sup>.

**Figura 3. Validación de Métodos de Ensayo y Estimación de La Incertidumbre de Medida Conforme a la Norma ISO/IEC 17025. Límite de decisión y los errores  $\alpha$  y  $\beta$  suponiendo que la señal analítica sigue una distribución normal.**



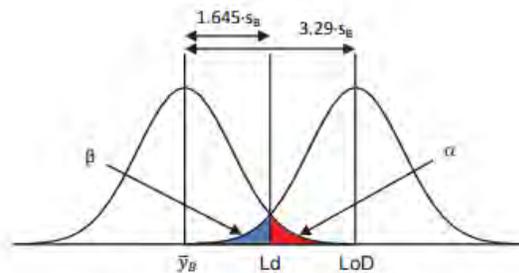
**Fuente:** HERNÁNDEZ Marta. Valladolid-España; 2013. Validación de Métodos de Ensayo y Estimación de La Incertidumbre de Medida Conforme a la Norma ISO/IEC 17025. Límite de decisión y los errores  $\alpha$  y  $\beta$  suponiendo que la señal analítica sigue una distribución normal.

<sup>19</sup> Asociación Española de farmacéuticos de la industria (AEFI), Op. Cit, p 70-71 Autoridad nacional de licencias ambientales (ANLA) [en internet]. Resolución 1016(dic7,2012)en:[http://www.anla.gov.co/documentos/12549\\_res\\_0402\\_290414.pdf](http://www.anla.gov.co/documentos/12549_res_0402_290414.pdf)

<sup>20</sup> HERNÁNDEZ, Marta. Validación de Métodos de Ensayo y Estimación de La Incertidumbre de Medida Conforme a la Norma ISO/IEC 17025. Límite de decisión y los errores  $\alpha$  y  $\beta$  suponiendo que la señal analítica sigue una distribución normal. Pág. 16. Valladolid-España; 2013

Anteriormente, se admitía  $k_D = 3$  con lo que  $\alpha = 0.13\%$ . Hoy en día, la IUPAC y la ISO proponen  $\alpha = \beta = 5\%$  por lo que el valor de  $k_D$  ahora es  $2 \times 1,645 = 3,29$ . Como se muestra en la figura de 4.

**Figura 4. Validación de Métodos de Ensayo y Estimación de La Incertidumbre de Medida Conforme a la Norma ISO/IEC 17025, Distribuciones normales del blanco y límite de detección para  $\alpha = \beta = 5\%$ .**



Fuente: Ibíd.

La determinación del límite de detección se encuentra relacionada con la curva de calibración, uno de los métodos para determinar este valor es a partir de la ecuación 1:

$$LOD = \frac{K S_B}{m} \quad \text{Ecuacion 1.}$$

Donde:

- K es el factor de confianza
- $S_B$  es la desviación estándar del blanco
- M es la sensibilidad de la calibración

Según la literatura se elige un factor k de 2 o 3. Donde el valor  $k = 2$  corresponde a un nivel de confianza del 92,1%, por otro lado el valor K de 3 corresponde a un nivel de confianza del 98,3%<sup>16</sup>. Matemáticamente se calcula a través de la ecuación 2

$$y_{LOD} = \hat{y}_B + K_D \cdot S_B \quad \text{Ecuacion 2.}$$

Donde:

$\hat{y}_B$  Es el valor medio de los ensayos realizados utilizando el blanco de reactivos.

$S_B$  Es la desviación estándar de estas medidas del blanco

$K_D$  Es una constante relacionada con el nivel de confianza deseado  $\alpha$ , con un  $K_D$  inicial de 3.

**2.3.6 Límite de cuantificación (LOQ).** El límite de cuantificación mide el funcionamiento del método que suele expresarse como señal del valor (verdadero) de la medición que producirá estimaciones con una desviación estándar relativa (RSD) generalmente de 10 % (o 6 %) <sup>21</sup>. El LOQ se calcula mediante la siguiente ecuación 3:

$$y_{LOQ} = \hat{y}_B + K_D \cdot S_B \quad \text{Ecuacion 3.}$$

Básicamente el límite de cuantificación es la señal del blanco más 10 veces la desviación estándar del blanco.

**2.3.7 Linealidad y rango lineal.** La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o promedio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Siempre que sea posible se busca una respuesta de tipo lineal que facilitara su trazado, interpolación e interpretación. El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito <sup>11</sup>. El intervalo de respuesta lineal se puede evaluar mediante el criterio del coeficiente de correlación de la recta y por el análisis de varianza. La recta obtenida es una estimación de la verdadera recta y se considera estadísticamente válida, si los valores de respuesta no se desvían significativamente del valor medio de la recta de mejor ajuste y la pendiente es significativamente cero <sup>22</sup>

---

<sup>21</sup> Garfield, F.M. 1991. Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories. AOAC International.

<sup>22</sup> Asociación Española de farmacéuticos de la industria (AEFI). Validación de métodos analíticos. Cataluña. 2001.p57-94

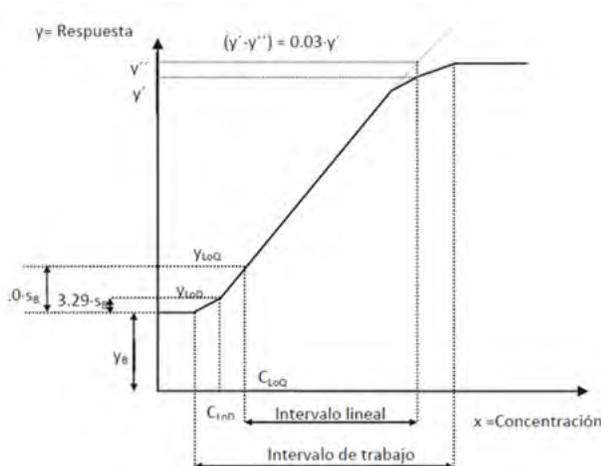
La linealidad normalmente se calcula a partir de una recta, por mínimos cuadrados. Donde la pendiente y la varianza son los que determinan la linealidad<sup>23</sup>.

Para el cálculo de la linealidad es necesario la ecuación 4 como se muestra a continuación.

$$y = mx + b \quad \text{Ecuación 4.}$$

Con el fin de determinar el rango lineal se puede realizar mediante un gráfico de concentración versus respuesta instrumental, que se conoce como función respuesta (normalmente llamada recta de calibrado). Esta se establece cada día con blancos fortificados (patrón de referencia), que cubran el intervalo de trabajo. Es necesario abarcar valores cercanos al cero y valores superiores al valor de interés concentraciones normales COD de aguas marinas (1 y 5 mg/L). El número de puntos a analizar deberá ser establecido por el analista. Ver figura 5.

**Figura 5. Gráfico de linealidad, señal del analito Vs concentración**



**Fuente:** ibíd.

A manera general la figura 5 muestra los intervalos a baja, media y alta concentración del analito, donde no es posible detectar el analito ya que la única señal obtenida es la que corresponde al blanco. Un segundo intervalo a

<sup>23</sup> Medina J. Jessica, Quinto Jorge Berrocal. Validación de Método Analítico de Valoración de Naproxeno Sódico 550 mg. Tableta por Cromatografía Líquida de Alta Performance. [tesis]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento Académico de Química Básica y Aplicada. Lima -Perú; 2008.

concentraciones intermedias del analito, llamado intervalo de trabajo o intervalo dinámico, donde la señal varía con la concentración. Dentro de este intervalo pueden diferenciarse tres tramos. Y por último un primer tramo acotado por la concentración cuya señal empieza a diferir de la señal del blanco y el límite de cuantificación.

Para obtener un rango de trabajo lineal o intervalo lineal en la curva de calibración es necesario tener un punto de baja concentración el cual corresponde al límite de cuantificación obtenido a partir del blanco y el límite superior se establece como la concentración a partir de la cual el equipo proporciona una señal que se aparta de la linealidad en un 3%. En este tramo la relación señal/concentración permanece constante.

**2.3.8 Precisión.** La precisión mide el grado de acuerdo entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito, donde se tiene como criterio de aceptación una desviación estándar relativa (RSD) menor o igual al 15% para análisis de matrices biológicas<sup>14</sup>. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. Las condiciones en que se mide la precisión se dividen, según opinión general, en condiciones repetibles y condiciones reproducibles.

El objetivo del estudio de precisión es conocer la variabilidad del método, ya que esta es debida a errores aleatorios inherentes del mismo. Debido a estos errores los análisis efectuados sobre muestras idénticas y en las mismas condiciones, no conducen a resultados idénticos<sup>17</sup>. Este es un parámetro que expresa la variación en los resultados de una medida analítica en términos de coeficiente de variación (CV).

La precisión se evalúa a través de las siguientes ecuaciones:

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

Por otro lado tenemos la desviación estándar muestral que no es más que un indicador de la verdadera desviación estándar poblacional ( $\sigma$ ), a la que pertenecen los valores obtenidos cuando se tiene un numero de medidas grandes ( $n > 30$ ), por lo cual la desviación estándar muestral ( $s$ ) se considera un indicador

de mayor confiabilidad de ( $\sigma$ ), la desviación estándar muestral<sup>24</sup>. A continuación se muestra el cálculo:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n}} \quad \text{Ecuación 6.}$$

Cuando se utiliza la desviación estándar relativa, DER, esta nos ofrece resultados mucho más claro sobre la dispersión con referencia a la magnitud medida. En la literatura se ve expresada como porcentaje. También es conocida como coeficiente de variación (CV) se calcula de la siguiente forma:

$$DER = \frac{S}{\bar{X}} \quad \text{Ecuación 7.}$$

$$\%DER = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Ecuación 8.}$$

Básicamente las ecuaciones mencionadas son las más comunes para evaluar la precisión en términos repetibilidad y la reproducibilidad. Donde la repetibilidad da idea de la clase de variabilidad que puede esperarse, cuando un método es realizado por un solo analista en un mismo equipo durante un período corto<sup>3</sup>. Es muy importante comparar los resultados obtenidos entre varios laboratorios para obtener una valoración más significativa de la precisión y es la reproducibilidad.

**2.3.9 Repetibilidad o Capacidad de Repetición.** La repetibilidad de las condiciones existe cuando el mismo analista analiza muestras el mismo día y con el mismo instrumento (por ejemplo, analizador COT-L) y en el mismo laboratorio. Cualquier cambio de estas condiciones (por ejemplo, diferentes analistas, diferentes días, diferentes instrumentos, diferentes laboratorios) implica que las condiciones sólo serán reproducibles.<sup>25</sup>

El análisis de la repetibilidad implica utilizar parámetros estadísticos como lo es la desviación estándar o también el coeficiente de variación (CV). En el laboratorio es posible determinar la repetibilidad tomando un número de un lote homogéneo y

---

<sup>24</sup> Miller, N, J, Miller, C. Estadística y quimiometría para química analítica. 4 Ed. Madrid. Pearson. 2002. p. 296. ISBN 84-205-3514-1.

<sup>25</sup> Jofre Viviana Rosario. Validación De La Metodología Analítica Para La Determinación De Ácidos Grasos En Aceites De Oliva Extra Virgen [tesis]: Universidad De Chile. Facultad De Ciencias Químicas Y Farmacéuticas. Departamento De Ciencia De Los Alimentos Y tecnología química laboratorio de química de alimentos y materias grasas. Santiago De Chile; 2009.

a su vez van acompañados del valor medio, desviación estándar y finalmente por el intervalo de confianza del valor medio, su ecuación es la siguiente:

$$U = \bar{X} \pm t_{(n-2)} \cdot S \quad \text{Ecuación 9.}$$

Donde:

$\bar{X}$  Media de los resultados en n mediciones

S Es la desviación estándar de los datos estadísticos

t Es conocido como un dato estadístico con un nivel de confianza

(n – 2) Es el grado de libertad

Existe algo muy importante al trabajar con la desviación estándar donde este parámetro es inversamente proporcional a la concentración del analito. Este parámetro es evaluado en el laboratorio tomando como mínimo 9 análisis, se debe cubrir el intervalo especificado en el método. Podemos tener 3 réplicas con diferentes concentraciones<sup>26</sup>. Como es el caso para la determinación de COD en aguas marinas donde se tuvo en cuenta concentraciones de baja, media y alta.

**2.3.10 Reproducibilidad o capacidad de reproducción.** La reproducibilidad nos da a entender el grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo analito de un material idéntico realizadas utilizando el mismo método en condiciones diferentes. Por ejemplo, analizadores diferentes, laboratorios diferentes. Los resultados deben expresarse en términos de desviación estándar de la reproducibilidad, coeficiente de variación de la reproducibilidad o intervalo de confianza del valor medio<sup>27</sup>. Este parámetro es conveniente evaluarlo por medio del coeficiente de variación de Horwitz (CVH), cumpliendo el criterio de aceptación de reproducibilidad si el coeficiente de variación obtenido en los ensayo es menor a  $(CV < 2/3CVH)^{17}$ .

---

<sup>26</sup> B. Jorgue G. Validación de método Analítico de Valoración de Amoxicilina en Polvo para Suspensión Oral Producción por Betapharma S.A. Mediante HPLC. [tesis]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador; 2011.

<sup>27</sup> Ibid.

**2.3.11 Exactitud.** La exactitud se define como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia. El término “exactitud”, esta aplicado a un conjunto de resultados de un ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios y un componente común de error sistemático o sesgo. Cuando se aplica a un método de ensayo, el término “exactitud” se refiere a una combinación de veracidad y precisión<sup>28</sup>.

En la ecuación 10 se muestra la forma de evaluar la exactitud por medio de la veracidad en términos de porcentaje de recuperación, realizando una adición de estándares de concentración conocida en la muestra y evaluando estadísticamente las diferencias significativas obtenidas de porcentajes de recuperación en los ensayos con una prueba de t-student.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{CF - CU}{CA} \quad \text{Ecuacion 10.}$$

Donde:

CF: concentración de analito medida en muestra fortificada  
CU: concentración de analito medida en muestra sin fortificar  
CA: concentración del estándar adicionado

Por medio de la recuperación se logra observar el rendimiento de un método analítico en cuanto a la cantidad del analito existente en la muestra original. Por lo cual, la recuperación esta intrínsecamente relacionada con las características de la matriz<sup>15</sup>.

**2.3.12 Robustez.** La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método (cambios en una o más de las condiciones de trabajo); se dice que un método es robusto cuando se puede demostrar su invariabilidad durante el uso normal. Cuando se estudia esta característica de un método analítico, pueden ser determinadas las variables con efectos más significantes sobre el método y además definir las formas de controlarlas durante su uso<sup>29</sup>. La robustez permite demostrar la estabilidad del método al alterarse condiciones en la metodología y no verse alterado los resultados.

---

<sup>28</sup> ICH Q2A. Text on validation of Analytical procedures: Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology.1995. [En línea]. <http://www.pharma.gally.ch/ich/q2a038195en.pdf>>. Consultado en 29 de abril de 2015.

<sup>29</sup> Ibíd.

## 2.4 INCERTIDUMBRE.

Es fundamental para un proceso de validación establecer la incertidumbre en las mediciones del método de ensayo. La incertidumbre de la medición está definida como “Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando a partir de la información que se utiliza”<sup>17</sup>.

**2.4.1 Incertidumbre combinada.** La incertidumbre asociada a la medida presenta una probabilidad de cobertura de aproximadamente un 95%. La incertidumbre de una medición es el parámetro asociado al resultado, es decir, caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al mensurando<sup>15</sup>. En este sentido, es importante que para un método validado, se realice la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presentes teniendo en cuenta una distribución normal del 95%.

Dado a que una de las mayores fuentes de incertidumbre consideradas es la curva de calibración del equipo y su respectiva regresión<sup>30</sup>. En este aspecto se evalúa dicho efecto de la siguiente manera:

$$\mu_C = \sqrt{\left(\frac{\partial C}{\partial C_0}\right)^2 * \mu_{C_0}^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial V_m}\right)^2 * \mu_{V_m}^2 + \left(\frac{\partial C}{\partial V}\right)^2 * \mu_{V_e}^2} \quad \text{Ecuación 11}$$

Finalmente la Incertidumbre expandida con un factor de cobertura (k=2) para un nivel del 95% de confianza está dada por la ecuación 12:

$$U = k * u = 2 * u \quad \text{Ecuación 12}$$

Antes de comparar y combinar contribuciones de la incertidumbre que tienen distribuciones diferentes, es necesario distinguir dos métodos principales para estimar las fuentes de Incertidumbre: El Método de Evaluación Tipo A está basado en un análisis estadístico de una serie de mediciones, mientras el Método de Evaluación Tipo B comprende todas las demás maneras de estimar la incertidumbre, es decir se evalúa por un juicio científico basado en toda la

---

<sup>30</sup> Hsu, K. & Chen, C. The effect of calibration equations on the uncertainty of UV-Vis spectrophotometric measurements. Measurement; 2010. 43, 1525-1531.

información disponible acerca de la variabilidad de las mediciones. Entre ésta se pueden incluir:

- datos de mediciones anteriores ;
- experiencia o conocimiento general acerca del comportamiento y propiedades de materiales de referencia, patrones o instrumentos ;
- especificaciones del fabricante ;
- datos provistos en calibraciones u otros certificados
- incertidumbres asignadas a datos de referencia tomados de manuales.

Cabe mencionar que esta clasificación no significa que exista alguna diferencia en la naturaleza de los componentes que resultan de cada uno de los dos tipos de evaluación, puesto que ambos tipos están basados en distribuciones de probabilidad. La única diferencia es que en las evaluaciones tipo A se estima esta distribución basándose en mediciones repetidas obtenidas del mismo proceso de medición mientras en el caso de tipo B se supone una distribución normal (es decir atribuidas a mediciones repetida afectada por una o más magnitudes de influencia que varían aleatoriamente, generalmente siguen una distribución normal (campana de Gauss), con base en experiencia o información externa)<sup>31</sup>. En la práctica esta clasificación no tiene consecuencia alguna en las etapas para obtener una estimación de la incertidumbre combinada.

## 2.5 ERROR ALEATORIO EN LA DIRECCIÓN Y DE LA RECTA DE REGRESIÓN.

Cuando se utiliza una recta de regresión lineal para estimar la concentración de una muestra está por general suele presentar errores aleatorios, por esta razón es de gran importancia estimar este error, denominado estadístico  $S_{y/x}$  (errores aleatorios en la dirección Y).

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{Ecuación 13}$$

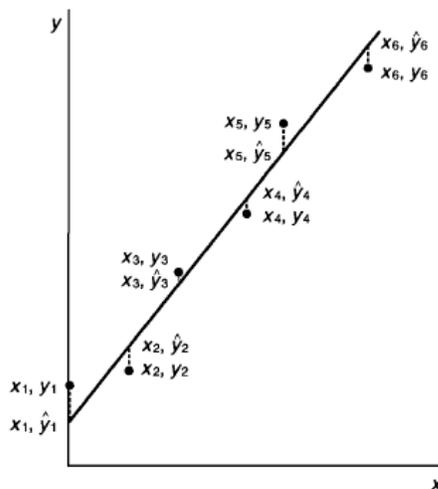
Se comprueba que la ecuación 5 utiliza los residuos de  $(y, y_i - \hat{y}_i)$ , donde los valores de  $\hat{y}_i$  son los puntos sobre la recta de regresión calculada correspondientes a los valores individuales de X, es decir, los valores de y <<ajustados>> (Figura 6). El valor de  $\hat{y}_i$  para un valor de x dado se calcula

---

<sup>31</sup> Guía para estimar la incertidumbre de la medición / CENAM / WSchmid y RLazos / Mayo 2000.

rápidamente a partir de la ecuación de regresión. La ecuación 13 es claramente similar a la forma de la desviación estándar de una serie de medidas repetidas (Ecuación 5), pero difiere en que las desviaciones,  $(y_i - \bar{y}_i)$ , se sustituye por los residuos  $(y_i - \hat{y}_i)$ , conteniendo el denominador el termino  $(n-2)$  en vez de  $(n-1)$ <sup>32</sup>.

**Figura 6. Los residuos de y de una regresión lineal.**



Una vez obtenido un valor de  $S_{y/x}$ , se puede calcular el error aleatorio de la pendiente (b) y del intercepto (a) por medio de la ecuación 14 y 15.

Desviación estándar de la pendiente (b):

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (X_i - \bar{X})^2}} \quad \text{Ecuación 14}$$

Desviación estándar del intercepto (a):

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i X_i^2}{n \sum_i (X_i - \bar{X})^2}} \quad \text{Ecuación 15}$$

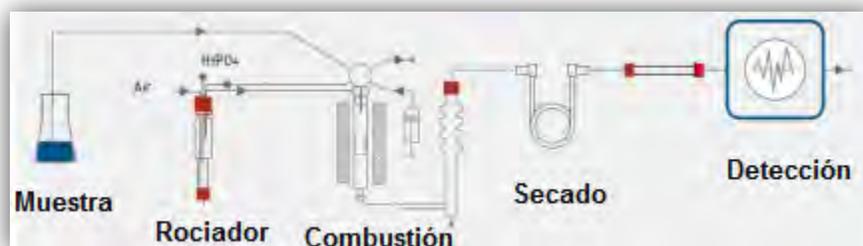
<sup>32</sup> Miller, N, J, Miller, C. Estadística y quimiometría para química analítica. 4 Ed. Madrid. Pearson. 2002. p. 296. ISBN 84-205-3514-1.

Los valores de  $S_b$  y  $S_a$  se pueden utilizar para estimar los límites de confianza de la pendiente y de la ordenada en el origen. Así pues los límites de confianza de la pendiente vienen dados por  $b \pm t_{(n-2)}S_b$ , donde el valor  $t$  se obtiene para un nivel de confianza deseado y  $(n-2)$  grados de libertad. De la misma manera se estima los límites de confianza para la ordenada en el origen vienen dados por  $a \pm t_{(n-2)}S_a$ <sup>33</sup>.

## 2.6 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA DE ANALISIS

La técnica de análisis determina el contenido de carbono orgánico disuelto (DOC) en muestras líquidas. Se basa en el principio de oxidación por combustión catalítica a 680 °C. La muestra es introducida mediante un sistema de inyección a la cámara de combustión donde es oxidada formando dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) que posteriormente pasa por la celda de detección de infrarrojo no dispersivo (NDIR); este detector es un tipo de espectroscopia de IR, se basa en el principio de que las moléculas de gas absorben la luz IR y la absorción de un cierto gas se produce a una longitud de onda específica. Por último se crea una señal que se traduce en forma de pico gaussiano y luego un procesador calcula su área en unidades de milivoltios (mV)<sup>34</sup>. Como se muestra en el esquema 1.

**Esquema 1. Principio de funcionamiento de la técnica de análisis.**



<sup>33</sup> *Ibíd.*

<sup>34</sup> Shimadzu Institute for Research technologies [página en internet]. Shimadzu center For Advanced Analytical Chemistry [consultado 26 agosto 2014]. Disponible en: <http://www.uta.edu/sirt/scaac/equipment/toctmnl/toctmnl.php>.

### 3. ANTECEDENTES

En todos los campos de análisis se necesitan métodos de análisis fiables, la comunidad internacional reconoce, que los laboratorios deben adoptar medidas adecuadas para asegurar que son capaces de proporcionar datos de la calidad exigida. La validación de los métodos analíticos, es un componente esencial de las medidas que debe aplicar un laboratorio para obtener datos analíticos fiables; La IUPAC ha elaborado algunas directrices para la validación de métodos de análisis por un solo laboratorio, estas directrices constituyen con recomendaciones mínimas sobre los procedimientos que deben aplicarse para asegurar la validación apropiada de métodos de análisis<sup>35</sup>.

Con respecto a los estudios realizados sobre carbono orgánico a nivel mundial merece relacionar diferentes métodos abordados por distintos autores, como son:

(Emara, 1998) Durante las últimas décadas, prestado gran atención al estudio de la materia orgánica en el medio marino. Aunque la materia orgánica es sólo un componente minoritario en el agua de mar, esta desempeña un papel importante en procesos geológicos y bioquímicos. En este estudio por medio de la técnica de combustión a altas temperaturas se obtuvo niveles característicos de concentración en las aguas costeras entre 1 y 1,5 mg C/ L de COD; estos valores fueron comparados con los niveles normales de COD para aguas costeras reportados que se encuentran entre 1,5 a 2,0 mg/L de COD para el océano Índico, Pacífico y Atlántico<sup>36</sup>.

(Tugrul., 1993) Realizó la comparación de las concentraciones de COT mediante dos (2) técnicas de oxidación catalítica (persulfato-UV y de alta temperatura). Las concentraciones de carbono orgánico Total (COT) se determinaron en aguas del Mar de Marmara, utilizando la técnica de oxidación catalítica a alta temperatura utilizando un equipo Shimadzu COT y la oxidación con el método de persulfato-UV. Los valores de COT en las aguas profundas del mar de Marmara fueron del 60 y el 73  $\mu\text{M}$  por la técnica a alta temperatura y de 40 hasta 50  $\mu\text{M}$  por el método de oxidación catalítica persulfato con UV. Los valores de COT obtenidos por ambos métodos en muestras de aguas profundas anóxicas del Mar Negro varió entre 105 y 130  $\mu\text{M}$ <sup>37</sup>.

---

<sup>35</sup> IUPAC. (2002) Validación por un solo laboratorio, examen de las directrices armonizadas para la validación de métodos de análisis. Budapest -Hungría, Noviembre.

<sup>36</sup> Ibid.

<sup>37</sup> Suleyman Tugrul. Comparison of COT Concentrations by Persulphate-UV and High-Temperature Catalytic Oxidation Techniques in the Marmara and Black seas. Marine Sciences Institute, Middle

(Covelli. S, 2009) realizó la cuantificación de carbono orgánico (DOC) en agua de mar por medio del método HTCO utilizando una unidad comercial Shimadzu COT 5000<sup>a</sup> provista de una columna de cuarzo de combustión rellena con de plata sobre almohadas de sílice con un diámetro aproximado de 3mm, donde antes de la inyección la muestra de agua de mar fue filtrada, acidificada con una solución de HCl y purgada durante con burbujeo de oxígeno de alta pureza, el muestreo se realizó en dos puntos denominados A1 y A2 obteniendo concentraciones de COD en agua dulces ( 2,84 y 4,09 mgL<sup>-1</sup> )<sup>38</sup>.

---

East Technical University, P.O. Box 28, Erdemli 33731, Icel. Turkey. Marine Chemistry, 41; 1993. p 265-270 265.

<sup>38</sup> Covelli Stefano Recent contamination of mercury in an estuarine environment. Marano lagoon, Northern Adriatic, Italy; 2009. p. 274-276.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones de Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico (Cccp), ubicado al extremo sur de la Costa Pacífica Colombiana en el municipio de Tumaco que corresponde administrativamente al departamento de Nariño.

### 4.2 CONTEXTO METODOLÓGICO

En este estudio se desarrolló la validación de un método de análisis para la cuantificación del carbono orgánico disuelto (COD) como indicador de contaminación de aguas marinas, por la técnica de combustión catalítica mediante infrarrojo no dispersivo (IRND). Se utilizó la metodología correspondiente al método 5310B<sup>39</sup> del "Standard Methods". Para determinar la concentración de COD presente en agua de mar se trabajó con un equipo Shimadzu COT-L CPH/CPN, el cual tiene como base la técnica de oxidación total de los compuestos orgánicos no volátiles a CO<sub>2</sub> a través de una combustión catalítica a 680 °C. La muestra de agua de mar filtrada, se acidifica y airea con oxígeno antes de la combustión. La muestra se introduce en una columna de combustión empacada con pequeñas esferas de alúmina cubiertas con platino las cuales se mantienen a 680 °C. La cantidad de CO<sub>2</sub> producido durante este proceso se mide mediante un Detector de Infrarrojo No-Dispersivo (IRND).

Características de los equipos utilizados para el análisis de carbono orgánico disuelto:

#### **Shimadzu COT-L:**

- Parámetros de análisis: TC, TOC, TIC, DOC, NPOC, POC
- Introducción de muestra: Muestras líquidas de forma manual.
- Rango de análisis: 0 – 60.000 mg/l en líquidos.
- Límite de detección: (NDIR) 6 µg/l (ppb).
- Precisión: < 1% a > 5 mg/l Carbono

---

<sup>39</sup> American Public Health Association, American Water Works Association y Water Pollution Control Federation Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (1994) 14th, edition. Mét. 5310B.

- Tiempo de análisis: 3-4 min por parámetro.

#### **Mettler Toledo:**

- Dimensión de medida mg-g
- Valores del Certificado CLM 88514 de 2014-06-21 (Balanza AB204S)
- serie: 1129450037
- Modelo: AB 204-S
- Rango: 10 mg-220 g
- División de escala: 0,0001 g
- Magnitud medida: masa
- Linealización: Autolinealización automática de la curva de pesada (simultáneamente con ajuste proFACT a motor).
- Corta-aíres de vidrio: Sin vástagos; se abre automáticamente a motor o por pulsación.
- Sensibilidad:  $\pm 1,5$  ppm/ $^{\circ}$ C
- Indicador con DeltaTrac®: LCD (cristal líquido).

#### **Desionizador Smart 2 Pure:**

- Flujo agua ultrapura: 1 litro/minuto
- Producción agua por osmosis: 3 o 6 L/hora
- Control por microprocesador
- Pantalla de control de posición ajustable
- Bomba de presión integrada y bomba de recirculación
- Modelos UV con oxidación UV 185/254 nm
- Conductividad: 0,055  $\mu$ s/cm
- COT: 5-10 ppb

### Mufla MF-2002:

- Control de temperatura digital tipo PID
- Temporizador digital 99 hora 59 min con alarma audible
- Visualización de temperatura por medio de un display amplio y LED de alta luminosidad
- Resolución: 1 dígito
- Temperatura programable
- Interruptor luminoso que indica la puesta en marcha
- Entrada superior para termómetro de verificación
- Temperatura: Hasta 1200°C
- Precisión:  $\pm 5,0$  °C a 800 °C

### 4.3 MUESTREO DE AGUA DE MAR

Una apropiada técnica de muestreo y manejo de las muestras son esenciales para la buena calidad de los datos. Cuidados deberán ser considerados para minimizar la contaminación de la muestra. Se recomienda que el personal que a realizar el muestreo use guantes, para evitar la contaminación de la muestra<sup>40</sup>.

Se monitorearon cinco (5) estaciones de la bahía de Tumaco, a nivel superficial en marea baja como se muestra en la (tabla 1), y se recolectaron las muestras en recipientes de vidrio de 500 mL previamente lavados para su posterior tratamiento y análisis.

**Tabla 1. Análisis de COD en la bahía de Tumaco**

<b>Estaciones</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>
Playa del Morro	1°48'48.48"N	78°44'11.61"W
Muelle Residencias	1°48'13.46"N	78°45'59.43"W
Muelle Cccp	1°49'11.82"N	78°43'43.86"W
Puente el Pindo	1°48'09.41"N	78°46'50.43"W
Puente del morro	1°49'07.73"N	78°45'17.84"W

<sup>40</sup> Instituto Colombiano De Norma Técnica Y Certificación NTC-ISO 5667-1. Gestión ambiental. Calidad de agua. Muestreo. directrices para el diseño de programas de muestreo. Bogotá: ICOTEC. 1995

## 4.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

**4.4.1 Filtración de las muestras.** Se dejó que muestra alcanzara la temperatura ambiente, posteriormente se filtró 500 mL de agua de mar a través de un filtro (figura 7) de fibra de vidrio Whatman GF/F de tamaño de poro nominal entre 0,4 - 0,7  $\mu\text{m}$ . Este proceso elimino la materia orgánica particulada la cual pude obstruir los orificios de la jeringa de inyección del analizador de Carbono Orgánico. La muestra se preservó en botellas de vidrio ámbar entre 1°C y 5°C y se analizó al siguiente día.

**Figura 7. Equipo de filtración**



## 4.5 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

**4.5.1 Solución stock de 250 mg/L de biftalato de potasio ( $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ ).** Se pesó 0,0528 g de biftalato de potasio anhidro ( $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ ) previamente tratado (secado a 120 °C por 2h y llevado al desecador durante 30 min). Posteriormente se disolvió y aforo a 100 mL con agua de mar sintética y se preservó en un recipiente ámbar a 4 °C durante dos (2) meses.

**4.5.2 Agua de mar sintética.** Se pesó 25 g de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) y 8 g de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) en agua desionizada tipo I y se aforo a 1 L. El protocolo para la preparación de agua de mar sintética se realizó a partir del procedimiento administrativo LAQ-PA-011 establecido por el laboratorio del Cccp.

**4.5.3 Ácido sulfúrico 9N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).** Se midió 62,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se aforo con agua desionizada a 250 mL. La solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> preparada tuvo una concentración de 9N. La solución se preservó en un recipiente color ámbar a 4 °C. Esta solución eliminó el carbono inorgánico presente en la muestra en forma de carbonatos y bicarbonatos (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

**4.5.4 Preparación de blancos fortificados a un nivel de concentración bajo.** Se midió 0,1 mL de la solución stock de biftalato de potasio (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub>), se pasó a un balón volumétrico de 50 mL y se aforo con agua de mar sintética. La solución preparada presentó una concentración de 0,5 mg C/L (punto de control). La solución se preservó en un recipiente color ámbar a 4 °C.

**4.5.5 Preparación de agua de mar natural fortificadas a un nivel de concentración bajo.** Se midió 0,1 mL de la solución stock de biftalato de potasio (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub>), se pasó a un balón volumétrico de 50 mL y se aforo con agua de mar natural. La solución preparada presentó una concentración de 0,5 mg C/L (punto de control). La solución se preservó en un recipiente color ámbar a 4 °C.

**4.5.6 Preparación de blancos fortificados a un nivel de concentración medio.** Se midió 0,6 mL de la solución stock de biftalato de potasio (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub>), se pasó a un balón volumétrico de 50 mL y se aforo con agua de mar sintética. La solución preparada presentó una concentración de 3 mg C/L (punto de control). La solución se preservó en un recipiente color ámbar a 4 °C.

**4.5.7 Preparación de agua de mar natural fortificadas a un nivel de concentración medio.** Se midió 0,6 mL de la solución stock de biftalato de potasio (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub>), se pasó a un balón volumétrico de 50 mL y se aforo con agua de mar natural. La solución preparada presentó una concentración de 3 mg C/L (punto de control). La solución se preservó en un recipiente color ámbar a 4 °C.

**4.5.8 Preparación blancos fortificados a un nivel de concentración alta.** Se midió 1,4 mL de la solución stock de biftalato de potasio (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub>), se pasó a un balón volumétrico de 50 mL y se aforo con agua de mar sintética. La solución preparada presentó una concentración de 7 mg C/L (punto de control). La solución se preservó en un recipiente color ámbar a 4 °C.

**4.5.9 Preparación de agua de mar natural fortificadas a un nivel de concentración alto.** Se midió 1,4 mL de la solución stock de biftalato de potasio (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>KO<sub>4</sub>), se pasó a un balón volumétrico de 50 mL y se aforo con agua de mar natural. La solución preparada presentó una concentración de 7 mg C/L (punto de control). La solución se preservó en un recipiente color ámbar a 4 °C.

**4.5.10 Preparación de la curva de calibración para el análisis.** Se preparó los patrones de la curva de calibración midiendo los volúmenes de la solución stock de biftalato de potasio de concentración de 250 mg/L indicados en la tabla 2. Se llevó en todos los casos a un volumen final de 50 mL utilizando balón aforado y agua de mar sintética.

En la calibración de la curva fue necesaria la utilización de 9 muestras de agua de mar sintética a diferentes niveles de concentración como se reporta en la tabla 2. Este proceso se realizó por triplicado para evidenciar la mejor curva de calibración, utilizando el método de regresión lineal por mínimos cuadrados (LMS).

**Tabla 2. Niveles de concentración de la curva.**

Concentración de patrón (mg/L)	Volumen de solución de 250 mg/L
0,25	0,05
0,5	0,1
1,0	0,2
1,5	0,3
2,0	0,4
3,0	0,6
5,0	1,0
7,0	1,4
9,0	1,8

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los cálculos de la validación del método para la cuantificación de Carbono orgánico Disuelto (COD) se hicieron utilizando el programa Excel 2007 con adición manual de las ecuaciones reportadas en el libro de Estadística Y Quimiometría Para Química Analítica De Miller. El análisis estadístico se realizó para un nivel de confianza del 95%.

## **4.6 ANÁLISIS DE LA MUESTRA.**

### **4.6.1 Pre-tratamiento de la muestra**

- Permitir que las muestras alcancen temperatura ambiente.
- Ajustar a pH < 2 acidificando la muestra con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

**4.6.2 Condiciones del equipo para el análisis.** Las condiciones del analizador para medir el carbono orgánico disuelto son las siguientes:

- Temperatura de combustión: 680°C
- Gas transportador: Oxígeno de alta pureza
- Velocidad de flujo del gas: 150 mL/min
- Tiempo de aireación de la muestra: 2,0 min
- Número mínimo de inyecciones 3
- Número máximo de inyecciones 5
- Numero de lavados: 2
- Desviación estándar máxima: 0,1
- CV máximo :2%
- Volumen de inyección: 100 µL
- Porcentaje de ácido: 1.5%
- Dilución (1/1) para cada análisis.

La corrida del análisis comienza con un blanco (agua de mar sintética) y un punto medio de control de concentración conocida (3 mgC/L) seguido de las muestras. A continuación se muestra el proceso de preparación de las para cada análisis mencionado anteriormente:

Se midió 20 mL de agua de mar sintética, se transfirió a un vial de 24 mL, se adicione 1,5% de ácido sulfúrico 9N, se cubrió con septa, tapa de rosca y se burbujeo durante 15 min.

Posteriormente se midió 20 mL de biftalato de potasio con concentración de 3 mg C/L (punto de control de concentración media) y se transfirió a un vial de 24 mL, se cubrió con septa y tapa de rosca.

Por último se midió 20 mL de muestra de agua de mar tratada (filtrada), se transfirió a un vial de 24 mL, se cubrió con septa y tapa de rosca y se analizó. Por último el análisis genero una señal de área en unidades de milivoltios (mV), que por interpolación de la recta de regresión lineal se determinó a la concentración de COD.

Es de suma importancia analizar un blanco y un estándar de concentración conocida para evaluar el desempeño del instrumento durante el análisis.

## 4.7 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA CUANTIFICAR CARBONO ORGÁNICO DISUELTO (COD) POR COMBUSTIÓN CATALÍTICA CON DETECCIÓN MEDIANTE INFRARROJO NO DISPERSIVO (IRND).

Consideraciones a tener en cuenta para evaluar la precisión y exactitud:

BCOF: Blanco fortificado  
MNFAC: Muestra Natural fortificada a alta concentración  
BCOFBC: Blanco Fortificado a baja concentración  
MNFBC: Muestra Natural fortificada a baja concentración.  
BCOFMC: Blanco Fortificado a media concentración.  
MNFMC: Muestra Natural fortificada a media concentración.  
BCOFAC: Blanco Fortificado a alta concentración.  
ADFMC: Agua dulce o potable fortificada a media concentración.  
A1: Analista 1  
A2: Analista 2

**4.7.1 Precisión.** La repetibilidad se estudió preparando y analizando una muestra de forma consecutiva 11 veces. La repetibilidad del método se evaluó preparando tres (3) muestras a niveles de concentraciones diferentes (baja, media y alta), las cuales se analizaron independientemente desde la preparación hasta el análisis de los resultados en condiciones de repetibilidad, en otras palabras en las mismas condiciones de análisis. La precisión intermedia se evaluó de igual manera que la repetibilidad pero con la diferencia que este parámetro se verificó durante un periodo de tiempo (en tres fechas diferentes), mediante el cálculo de del coeficiente de variación (CV) versus el criterio de aceptación ( $CV < 2/3CV_H$ ) del coeficiente variación de Horwitz ( $CV_H$ ).

**4.7.2 Exactitud.** Mediante el método de adición de patrón estándar, se evaluó la exactitud con tres (3) niveles de concentración (baja, media y alta), realizando 11 determinaciones. Los resultados se expresaron en términos de veracidad como porcentaje de recuperación con respecto a la cantidad conocida del estándar añadido sobre la muestra.

Experimentalmente a tres muestra (3) de agua mar se fortificaron a tres (3) niveles de concentración: baja (0,5 mg/L), media (0,6 mg/L) y alta (1,4 mg/L) a partir de una solución stock de biftalato de potasio ( $C_8H_5KO_4$ ), todas las muestras se llevaron a un volumen de 50 mL para posteriormente obtener las señales tanto de muestras con el estándar (fortificadas) como de las muestras sin estándar (sin fortificar) y aplicar el cálculo del porcentaje de recuperación.

**4.7.3 Sensibilidad.** Para determinar la sensibilidad se realizaron 3 curvas de calibración y se eligió la curva que presentaba el mejor coeficiente de correlación, (criterio de aceptación  $r = 0,997$ ) y la que tenía mayor pendiente por lo tanto mayor sensibilidad.

**4.7.4 Selectividad.** Este parámetro se evaluó al fortificar la muestra natural (agua de mar) en un nivel medio de concentración de la curva la cual fue de 3 mgC/L y posteriormente se calculó el porcentaje de recuperación, para evidenciar la presencia de interferentes.

**4.7.5 Robustez.** La robustez del método analítico se estableció analizando dos (2) muestras fortificadas: agua de mar y agua potable (MNFMC y ADFMC) a un nivel de concentración medio (3 mgC/L), teniendo en cuenta como factor de robustez la variación de la salinidad.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COD EN AGUAS MARINAS POR COMBUSTIÓN CATALÍTICA MEDIANTE INFRARROJO NO DISPERSIVO (IRND).

**5.1.1 Linealidad.** Para comprobar o evaluar la relación lineal entre la señal (Área, mV) y la concentración se determinó la ecuación de regresión lineal y se calculó: la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación ( $r$ ), y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), de la línea de regresión o curva de calibración ajustada mediante el método de los mínimos cuadrados, teniendo como criterio de aceptación coeficientes de correlación mayor o igual a 0,997 ( $r \geq 0,997$ ) o de determinación mayor o igual a 0,995 ( $r^2 \geq 0,995$ ) como se muestra en la (tabla 3)<sup>17</sup>.

**Tabla 3. Datos curva de calibración.**

Patrón (mg/L)	Área. Corregida	Área		
0,25	0,8	1,80		
0,50	1,6	2,47		
1,00	3,4	4,23		
1,50	5,2	6,03		
2,00	6,8	7,69		
3,00	10,4	11,3		
5,00	17,6	18,5		
7,00	24,5	25,4		
9,00	32,4	33,2		
Blanco	0,8823			
<b>Ecuación de Regresión Lineal</b>	<b>Intervalo de Confianza</b>			
	<b>Pendiente</b>	<b>Intercepto</b>		
Curva: $3,5850x + 0,6246$	$3,5850 \pm 0,0643$	$0,6246 \pm 0,2806$		
<b>Errores</b>	<b>S<sub>y/x</sub></b>	<b>S<sub>b</sub></b>	<b>S<sub>a</sub></b>	<b>μ<sub>co</sub></b>
Recta de regresión	0,2022	0,0231	0,1009	0,0624
<b>Coeficiente</b>	<b>Calculado</b>	<b>Criterio de Aceptabilidad</b>		
Correlación ( $r$ )	0,9998	$r_{cal} \geq 0,997$		
Determinación ( $r^2$ )	0,9997	$r^2_{cal} \geq 0,995$		

Fuente: Autor

Se obtuvo como primera medida de verificación de la linealidad un coeficiente de correlación de  $r = 0,9998$ , y un coeficiente de determinación de  $r^2 = 0,9997$ ; cumpliéndose así el criterio de aceptación cualitativo de verificación de linealidad.

Como segunda medida para la verificación de linealidad fue necesario determinar los errores aleatorios (error de la concentración X, error de la señal instrumental ( $S_{y/x}$ ) o error en la dirección Y, error de la pendiente ( $S_b$ ) y error del intercepto ( $S_a$ )). En la tabla 4 y 5 se muestra los datos del análisis de residuos tanto del eje Y como del eje X procedentes de la curva de calibración, con estos datos se calculó los errores aleatorios mencionados anteriormente, teniendo en consideración las ecuaciones 4, 14 y 15.

**Tabla 4. Análisis de residuos de la recta de regresión lineal.**

No.	$X_i$	$Y_i$	$X_i - \langle x \rangle$
1	0,2500	1,6990	-3,0000
2	0,5000	2,4690	-2,7500
3	1,0000	4,2330	-2,2500
4	1,5000	6,0340	-1,7500
5	2,0000	7,6870	-1,2500
6	3,0000	11,2600	-0,2500
7	5,0000	18,4700	1,7500
8	7,0000	25,4000	3,7500
9	9,0000	33,2300	5,7500
<b>Suma</b>	<b>29,2500</b>	<b>110,482</b>	<b>0,0000</b>
<b>Promedio</b>	<b>3,2500</b>	<b>12,2758</b>	<b>0,0000</b>

$(X_i - \langle x \rangle)^2$	$(Y_i - \langle y \rangle)$	$(Y_i - \langle y \rangle)^2$	$(X_i - \langle x \rangle)(Y_i - \langle y \rangle)$	$Y_i$ calculada	$(Y_i - \langle y \rangle)^2$	$X_i^2$	$(Y_i - Y_{calc})$	$(Y_i - Y_{calc})^2$
9,0000	-10,5768	111,8682	31,7303	1,5208	2,3130	0,0625	0,1782	0,0317
7,5625	-9,8068	96,1729	26,9686	2,4171	5,8423	0,2500	0,0519	0,0027
5,0625	-8,0428	64,6863	18,0963	4,2096	17,7206	1,0000	0,0234	0,0005
3,0625	-6,2418	38,9598	10,9231	6,0021	36,0248	2,2500	0,0319	0,0010
1,5625	-4,5888	21,0569	5,7360	7,7946	60,7551	4,0000	-0,1076	0,0116
0,0625	-1,0158	1,0318	0,2539	11,3795	129,4938	9,0000	-0,1195	0,0143
3,0625	6,1942	38,3684	10,8399	18,5495	344,0835	25,0000	-0,0795	0,0063
14,0625	13,1242	172,2452	49,2158	25,7194	661,4897	49,0000	-0,3194	0,1020
33,0625	20,9542	439,0794	120,4868	32,8894	1081,7124	81,0000	0,3406	0,1160
76,5000	0,0000	983,4689	274,2508	110,4820	2339,4351	171,5625	0,5349	0,2862
<b>8,5000</b>	<b>0,0000</b>	<b>109,2743</b>	<b>30,4723</b>	<b>12,2758</b>	<b>259,9372</b>	<b>19,0625</b>	<b>0,1783</b>	<b>0,0318</b>
<b>8,7464</b>	<b>0,0000</b>	<b>31,3603</b>	<b>16,5605</b>	<b>10,5110</b>	<b>48,3677</b>	<b>13,0982</b>	<b>0,7314</b>	<b>0,5350</b>

**Tabla 5. Parámetros asociados a la evaluación de la linealidad de la curva.**

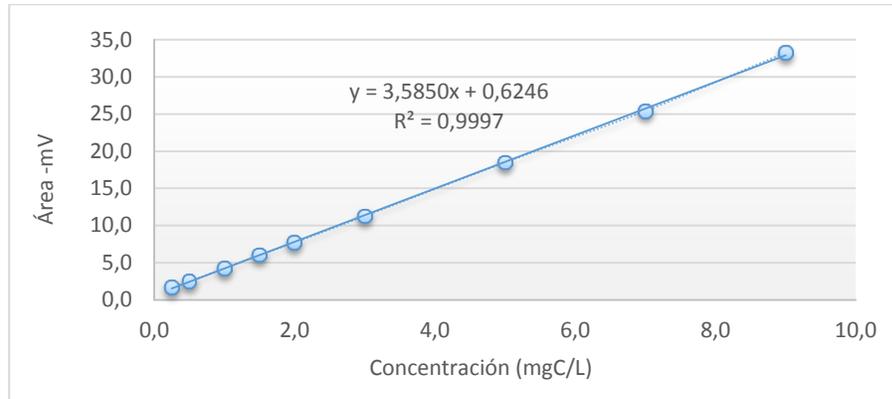
<b>Parámetros</b>	<b>Estimación del error aleatorio</b>
$S_{y/x}$	0,2022
$S_b$	0,0231
$S_a$	0,1009
$\mu_{co}$	0,0624
$t_r * S_b$	0,0643
$t_r * S_a$	0,2806
<b>Test de Linealidad</b>	<b>Criterio de aceptabilidad</b>
$t_r = \frac{ r  \times \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{1-r^2}}$ Ec 16	155,1 > 2,78

Como tercera y última medida de verificación de la linealidad se realizó un test lineal (prueba t-student), teniendo en cuenta como hipótesis nula ( $H_0$  = correlación igual a cero); para este caso el t calculado ( $t_{cal}$ ) sea mayor que el t tabulado ( $t_{tab n-2}$ ), la hipótesis se rechaza y se confirma que existe una buena correlación lineal. De esta forma se calcula un valor de t-calculado (ecuación 16) con n-2 grados de libertad (v) ( es necesario realizar el cálculo de la prueba t- student para n-2 grados de libertad porque una línea recta se forma como mínimo a partir de 2 puntos ), siendo n los niveles de la curva de calibración, este t-calculado es comparado con el valor t- tabulado para un nivel de confianza requerido ( $\alpha = 0,05$ ), donde este alfa es la probabilidad máxima del 5% de cometer un error aleatorio en una distribución normal con nivel de confianza del 95%<sup>41</sup>.

Con lo anterior se determinó que el t calculado ( $t_{cal}$ ) fue mayor (tabla 5) que el t-tabulado ( $t_{tab}$ ), para la curva de calibración ( $t_{tab} = 2,78$ ) <  $t_{cal} = 155,1$ ), estos resultados obtenidos indican que el modelo ajustado es capaz de explicar la respuesta instrumental (Área, mV) a partir del uso de la variable concentración. De manera que, en el intervalo de concentración comprendido entre 0,25 a 9 mgC/L satisfacen las condiciones de linealidad del método analítico, adoptando como hipótesis nula: “no existe diferencia significativa entre el intercepto y cero”. Finalmente se obtuvo una recta de regresión lineal (figura 8), con la cual se estimó la concentración de las muestras de ensayo por interpolación, así como también se utilizó para estimar la concentración de los límites de detección y cuantificación.

<sup>41</sup> IUPAC. (2002) Validación por un solo laboratorio, examen de las directrices armonizadas para la validación de métodos de análisis. Budapest -Hungría, Noviembre.

**Figura 7. Curva de Calibración.**



**5.1.2 Límites de Detección y Cuantificación.** Para el análisis del límite de detección y del límite de cuantificación se prepararon once (11) réplicas de blancos (agua de mar sintética) determinación que fue realizada por dos analistas (Tabla 6); cuya señal medida obtenida ( $S_{muestras}$ ) se convierte en concentración por medio de la ecuación de recta de regresión lineal de la curva de calibración ( $y = 3,5850x + 0,6246$ ) y la desviación estándar de la señal o respuesta instrumental, se determinó de esta forma un límite de detección de 0,06 mgC/L y de 0,08 mgC/L para el límite de cuantificación.

**Tabla 6. Señal de blancos de ensayo.**

Ensayo	Señal (Área mV)	
	A1	A2
1	0,8080	0,8013
2	0,7978	0,8093
3	0,8041	0,8068
4	0,8023	0,8343
5	0,8123	0,7850
6	0,7956	0,8079
7	0,8230	0,8270
8	0,8180	0,8004
9	0,8050	0,8010
10	0,8123	0,8011
11	0,8134	0,8220
<b>Promedio Global</b>	<b>0,8085</b>	
<b>Desvest Global</b>	<b>0,0113</b>	
<b>Prom +3*Desvest</b>	<b>0,8335</b>	
<b>Prom +10*Desvest</b>	<b>0,8923</b>	
$LD \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{Prom + 3 * Desvest - Intercepto(a)}{Pendiente(b)}$ <b>Ecuación. 17</b>	<b>0,06</b>	
$LC \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{Prom + 10 * Desvest - Intercepto(a)}{Pendiente(b)}$ <b>Ecuación. 18</b>	<b>0,08</b>	

**5.1.3 Sensibilidad.** La sensibilidad de la técnica de análisis, corresponde a la pendiente de la curva de calibración:  $y = 3,5850x + 0,6246$ , donde se relaciona que una variación de concentración de una unidad (1 mgC/L) origina un cambio en la señal o respuesta instrumental de 3,6 unidades de mV/ppm. Sensibilidad adecuada para el análisis de COD en aguas marinas<sup>42</sup>.

**5.1.4 Precisión.** Con respecto a la precisión del método analítico se evaluó estimando la repetibilidad, la reproducibilidad entre analistas y reproducibilidad inter día (precisión intermedia). Para realizar los ensayos de repetibilidad se fortificaron muestra natural (agua de mar) y blancos (agua de mar sintética) a diferentes niveles de concentración (bajo, medio y alto).

La precisión a nivel de repetibilidad (tabla 7) para el método analítico se determinó realizando un total de once (11) análisis independientes de tres réplicas de soluciones preparadas de concentración 0,5; 3 y 7 mgC/L en muestra natural (agua de mar) y blancos (agua de mar sintética). Estas soluciones se inyectaron en un analizador de carbono orgánico Shimadzu COT-L CPH/CPN y el procedimiento se repitió tres veces en el mismo día por el mismo analista, en el mismo laboratorio, es decir, en condiciones de repetibilidad.

**Tabla 7. Determinación de la precisión en condiciones de repetibilidad**

<u>Analista</u>	<u>Identificación</u>	<u>Conc. (mg/L)</u>	<u>S</u>	<u>%CV</u>	<u>%CV<sub>H/2</sub></u>	<u>Criterio de Aceptación</u>
1	BCOFBC	0,5	0,006	1,29	8,9	Para todos los casos se cumple que:  CV < CV <sub>H/2</sub>
	MNFBC		0,014	0,84	7,4	
	BCOFMC	3,0	0,016	0,86	6,8	
	MNFMC		0,035	1,45	6,5	
	BCOFAC	7,0	0,048	0,72	6,0	
	MNFAC		0,064	0,82	5,9	
2	BCOFBC	0,5	0,010	2,13	8,9	
	MNFBC		0,007	0,41	7,4	
	BCOFMC	3,0	0,025	0,86	6,8	
	MNFMC		0,005	0,13	6,5	
	BCOFAC	7,0	0,031	0,46	6,0	
	MNFAC		0,004	0,05	5,9	

Fuente: Autor.

<sup>42</sup> Garfield, F.M. 1991. Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories. AOAC International.

Con los resultados obtenidos en la tabla 7 se aplicó el criterio de Horwitz (ecuación 19), donde dice que la precisión del método analítico se considera aceptable cuando el coeficiente de variación calculado de la repetibilidad (CV) es menor al coeficiente de variación de Horwitz ( $CV_H$ ) dividido entre dos (2). Los resultados obtenidos y relacionados en la tabla anterior, muestran que para todos los casos: blancos (agua de mar sintética) y muestra natural (agua de mar) fortificados tanto a baja, media y alta concentración cumple el criterio de aceptación ( $CV < CV_H/2$ ); lo que permite concluir que el método es repetible bajo las condiciones de trabajo.

$$CV_H = (2/3) * 2^{(1-0.5 \log C)} \text{ ó } CV_H = (2/3) * 2C^{-0,1505} \quad \text{Ecuación 19}$$

Para evaluar la precisión en términos de reproducibilidad, se realizó una prueba de student entre analistas (comparación de medias) para los tres (03) niveles de concentración (tabla 8), tomando como hipótesis nula ( $H_0 =$  no existe diferencia significativa entre medidas). Aceptando la hipótesis nula si el  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabulado}}$ . Suponiendo igualdad de varianza entre medidas a un nivel de confianza del 95%. Para calcular  $t_{\text{calculado}}$  se utilizó la ecuación 20, el valor de  $t_{\text{tabulado}}$  corresponde al valor de t con  $(n_1+n_2-2)$  grados de libertad a un nivel de confianza del 95% (se debe utilizar el análisis para  $n_1+n_2-2$  grados de libertad debido a que se realizó una comparación de la precisión entre dos (2) analistas).

De acuerdo con los resultados obtenidos permite corroborar que el método es reproducible.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S * \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Ecuación 20}$$

**Tabla 8. Precisión en condiciones de reproducibilidad con blancos fortificados.**

Ensayo	[BCOFBCA1]	[BCOFBCA2]	[BCOFMCA1]	[BCOFMCA2]	[BCOFACA1]	[BCOFACA2]
1	0,49	0,48	2,93	2,93	6,68	6,67
2	0,48	0,49	2,94	2,90	6,70	6,67
3	0,48	0,49	2,92	2,90	6,66	6,62
4	0,50	0,47	2,91	2,89	6,71	6,63
5	0,48	0,47	2,94	2,88	6,56	6,63
6	0,49	0,49	2,93	2,96	6,71	6,63
7	0,49	0,50	2,92	2,95	6,62	6,60
8	0,49	0,48	2,93	2,90	6,63	6,62
9	0,49	0,47	2,89	2,91	6,62	6,63
10	0,48	0,50	2,93	2,90	6,62	6,64
11	0,48	0,48	2,90	2,92	6,62	6,56
<b>Promedio</b>	<b>0,49</b>	<b>0,48</b>	<b>2,92</b>	<b>2,91</b>	<b>6,65</b>	<b>6,63</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>0,006</b>	<b>0,010</b>	<b>0,016</b>	<b>0,025</b>	<b>0,048</b>	<b>0,031</b>

Para obtener los resultados de  $t_{\text{calculado}}$  reportados en la tabla 9 se agruparon las muestras de la siguiente manera: BCOFBCA1- BCOFBCA2, BCOFMCA1- BCOFMCA2 y BCOFACA1- BCOFACA2

**Tabla 9. Prueba t de 2-colas para blancos fortificados.**

Precisión en condiciones de Reproducibilidad - Analistas		
Nivel de concentración (mg/L)	$t_{\text{calculado}}$ BCOF A1-A2	Criterio de Aceptabilidad
BC = 0,5	1,25	$t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabulado}} (2,086)$
MC= 3,0	1,10	
AC = 7,0	1,33	

Fuente: Autor.

**Tabla 10. Precisión en condiciones de reproducibilidad con muestra natural fortificada.**

Ensayo	[MNFBCA1]	[MNFBCA2]	[MNFMCA1]	[MNFMCA2]	[MNFACA1]	[MNFACA2]
1	1,65	1,62	3,98	4,02	7,86	7,76
2	1,63	1,62	3,99	4,03	7,83	7,76
3	1,65	1,64	4,03	4,03	7,72	7,76
4	1,64	1,63	4,06	4,04	7,75	7,77
5	1,65	1,64	4,03	4,03	7,77	7,76
6	1,62	1,63	4,07	4,04	7,74	7,76
7	1,66	1,64	4,08	4,03	7,63	7,76
8	1,63	1,63	4,07	4,03	7,77	7,77
9	1,62	1,64	4,03	4,03	7,81	7,76
10	1,63	1,64	4,03	4,03	7,78	7,76
11	1,63	1,63	4,00	4,04	7,83	7,76
<b>Promedio</b>	<b>1,64</b>	<b>1,63</b>	<b>4,04</b>	<b>4,03</b>	<b>7,77</b>	<b>7,76</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>0,014</b>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>	<b>0,005</b>	<b>0,06</b>	<b>0,004</b>

Para obtener los resultados de  $t_{\text{calculado}}$  (Ecuación 20) reportados en la tabla 11 se agruparon las muestras de la siguiente manera: MNFBCA1- MNFBCA2, MNFMCA1- MNFMCA2 y MNFACA1- MNFACA2

**Tabla 11. Prueba t de 2-colas para muestra natural fortificada.**

Precisión en condiciones de Reproducibilidad - Analistas		
Nivel de concentración (mg/L)	$t_{\text{calculado}}$	Criterio de Aceptabilidad
	MNF	
BC = 0,5	1,08	$t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabulado}} (2,086)$
MC= 3,0	0,41	
AC = 7,0	0,46	

Fuente: Autor.

Los resultados obtenidos en la tabla 9 y 11, evalúan la precisión en términos de reproducibilidad, usando como criterio de análisis estadístico la prueba t-student de dos (2) colas (comparación de dos (2) medias). Con estos resultados obtenidos se llega a la conclusión que en ambos casos (muestra natural y blancos) se obtuvo un  $t_{\text{calculado}}$  menor al  $t_{\text{tabulado}}$ . Por lo tanto se cumple la hipótesis nula “no existe diferencia significativa”.

Con respecto a la precisión intermedia se evaluó de manera similar al estudio de repetibilidad durante fechas de análisis diferentes. Obteniendo los siguientes resultados reportados en la tabla 12.

**Tabla 12. Determinación de la precisión en condiciones de precisión intermedia**

Ensayo	Fecha	[BCOFBC]	[BCOFMC]	[BCOFAC]	Criterio de Aceptabilidad  Se cumple que: $CV < 2 \cdot CV_H/3$
1	2015-03-11	0,49	2,92	6,67	
2		0,47	2,94	6,70	
3		0,48	2,92	6,66	
4	2015-04-09	0,49	2,91	6,71	
5		0,52	2,97	6,67	
6		0,53	2,97	6,69	
7	2015-04-22	0,52	2,93	6,67	
8		0,51	2,97	6,68	
9		0,50	3,26	7,23	
<b>Promedio</b>		<b>0,50</b>	<b>3,04</b>	<b>6,87</b>	
<b>Desviación estándar</b>		<b>0,02</b>	<b>0,15</b>	<b>0,03</b>	
<b>%CV</b>		<b>3,76</b>	<b>5,03</b>	<b>3,96</b>	
<b>%2*CV<sub>H</sub>/3</b>		<b>33,5</b>	<b>25,6</b>	<b>22,5</b>	

Fuente: Autor.

De forma similar que para repetibilidad, en el caso de reproducibilidad en términos de precisión intermedia también se determinó el coeficiente de variación de Horwitz para establecer la desviación de las mediciones. El método se considera reproducible cuando el coeficiente de variación es menor a dos tercios del coeficiente de variación de Horwitz  $CV_H^{17}$ . En este aspecto se trataron los resultados obtenidos en tres fechas diferentes (2015-03-11, 2015-04-09 y 2015-04-22), en tres sets con puntos de control de baja, media y alta concentración, utilizando como muestra de análisis blancos fortificados en dichos niveles.

De acuerdo a los datos obtenidos se concluye el cumplimiento del criterio de aceptación ( $CV < 2*CV_H/3$ ) por lo tanto el método es reproducible bajo las condiciones de trabajo

**5.1.5 Exactitud.** En la tabla 13 se indica porcentajes de recuperación medios para cada nivel de concentración adicionado, obteniéndose los siguientes intervalos: entre 95,4 y 97,4% para las matrices fortificadas a baja concentración (0,5 mgC/L), para las matrices fortificadas a media concentración (3,0 mgC/L) entre el 95,9% y 97,3%, por ultimo para las matrices fortificadas a alta concentración (7,0 mgC/L) entre el 93,5% y 95,0%. Además se cumple que el porcentaje de error relativo es menor del 10%, valor requerido para considerar un método como veraz (exacto).

**Tabla 13. Determinación de la exactitud por medio del porcentaje de recuperación**

<u>Analista</u>	<u>Identificación</u>	<u>%R</u>			<u>% Error Relativo</u>	<u>Criterio(s) de Aceptabilidad</u>
		<u>Min.</u>	<u>Max.</u>	<u>Prom.</u>		
1	BCOFBC	95,6	99,0	97,4	2,60	70 ≤ %R ≤ 110
	MNFBC	93,7	99,3	97,3	2,62	
	BCOFMC	96,2	98,1	97,3	4,96	
	MNFMC	94,1	97,4	95,8	2,72	
	BCOFAC	93,8	95,9	95,0	4,15	
	MNFAC	93,1	93,9	93,5	5,10	
2	BCOFBC	93,2	99,5	96,5	3,49	70 ≤ %R ≤ 110
	MNFBC	92,8	96,7	95,4	2,95	
	BCOFMC	96,1	98,6	97,0	5,33	
	MNFMC	95,6	96,1	95,9	4,55	
	BCOFAC	93,7	95,3	94,7	4,12	
	MNFAC	94,3	94,5	94,4	5,60	

Fuente: Autor.

## 5.2 INCERTIDUMBRE

### 5.2.1 Estimación de la Incertidumbre

**5.2.1.2 Determinación del mesurando.** Cada resultado analítico es una combinación de resultados de mediciones intermedias, como pesadas, lecturas instrumentales y de volúmenes. La relación entre estos parámetros y el valor de un mensurando puede ser simple o complejo. Un ejemplo de una relación simple es la determinación de la concentración (c) a partir de la masa (m) presente y el volumen (v) en condiciones estándar de temperatura y presión<sup>43</sup>.

Por ejemplo  $c = m/v$

Por otra parte como primera medida para estimar la incertidumbre es la completa definición del mensurando a determinar, en éste caso COD en (mg/L). Para ello, se realiza una curva de calibración, que se ajusta por mínimos cuadrados, y se calcula la concentración de la solución leída mediante la ecuación de la curva.

**5.2.1.3 Análisis de las Variables Involucradas.** Una vez se tenga todas las causas de incertidumbre de la metodología, en principio, sus efectos sobre el resultado pueden ser representados mediante un modelo de medición formal, en el cual cada efecto es asociado con un parámetro o variable en una ecuación. La ecuación toma la forma de un modelo completo del proceso de medición en términos de todos los factores individuales que afectan al resultado.

Con lo anterior queda claro la naturaleza multiplicativa que poseen algunos de estos componentes de incertidumbre, se ha propuesto el siguiente modelo para el cálculo de la concentración del COD (mg/L) el cual se especifica de la siguiente manera:

$$C = C_0 * f_{curva} * f_{volmuestra} * f_{repetibilidad} * f_{equipo} \quad \text{Ecuación 21}$$

---

<sup>43</sup> Hernández Revilla Marta. Validación de Métodos de Ensayo y Estimación de La Incertidumbre de Medida Conforme a la Norma ISO/IEC 17025 [tesis].

En la ecuación 22 se muestra el cálculo de la incertidumbre de cada uno de los factores que afectan la medición (es decir, la incertidumbre debida a la curva de calibración, incertidumbre del volumen de la muestra, incertidumbre de la repetibilidad e incertidumbre del equipo); y por último el cálculo de la incertidumbre expandida.

$$u_c = \sqrt{u_{\text{Curva}}^2 + u_{\text{Volumuestra}}^2 + u_{\text{repetibilidad}}^2 + u_{\text{equipo}}^2} \quad \text{Ecuación 22}$$

Finalmente la Incertidumbre expandida con un factor de cobertura ( $k = 2$ ) para un nivel del 95% de confianza está dada por la siguiente ecuación:

$$U = k * u_c \quad \text{Ecuación 23}$$

**5.2.1.4. Incertidumbre de la Medición.** La recta de regresión calculada anteriormente se utilizó para estimar por interpolación la concentración de COD (mg/L) en agua de mar. Razón por la cual fue importante considerar las fuentes de incertidumbre correspondientes tanto de la curva de calibración del equipo como de su respectiva regresión<sup>44</sup>; en este aspecto se evalúa dicho efecto de la siguiente manera:

Se considera la incertidumbre debida al ajuste por mínimos cuadrados del sistema, la cual se calcula de acuerdo a las ecuaciones 24 y 25

$$u_{co} = \frac{S_{y/x}}{b} \left[ \frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{b \sum (x - \bar{x})^2} \right]^{1/2} \quad \text{Ecuación 24}$$

$$S_{y/x} = \left[ \frac{\sum (y_o - \hat{y})^2}{n - 2} \right]^{1/2} \quad \text{Ecuación 25}$$

*Dónde:*  $y_o$  es el valor experimental de  $y$  a partir del cual se determina el valor de la concentración  $x_o$  ó  $C_o$ ;  $s_{x_o}$  es la desviación estándar estimada de  $x_o$ ;  $s_{y/x}$  es el estadístico que estima los errores aleatorios en la dirección  $y$ ;  $b$  es pendiente de la gráfica de calibrado,  $y$  es la señal analítica ( $A = \text{Área}$ );  $x$  es la concentración ( $C$ );  $m$  es el número de réplicas o lecturas;  $n$  es el número de puntos de la curva de calibración;  $\hat{y}$  son los valores sobre la recta de regresión calculada correspondientes a los valores individuales de  $x$ , es decir los valores de  $y$  ajustados. A continuación se muestra en la (tabla 14) los resultados obtenidos:

<sup>44</sup> ibíd.

**Tabla 14. Incertidumbre de la curva de calibración**

<u>Puntos de la curva</u>	<u>Señal ( área, mV)</u>	<u>Incertidumbre de ajuste lineal (<math>\mu_{co}</math>) mg/L</u>
Baja concentración	2,469	0,062
Media concentración	11,260	0,063
Alta concentración	25,400	0,066

Fuente: Autor.

**5.2.1.5 Incertidumbre del estándar.** En la ecuación 26 se estima la incertidumbre referente al material de referencia certificado y a las diluciones necesarias para obtener los diversos puntos de la misma. El estándar de biftalato de potasio presento una pureza del 99,3%, con una incertidumbre expandida de  $\pm 0,4$  a un nivel de confianza del 95%, y un factor de cobertura de  $K = 2$ , lo que implica una Incertidumbre estándar con distribución normal (campana de Gauss).

$$u_{estandar} = \frac{0,4}{2} = 0,2 \quad \text{Ecuación 26}$$

**5.2.1.6 Incertidumbre en la preparación del estándar.** La preparación del estándar genera una incertidumbre, razón por la cual se deben incluir factores como: tolerancia, repetibilidad, temperatura y balanza. Tener en cuenta el siguiente orden de cálculo:

**5.2.1.6.1 Incertidumbre del volumen.** El volumen de la solución contenida en el matraz volumétrico está sujeto a tres principales fuentes de incertidumbre: La incertidumbre en el volumen interno del matraz, variación en el llenado del matraz a la marca (repetibilidad) e Incertidumbre de la tolerancia.

$$u_{Volumen} = \sqrt{(u_{rep})^2 + (u_{V-Tolerancia})^2 + (Cof_{Sen} * u_{Vtemp-20^{\circ}C})^2 + (u_b)^2} \quad \text{Ecuación 27}$$

Incertidumbres estándar asociadas al volumen (balón de 100 mL). A continuación se muestra el procedimiento para la estimación de las incertidumbres estándar (Ecuación 27):

**5.2.1.6.2 Incertidumbre de la repetibilidad.** La incertidumbre estándar proveniente de efectos aleatorios, típicamente es medida a partir de experimentos de repetibilidad y es cuantificada en términos de desviación estándar de los

valores medidos. En la práctica, normalmente necesitan considerarse no más de 12 réplicas, al menos para tener una precisión alta.

La Incertidumbre asociada a la repetibilidad se calcula con base a la desviación estándar debida a la medida del volumen, para lo cual se realizaron 12 mediciones, bajo unas condiciones de temperatura de 25,0°C y 53% de humedad

$$u_{V-rep} = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 28}$$

Dónde: S = Desviación Estándar; n= Número de experimentos

$$u_{V-rep} = \frac{0,00013}{\sqrt{12}} = 3,71 \times 10^{-5} \text{ mL}$$

**5.2.1.6.3 Incertidumbre de la tolerancia.** De acuerdo a la tolerancia del balón volumétrico especificada por el fabricante; para calcular este componente de incertidumbre se asume una incertidumbre tipo B con distribución rectangular<sup>46</sup>; Por lo tanto:

$$u_{V-Tolerancia} = \frac{\text{Tolerancia-Material}}{\text{Distribución-rectangular}} \quad \text{Ecuación 29}$$

Incertidumbre de la tolerancia para el balón volumétrico de 100 mL:

$$u_{V-Tolerancia} = \frac{0,1}{\sqrt{3}} = 5,77 \times 10^{-2} \text{ mL}$$

**5.2.1.6.4. Incertidumbre del volumen de muestra asociada a la variación de temperatura.** En el laboratorio, es razonable asumir que la temperatura no difiere de 20 °C en más de cinco grados Celsius, y a su vez equivale a la diferencia ( $\Delta t$ ) entre el valor de la temperatura del momento de la verificación del material volumétrico y la temperatura estándar de 20 °C. Variación de la temperatura

<sup>45</sup> Asociación Española de farmacéuticos de la industria (AEFI), Op. Cit, p 70-71

<sup>46</sup> International Organization for Standardization, International Electrotechnical Commission, International Organization of Legal Metrology, International Bureau of Weights and Measures. Guide to the expression of uncertainty in measurement. Geneva: ISO, 1993.

cuando se realizó la verificación del material volumétrico ( $t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ). También se conoce que el agua tiene un coeficiente de dilatación térmica de  $2,1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ , combinando cada uno de estos componentes asociados con la variación de volumen y considerando una incertidumbre tipo B con una distribución rectangular se tiene:

$$\mu_{V-temp-20^\circ\text{C}} = \frac{(W_2 - W_1) * \left(\frac{1}{\rho_w - \rho_L}\right) * \left(1 - \frac{\rho_L}{\rho_G}\right) [1 - \gamma(\Delta t^\circ\text{C})]}{\sqrt{3}} = \frac{(Vol * \gamma * \Delta t)}{\sqrt{3}} \quad \text{Ecuación 30}$$

$$\mu_{V-temp-20^\circ\text{C}} = \frac{(Vol * \gamma * \Delta t)}{\sqrt{3}} = \frac{(100 * 0,00021 * 5,0)}{\sqrt{3}} = 6,06 \times 10^{-2} \text{ mL}$$

$W_2$  y  $W_1$  = son respectivamente los valores de las pesadas del balón volumétrico cuando se encuentran vacío y lleno, equivalente a la masa de agua pesada correspondiente al volumen medido.

$\rho_L$  = Densidad del aire.

$\rho_G$  = Densidad en g/mL del patrón utilizado para calibrar la balanza ( $\rho_G = 8 \text{ g/cm}^3$ )

$\rho_w$  = Densidad del agua en  $\text{g/cm}^3$

$\gamma$  = Coeficiente de dilatación térmica del agua  $^\circ\text{C}^{-1}$

$\Delta t$  = Diferencia de temperatura entre Temperatura del líquido de prueba y la Temperatura de referencia correspondiente a  $20^\circ\text{C}$ .

**5.2.1.6.5. Incertidumbre estándar asociada a la balanza.** Incertidumbre asociada con la balanza debida a la masa de agua pesada ( $\mu_b$ ); se calcula de acuerdo a la función de incertidumbre declarada en el (certificado de calibración 88514 de 2014-06-21; de la balanza AB204S) la cual se rige por medio de la ecuación 31.

.

$$U_b = ((U_o + bmw_i) * \text{factorcorrección}) / 2 \quad \text{Ecuación 31}$$

Donde:

Incertidumbre Carga Cero =  $U_o = 9,50 \times 10^{-5}$

Pendiente de la función =  $b = 8,7 \times 10^{-7}$

Pesaje (g) =  $mw_i = 99,4587$

$$\text{Factor de corrección} = \left( \frac{1}{\rho_{H2O}} * (1 + \rho_{Aire}) \right) - \left( \frac{\rho_{aire}}{\rho_{patrón\ calibranza}} \right) = 1,000504 \text{ mL/g} \quad \text{Ecuación 32}$$

$$\text{Volumen corregido} = m_{Leído} * \left( \frac{1}{\rho_{Agua}} * \left( 1 + \left( \frac{\rho_{Aire}}{\rho_{Agua}} \right) - \left( \frac{\rho_{Aire}}{\rho_{patrón\ calibranza}} \right) \right) \right) \quad \text{Ecuación 33}$$

Donde:

$\rho_{Agua}$  = Densidad del agua.

$\rho_{Aire}$  = Densidad del aire.

$\rho_{patrón}$  = Densidad del patrón para calibrar la balanza.

$$U_b = (9,50 \times 10^{-5} + 8,7 \times 10^{-7} * 99,4587) \text{ g} / 2 = (1,82 \times 10^{-4} \text{ g} * 1,00504 \text{ mL/g}) / 2 = 9,12 \times 10^{-5} \text{ mL}$$

En resumen en la Tabla 15 se muestra los valores de la incertidumbre para cada uno de los factores que aportan al volumen de 100 mL.

**Tabla 15. Incertidumbre debida al balón de 100 mL**

	<b>Tipo-Distribución</b>	<b>Incertidumbre</b>
<b>Tolerancia</b>	B, Rectangular	5,77E-02
<b>Repetibilidad</b>	A, 12 Normal	3,71E-05
<b>Balanza</b>	A, 12 Normal	9,12E-05
<b>Temperatura</b>	B, Rectangular	6,06E-02

Fuente: Autor.

Por lo tanto la incertidumbre asociado con la medida de volumen se calcula resolviendo la ecuación 27:

$$u_{Balón\ 100\text{mL}} = \sqrt{(3,71 \times 10^{-5})^2 + (5,77 \times 10^{-2})^2 + (2,1 \times 10^{-2} * 6,06 \times 10^{-2})^2 + (9,12 \times 10^{-5})^2}$$

$$= 5,77 \times 10^{-2} \text{ mL}$$

Po otra parte la incertidumbre asociada al volumen correspondiente al balón de 50 mL se realizó de forma análoga al cálculo de incertidumbre asociada al balón de 100 mL. Como se muestra en la tabla 16.

**Tabla 16. Incertidumbre debida a los elementos usados en las diluciones.**

	<b>Tipo, Distribución</b>	<b>Balones (mL)</b>	
		<b>50</b>	<b>100</b>
Tolerancia	B, Triangular	3,46E-02	5,77E-02
Repetibilidad	A, 12 Normal	3,14E-05	3,71E-05
Pesaje (Balanza)	A, 12 Normal	6,95E-05	9,12E-05
Temperatura	B, Triangular	5,25E-02	6,06E-02
$\sqrt{\sum(\mu_i)^2}$		3,46E-02	5,77E-02

Fuente: Autor.

### 5.3 INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA PREPARACIÓN DE 100 mL DE SOLUCIÓN STOCK DE 250 mgC/L.

Se tiene un volumen final y un peso de biftalato de potasio, con todos sus respectivos valores de incertidumbre (Volumen, pesaje y pureza) que en conjunto forman la incertidumbre en la preparación del estándar de 250 mg/L, la cual se muestra a continuación:

$$ppm = pureza * \frac{W_{mg}}{V_L} \quad \text{Ecuación 34}$$

Donde:

$W_{mg}$  = Peso

$V_L$  = Volumen

$$u_{(250mg/L)} = \text{concentración} * \sqrt{\left(\frac{\mu_{peso}}{peso}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{100}}{V_{100}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{pureza}}{P_{pureza}}\right)^2} \quad \text{Ecuación 35}$$

#### 5.4.1 Incertidumbre asociada al pesaje del estándar de 250 mgC/L

Incertidumbre asociada con la balanza debida a la masa del estándar pesada ( $\mu_b$ ); se calcula según la ecuación 31:

$$U_b = (9,50 \times 10^{-5} + 8,7 \times 10^{-7} * 0,0528) g / 2 = (9,50 \times 10^{-5} g * 1,00504 ml / g) / 2 = 4,77 \times 10^{-5} mL$$

$$u_{(250\text{mg/L})} = 250 * \sqrt{\left(\frac{4,77E^{-5}}{0,0528}\right)^2 + \left(\frac{5,77E^{-2}}{100}\right)^2 + \left(\frac{0,2}{99,3}\right)^2} = 5,72E^{-01}$$

## 5.5 PREPARACIÓN DE 50 mL DE SOLUCIÓN CON CONCENTRACION (0,5, 3,0 y 7,0 mgC/L).

A continuación se muestra el cálculo de las incertidumbres individuales debidas a la preparación de los puntos de baja, media y alta concentración utilizados para evaluar exactitud y precisión.

La Incertidumbre derivada de la dilución es:

$$u_d = \sqrt{\left(\frac{\mu_{100}}{V_{100}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{250}}{250}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{50}}{V_{50}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{Transfer}}{V_{Transfer}}\right)^2} \quad \text{Ecuación 36}$$

$$u_{\text{mg/L}} = \text{Concentración} * \sqrt{\left(\frac{\mu_{\text{pureza}}}{P_{\text{pureza}}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_d}{\text{Dilución}}\right)^2} \quad \text{Ecuación 37}$$

Incertidumbre generada por el patrón de 0,5 mgC/L

$$u_{d-0,5\text{mg/L}} = \sqrt{\left(\frac{5,77E^{-02}}{100}\right)^2 + \left(\frac{5,72E^{-01}}{250}\right)^2 + \left(\frac{3,46E^{-02}}{50}\right)^2 + \left(\frac{1,86E^{-03}}{0,1}\right)^2} = 1,88E^{-02}$$

$$u_{(0,5\text{mg/L})} = 0,5 * \sqrt{\left(\frac{0,2}{99,3}\right)^2 + \left(\frac{1,88E^{-02}}{50000}\right)^2} = 1,01E^{-03}$$

Incertidumbre generada por el patrón de 3,0 mgC/L

$$u_{d-3,0\text{mg/L}} = \sqrt{\left(\frac{5,77E^{-02}}{100}\right)^2 + \left(\frac{5,72E^{-01}}{250}\right)^2 + \left(\frac{3,46E^{-02}}{50}\right)^2 + \left(\frac{1,32E^{-02}}{0,5}\right)^2} = 2,65E^{-02}$$

$$u_{(3,0\text{mg/L})} = 3,0 * \sqrt{\left(\frac{0,2}{99,3}\right)^2 + \left(\frac{2,65E^{-02}}{10000}\right)^2} = 6,04E^{-03}$$

Incertidumbre generada por el patrón de 7,0 mgC/L

$$u_{d-7,0\text{mg/L}} = \sqrt{\left(\frac{5,77E-02}{100}\right)^2 + \left(\frac{5,72E-01}{250}\right)^2 + \left(\frac{3,46E-02}{50}\right)^2 + \left(\frac{1,03E-02}{1,5}\right)^2} = 2,29E-03$$

$$u_{(7,0\text{mg/L})} = 7,0 * \sqrt{\left(\frac{0,2}{99,3}\right)^2 + \left(\frac{2,29E-03}{3333}\right)^2} = 1,40E-02$$

## 5.6 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

Para determinar la incertidumbre de la curva de calibración es necesario recurrir a la ecuación 38 debido a que el analizador de carbono prepara automáticamente la curva de calibración.

$$u_{CO} = C_0 * \sqrt{\left(\frac{\mu_{CO}}{C_0}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{250}}{250}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{repetibilidad}}{C_0}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{resolucion}}{Señal}\right)^2} \quad \text{Ecuación 38}$$

$$u_{0,5} = 0,5 * \sqrt{\left(\frac{0,06210}{0,5}\right)^2 + \left(\frac{5,72E-01}{250}\right)^2 + \left(\frac{1,60E-3}{0,5}\right)^2 + \left(\frac{5,77E-5}{2,4690}\right)^2} = 6,24E-02$$

$$u_{3,0} = 3,0 * \sqrt{\left(\frac{0,06210}{3,0}\right)^2 + \left(\frac{5,72E-01}{250}\right)^2 + \left(\frac{6,46E-3}{3,0}\right)^2 + \left(\frac{5,77E-5}{11,260}\right)^2} = 6,31E-02$$

$$u_{7,0} = 7,0 * \sqrt{\left(\frac{0,06210}{7,0}\right)^2 + \left(\frac{5,72E-01}{250}\right)^2 + \left(\frac{1,44E-02}{7,0}\right)^2 + \left(\frac{5,77E-05}{25,400}\right)^2} = 6,60E-02$$

## 5.7 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR DEL ANALIZADOR DE CARBONO ORGÁNICO (SHIMADZU COT-L).

Se determinó por medio de la resolución del instrumento, se considera la incertidumbre de tipo B rectangular:

$$\mu_A = 0,0001/\sqrt{3} = 5,77E-05 \quad \text{Ecuación 39}$$

## 5.8 INCERTIDUMBRE ESTÁNDAR COMBINADA.

A continuación se tienen que cuantificar los componentes de incertidumbre identificados valorando cuales de estos componentes son significativos y pueden ser estimados de forma conjunta, y por último está el cálculo de la incertidumbre combinada total teniendo en cuenta las relaciones establecidas por el modelo de función especificado de la magnitud objeto de medición.

Utilizando las respectivas incertidumbres estándar calculadas, de acuerdo a la ecuación 22 e involucrando la incertidumbre asociada con el Instrumento de medición se tiene la incertidumbre combinada total; presentada en la tabla 17 para un nivel de baja, media y alta concentración respectivamente.

**Tabla 17. Incertidumbre combinada total**

	<b>Baja</b>	<b>Media</b>	<b>Alta</b>
<b>Repetibilidad</b>	1,60E-03	6,46E-03	1,44E-02
<b>Equipo</b>	5,77E-05	5,77E-05	5,77E-05
<b>Volumen muestra</b>	3,46E-02	3,46E-02	3,46E-02
<b>Curva de calibración</b>	6,24E-02	6,24E-02	6,24E-02
$\sqrt{\sum(\mu_i)^2}$	6,24E-02	6,31E-02	6,60E-02

Fuente: Autor.

Para evaluar la Incertidumbre expandida se utilizó un factor de cobertura ( $k = 2$ ) para un nivel del 95% de confianza está dada por la siguiente ecuación:

$$U = k * u_c \text{ Ecuación 40}$$

$$U_{5,0} = 2 * 0,0624 = 0,1248$$

$$U_{3,0} = 2 * 0,0631 = 0,1262$$

$$U_{7,0} = 2 * 0,0660 = 0,1320$$

## 5.9 ROBUSTEZ.

La robustez del método analítico se estableció analizando dos (2) muestras fortificadas a un nivel de concentración medio (3 mgC/L), teniendo en cuenta como variación de las condiciones del método la salinidad (MNFMC y ADFMC). Los resultados obtenidos (tabla 18) se evaluaron por medio del análisis estadístico t-student; teniendo como criterio de aceptación una hipótesis nula ( $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabulado}}$ ) Suponiendo igualdad de varianza entre medidas a un nivel de confianza del 95 %.

**Tabla 18. Determinación de la robustez.**

<u>Ensayo</u>	<u>[ADFMC]</u>	<u>[BCOFMC]</u>	<b><u>Criterio de Aceptabilidad</u></b>  $t_{\text{calculado}} < (t_{\text{tabulado}} = 2,086)$
1	2,86	2,84	
2	2,85	2,83	
3	2,85	2,85	
<b>Promedio</b>	<b>2,85</b>	<b>2,84</b>	
<b>Desviación Estándar</b>	<b>0,004</b>	<b>0,010</b>	
<b>CV</b>	<b>1,76</b>	<b>2,03</b>	
<b>t-calculado (2-colas)</b>	<b>0,38</b>		

Fuente: Autor.

Con los resultados obtenidos en la tabla 18 se aplicó el criterio de aceptabilidad de la prueba de student de dos colas para un nivel de confianza del 95 %, obteniéndose como resultado un t calculado menor al t tabulado ( $t_{\text{calculado}=0,38} < t_{\text{tabulado}=2,086}$ ). Y un coeficiente de variación (RSD) global de 1,76 por debajo de 3,9 que es el coeficiente de variación permitido para métodos analíticos. Por lo tanto se concluye que la metodología analítica demostró en el análisis de agua de mar respecto a agua dulce no presentar diferencias significativas en el cálculo de la concentración de carbono orgánico disuelto (COD).

## 6.0 ANALISIS DE COD CON EL METODO ESTANDARIZADO

Con el método estandarizado se dio cumplimiento al objetivo específico de analizar Carbono Orgánico Disuelto (COD) se monitorearon cinco estaciones de muestreo, a nivel superficial en la bahía de Tumaco. Obteniéndose los resultados indicados en la tabla 19.

**Tabla 19. Análisis de COD en la bahía de Tumaco**

<u>Estaciones</u>	<u>Latitud</u>	<u>Longitud</u>	<u>COD (mgC/L)</u>	<u>Material de referencia</u>
Playa del Morro	1°48'48.48"N	78°44'11.61"W	1,1403	Biftalato de potasio 3 mgC/L
Muelle Residencias	1°48'13.46"N	78°45'59.43"W	1,2470	
Muelle Cccp	1°49'11.82"N	78°43'43.86"W	1,3546	
Puente el Pindo	1°48'09.41"N	78°46'50.43"W	1,8296	
Puente del morro	1°49'07.73"N	78°45'17.84"W	2,4881	
Valor medio	--	--	<b>1,6119</b>	

Fuente: Autor.

Las concentraciones obtenidas estuvieron en el intervalo comprendido entre 1,14 y 2,49 mg C/L; encontrándose los niveles más altos en las estaciones Puente el Pindo y Puente del morro con valores de 1,83 y 2,49 mgC/L, respectivamente. Por el contrario, los niveles más bajos fueron detectados en las estaciones Playa del Morro, Muelle Residencias, y Muelle Cccp correspondientemente.

Por otra parte, los resultados obtenidos en la costa pacífica (tabla 19) fueron contrastados con los reportados en la investigación de COD realizada al Norte de España (1,868 y 3,677 mg C/L)<sup>47</sup>, donde se llegó a la conclusión que estos niveles de concentración tanto de la bahía de Tumaco como la realiza al norte de España se encuentran en niveles de COD normales.

Una de las causas que puede conllevar a las variaciones de los niveles de concentración de COD en las estaciones monitoreadas obedece a la incorporación de materia orgánica a la bahía, relacionada con los residuos generados de las actividades antrópicas, como por ejemplo el vertimiento de residuos sólidos, aguas residuales domésticas e industriales, entre otras.

En alineación con lo últimamente mencionado se ha encontrado que las concentraciones de COD en aguas marinas varían con el clima, la vegetación y las actividades de la región. Aproximadamente el 5% está conformado por ácidos

<sup>47</sup> González E. Y Pozo J. El Carbono Orgánico Disuelto En El Rio Aguera (Norte De España) En Condiciones De Estabilidad Hidrológica. Limnética, 1 1 (2) : 57-62 (1 995).

Húmicos y un 45% de ácidos Fúlvicos, provenientes de la descomposición de tejidos de plantas y animales<sup>48</sup>.

Finalmente, merece mencionar que las estaciones monitoreadas en la bahía de Tumaco no presenta una condición crítica en niveles de concentración de COD, con respecto a los niveles catalogados como “normales”, los cuales varían entre 1-5 mgC/L, para aguas costeras<sup>49</sup>. Sin embargo, es importante resaltar que en un cuerpo de agua costero, cada una de las fuentes, de manera independiente, ejerce algún tipo de presión generando alteraciones al mismo.

---

<sup>48</sup> Gaffney J. S., Marley N. A. & S. B. Clark. 1996. Humic and Fulvic Acids Isolation Structure and Environmental Role. American Chemical Society: Washington, EUA, pp. 2-3.

<sup>49</sup> Otero Diana, Pavón Martha. Características Físico-Químicas De Los Mares De México. Plaza y Valdes editores; 2001. p. 92-94.

## CONCLUSIONES

La evaluación de linealidad realizada para el método de análisis de carbono orgánico disuelto demostró tener una excelente correlación entre los valores de concentración y las respuestas obtenidas durante el proceso de medida (área mV), esto se vio reflejado al evaluar el coeficiente de correlación (r), análisis de residuos y mediante el test de linealidad, se comprobó que no existe evidencia de efecto matriz en las muestras de agua de mar analizada.

La validación de la metodología analítica propuesta para el análisis de carbono orgánico disuelto en aguas marinas realizada en el laboratorio del Centro de Investigación Oceanográfico e Hidrográfico del Pacífico permitió establecer que existen adecuados niveles de precisión, exactitud y linealidad para el intervalo de trabajo comprendido entre: 0,25 y 9,0 mg/L.

La bahía de Tumaco mostro de manera general no presentar condiciones críticas en los niveles de concentración de COD (valor medio 1,6119), sin embargo, es importante resaltar que de manera independiente cada una de las fuentes que ejercen algún tipo de presión (actividades antropogénicas) en la bahía está generando en un futuro un impacto al ecosistema costero.

La validación del método de análisis para la cuantificación de COD, realizado en el Laboratorio del Centro de Investigación Oceanográfico e Hidrográfico del Pacífico permitió cumplir con el requisito que exige la norma NTC-ISO/IEC 17025, además de implementar este método análisis en el laboratorio el cual confirma la calidad para reportar resultados que brinden confianza y veracidad a sus clientes.

Se desarrolló la estimación de la incertidumbre para todas las variables involucradas en el método analítico para la cuantificación de COD (equipos, balanzas, pipetas, materiales volumétricos y reactivos) con base a las directrices generales de EURACHEM y bajo un sistema de gestión de la calidad.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda posterior a la implantación del método validado en laboratorio monitorear los límites de detección y cuantificación, debido a que estos pueden verse alterados POR FACTORES COMO: cambios en la temperatura y cambios en el estándar.

La contaminación de la muestra puede ocurrir fácilmente en la etapa de toma y preparación de la muestra, por lo tanto es necesario tener precauciones en la manipulación, específicamente durante la captación, manejo, filtración y almacenamiento de la muestra.

Almacenar la muestra en frascos de vidrio en un congelador donde no se guarden ni se hayan guardado previamente solventes o material orgánico como alimentos o muestras biológicas.

## **PRODUCTOS DE LA PRÁCTICA**

- Se realizaron aportes al Sistema de Gestión de Calidad del laboratorio de Química mediante la implementación y validación de los Procedimientos técnicos N° LAQ – PT-041 determinación de carbono orgánico disuelto (COD) en aguas marinas.
- Se elaboró el Instructivo de operación del equipo Shimadzu COT-L LAQ – IO-044.
- Se elaboró el informe de evaluación determinación carbono orgánico disuelto (COD) en aguas marinas N° 14.

## BIBLIOGRAFÍA

Aguirre Leticia, García Teresa, Juncadella Marta. AEFI. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria: Validación de Método Analíticos. Monografía. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad; 2001.

Alperin M. J. y Martens C. S. Dissolved Organic carbon in Marine pore Waters: a Comparison of Three Oxidation Methods. Curriculum in Marine Sciences, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599-3300, USA; 1991.

Asociacion Española de farmacéuticos de la industria (AEFI), Op. Cit, p 70-71  
Autoridad nacional de licencias ambientales (ANLA) [en internet]. Resolución 1016(dic7,2012)en<[http://www.anla.gov.co/documentos/12549\\_res\\_0402\\_290414.pdf](http://www.anla.gov.co/documentos/12549_res_0402_290414.pdf)>consultado en 20 abril de 2015.

Cinzia De Vittor, Alessandro Paoli, Serena Fonda Umani. Dissolved Organic Carbon Variability in a Shallow Coastal marine System (Gulf Of Trieste, Northern Adriatic Sea). Estuarine, Coastal and Shelf Science 78; 2008. p 280-290.

Covelli Stefano Recent contamination of mercury in an estuarine environment. Marano lagoon, Northern Adriatic, Italy; 2009. p. 274-276

Del Monte José Luis. Desarrollo y Validación de Metodologías para Minimizar la Incertidumbre de los Calibradores en Determinaciones por HPLC en Muestras Biológicas [tesis]: Universidad Tecnológica Nacional. Escuela de posgrados Facultad Regional Buenos Aires. Buenos Aires; 2012.

Dickson.A.G. Guide to Best Practices for Ocean CO<sub>2</sub> Measurements: SOP 7 - Determination of Dissolved organic Carbon and Total Dissolvent Nitrogen in Sea Water. Pices Special Publication 3. IOCCP REPORT No. 8; 2007. p. 117.

Dr. Robert Anderson, Dr. Robert Bramley, Dr. David Clarke y Dra. Pirjo Lillsunde. Sección de laboratorio y asuntos científicos de la UNODC: Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. New York; 2010.

Duffau Boris, Rojas Fabiola, Guerrero Isabel. Instituto de salud pública. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos. Chile; 2010.

Eurachem/Citac. Guide the fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. 1998. <<http://www.eurachem.org/images/stores/Guides/pdf/valid.pdf> > consultado en 20 abril de 2015.

Evaluación de la Incertidumbre de la medición, OAA (Organismo argentino de acreditación) Alba N. Zaretsky, Buenos Aires- Argentina, 30 de abril del 2008.

Gaffney J. S., Marley N. A. & S. B. Clark. 1996. Humic and Fulvic Acids Isolation Structure and Environmental Role. American Chemical Society: Washington, EUA, pp. 2-3.

Garfield, F.M. 1991. Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories. AOAC International.

González E. Y Pozo J. El Carbono Orgánico Disuelto En El Rio Aguera (Norte De España) En Condiciones De Estabilidad Hidrológica. Lirnnética, 1 1 (2) : 57-62 (1 995).

Hernández Ballesteros Bertha Angélica. Validación de Método Analítico por HPLC Para Disolución de Levonorgestrel 1.5 mg Grageas. Universidad de Veracruzana [tesis]. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. Veracruz-Mexico; 2014.

Hernández Revilla Marta. Validación de Métodos de Ensayo y Estimación de La Incertidumbre de Medida Conforme a la Norma ISO/IEC 17025 [tesis].

Universidad de Valladolid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Analítica. Valladolid-España; 2013.

Hosny I. Emara. Total Organic Carbon Content in the Waters of the Arabian Gulf. Environment International, Vol 24, No. ½, pp. 97-103; 1998. PII S0160-4120(97)00125-6.

Hsu, K. & Chen, C. The effect of calibration equations on the uncertainty of UV–Vis spectrophotometric measurements. Measurement; 2010. 43, 1525-1531

I B. Jorgue G. Validación de método Analítico de Valoración de Amoxicilina en Polvo para Suspensión Oral Producción por Betapharma S.A. Mediante HPLC. [tesis]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba- Ecuador; 2011.

Instituto Colombiano De Norma Técnica Y Certificación NTC-ISO/IEC 17025. Requisitos Generales Para La Competencia: De Los Laboratorios De Ensayo Y Calibración. Bogotá: ICOTEC, 2005.

International Organization for Standardization, International Electrotechnical Commission, International Organization of Legal Metrology, International Bureau of Weights and Measures. Guide to the expression of uncertainty in measurement. Geneva: ISO, 1993.

International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology, VIM, ISO,

Ginebra. 1993 Organización Internacional para la Estandarización Estadística. Vocabulario y Símbolos. Parte 1: Probabilidad y Términos estadísticos en General. Ginebra: ISO, 1993.

Jason Seitz & Chenan Tong (2013). Texas instruments LMP91051 NDIR CO<sub>2</sub> Gas Detection System. [En internet] <<http://www.ti.com/lit/an/snua207/snua207.pdf>> consultado el 26 agosto 2014.

Jofre Viviana Rosario. Validación De La Metodología Analítica Para La Determinación De Ácidos Grasos En Aceites De Oliva Extra Virgen [tesis]: Universidad De Chile. Facultad De Ciencias Químicas Y Farmacéuticas. Departamento De Ciencia De Los Alimentos Y tecnología química laboratorio de química de alimentos y materias grasas. Santiago De Chile; 2009.

Long Gary L, Winefordner J. D. Report Limit of Detection. A Closer Look at the IUPAC Definition. *Analytical Chemistry*, 55(7), 712A-724A (1983).

Martínez Andrés Alfonso. Modelamiento del proceso de remoción de materia orgánica natural – NOM – mediante la adición de carbón activado en polvo – PAC. [tesis]. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de minas. Ingeniero Químico. Medellín; 2006.

Medina J. Jessica, Quinto Jorge Berrocal. Validación de Método Analítico de Valoración de Naproxeno Sódico 550 mg. Tableta por Cromatografía Líquida de Alta Performance. [tesis]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento Académico de Química Básica y Aplicada. Lima -Perú; 2008.

Molina G. Luz Karime. Estudio Preliminar del Carbono Orgánico Disuelto en los Ríos Orinoco, Bitá y Meta, en el Área de Influencia de Puerto Carreño [tesis]: Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias Biológicas. Bogotá-Colombia; 2002.

Molina G. Luz Karime. Estudio Preliminar Del Carbono Orgánico Disuelto En Los Ríos Orinoco, Bitá Y Meta, En El Área De Influencia De Puerto Carreño [tesis]: Facultad De Ciencias Biológicas. Bogotá; 2002.

Muniz Pablo, Venturini Natalia. Testing the Applicability of a Marine Biotic Index (AMBI) to Assessing the Ecological Quality of Soft-Bottom Benthic Communities, in the South America Atlantic Region. 50; 2005. p 624-637.

Otero Diana, Pavón Martha. Características Físico-Químicas De Los Mares De México. Plaza y Valdes editores; 2001. p. 92-94.

Pineda Virginia. Determinación de la evolución térmica de las rocas generadoras de petróleo. [tesis]. Universidad autónoma de México. Facultad de Ingeniería; 2012.

Reeve, Roger N. (2002). Introduction to environmental analysis. Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd.

Ricardo O. Cubrellati. Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo: Aspectos prácticos de la validación e Incertidumbre en medidas químicas; 2010. ISBN 978-987-96413-8-5.

Sánchez Andrés Felipe. Validación De Las Técnicas Hierro Total Y Fosfatos En Agua En El Laboratorio Aliscca Ltda. [tesis]. Universidad Tecnológica De Pereira Facultad De Tecnología Química Industrial; 2011.

Sempéré R., Panagiotopoulos C., Lafont R., Marroni B., Van Wambeke F. Total Organic Carbon Dynamics in the Aegean Sea. Journal of Marine Systems 33-34; 2002. 355-364.

Sharp Jonathan H. Total Organic Carbon in Seawater- Comparacion of Measurements Using Persulfate Oxidation and High Temperature Combustion. Marine Chemistry, 1; 1973. 211-229.

Shimadzu Institute for Research technologies [página en internet]. Shimadzu center For Advanced Analytical Chemistry. Disponible en: <http://www.uta.edu/sirt/scaac/equipment/toctmnl/toctmnl.php>.> consultado el 26 agosto 2014.

Skoog, D., West, D.M., Holler, F.J., & Crouch, S.R. Fundamentos de Química analítica. Octava edición. México. Thompson editores S.A; 2005. p. 94-96, 218,219.

Standard methods. For the Examination of Water & Wasterwater, 22<sup>nd</sup> Edition. American Public Healt Association, Washington, DC 20001-3710. Método 5310B "High-Temperaure Combustion Method; 2012 p 5-23 a 5-25.

Suleyman Tugrul. Comparison of COT Concentrations by Persulphate-UV and High-Temperature Catalytic Oxidation Techniques in the Marmara and Black seas. Marine Sciences Institute, Middle East Technical University, P.O. Box 28, Erdemli 33731, Icel. Turkey. *Marine Chemistry*, 41; 1993. p 265-270 265.





