VALIDACIÓN PARCIAL DE LA METODOLOGÍA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO (DQO) A RANGO BAJO EN AGUAS RESIDUALES POR MÉTODO COLORIMÉTRICO, EN EL LABORATORIO DE CORPONARIÑO

GELMIS MELENDEZ MADROÑERO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUIMICA
SAJUAN DE PASTO-COLOMBIA
2012

VALIDACIÓN PARCIAL DE LA METODOLOGÍA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO (DQO) A RANGO BAJO EN AGUAS RESIDUALES POR MÉTODO COLORIMÉTRICO, EN EL LABORATORIO DE CORPONARIÑO

GELMIS MELENDEZ MADROÑERO

Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

Director:

JAIRO LASSO MEJIA.
Ingeniero Químico

Co-director:

HENRY ESCOBAR
Químico.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUIMICA
SAN JUAN DE PASTO-COLOMBIA
2012

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Art. 1º del Acuerdo No. 324 de Octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

Nota de Aceptación

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

JAIRO LASSO MEJIA
Director

CAROL ANDREA CASTILLO PARRA
Jurado

NELSON HURTADO GUTIERREZ
Jurado

San Juan de Pasto Nariño, Agosto del 2012

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente a la Química Johana Rodríguez, al Químico Henry Escobar colaboradores de este trabajo y al Ingeniero Químico Jairo Lasso Mejía director de la pasantía. Gracias por su constante orientación, dedicación y paciencia a lo largo de la presentación de la propuesta y ejecución del proyecto. Infinitas gracias por brindarme su confianza, su respaldo, apoyo y por transmitirme el espíritu perseverante necesario para alcanzar un objetivo más en mi vida.

Al departamento de Química y a todos los docentes que lo conforman por transmitirme sus conocimientos, por enseñarme muchos valores constructivos, por demostrar el interés de docentes, por contribuir a mi formación profesional, formación que contribuirá con el desarrollo de nuevo conocimiento el cual será transmitido con la misma o mayor calidad a personas que hacen uso de esta ciencia tan bonita como es la química. Agradezco a los profesores que fueron cultivando mi lenguaje químico desde el inicio de mi carrera hasta el primer logro alcanzado, logro que ha hecho que mi vida este cambiando día a día y se mueva acorde a la entropía del universo; algunas de estas grandes personas aún permanecen en la universidad. Gracias profesores; Libardo Benavides, Carlos Córdoba, Juan José Lozada, Henry Insuasty, Olga lucia Benavides, Sonia Ximena Delgado, Jesús Romo Ramos, Freddy Pantoja, Nelson Hurtado, Eduardo Solano, Jesús Castillo y muchos más profesores.

A la Corporación Autónoma Regional de Nariño (CORPONARIÑO), por brindarme la oportunidad de poder realizar este trabajo en sus instalaciones y por los recursos destinados y la colaboración prestada.

A mis compañeros y amigos, Edison A Castro P, José L Villacrez Y, Ximena A Chamorro, Edison O Sánchez M, Wilson A Álvarez, Liliana Becerra, Dairo A Portillo, Jhon H Villarreal, Paula A Páez O, Diana L Vaca, Jhana Ortiz, Adíela Villareal, Mónica Zantacruz, Vanesa Montezuma, Yeimi O, Jorge Rúales, Álvaro J Mejía a Freddy Samir Daza que aunque hoy no esté presente compartió momentos de su vida y me demostró su aprecio y amistad, a muchos más compañeros que compartieron sus conocimientos, habilidades alegrías y tristezas, agradezco por depositar su confianza en mí, gracias a todos por los buenos momentos compartidos.

DEDICATORIA

A Dios por haber juntado a dos personas maravillosas Juan N Meléndez y María L Madroñero, las cuales me brindaron la oportunidad de vivir, aprender a creer y hacer de mi una persona capaz de salir adelante, vencer dificultades e ir llenando día a día de bendiciones mi vida.

A ellos por brindar su apoyo tanto económico como psicológico y por ser los principales gestores y ejemplo de vida, quienes me llenan de orgullo por ser modelo de unión, integridad y trabajo; ellos a quien agradezco ser mi ejemplo de trabajo, disciplina y fortaleza, me han brindado su amor y comprensión todo el tiempo, ellos quien con su prudencia y paciencia se han convertido en mi mayor apoyo en los momentos difíciles.

A mis hermanas, Aidaly, Aracely, Nuriela, Gloricet y mi sobrina Fernanda Daniela por su amor, su confianza, por ser mi apoyo, por ser el aliento de superación y esperanza por creer que la unión, el esfuerzo y la dedicación animan nuestro espíritu nos hace mirar al cielo nos hace tener fe nos invita a soñar y a despertar en increíbles mundos.

RESUMEN

En este trabajo se presenta la validación parcial de la técnica DQO a reflujo cerrado por el método colorimétrico 5220D del Estándar Methods, edición número 21, a rango bajo en DQO de 10 a 90 ppm, en aguas residuales en el laboratorio de la Corporación Autónoma Regional de Nariño (CORPONARIÑO). Para la validación de esta técnica se comenzó con la prevalidación, a partir de soluciones estándar de ftalato de potasio, para determinar linealidad y correlación entre los datos de concentración y absorbancia, así como variables que podrían afectar el proceso durante la validación; para la determinación del rango lineal se realizaron mediciones por triplicado, se calculó el coeficiente de determinación y se realizó una curva de Ringbom, una vez establecido el intervalo de trabajo (10 a 90 ppm) se realizó una curva de calibración con cinco patrones por duplicado durante 7 días y se procedió a determinar el límite de detección instrumental (LDI), límite de detección del método estimado (LDM_e) y límite de detección del método (LDM). La curva de calibración promedio obtenida mostro un coeficiente de correlación de 0,9998, una pendiente de -0,0019, con límite de confianza entre -0,0018 y -0,0020, indicando una alta correlación lineal entre los valores de concentración y absorbancia. En la metodología se determinó el LDI con un valor de 1,06 ppm y el LDM igual a 8,14 ppm; se hicieron mediciones y cálculos de exactitud y precisión al nivel de repetibilidad entre lecturas y reproducibilidad entre días. Para la curva de calibración promedio se determinó la desviación estándar de la pendiente, del intercepto y el error aleatorio en *y*. Se continuo con la validación, haciendo mediciones de absorbancia de muestras reales, muestras adicionadas, estándares preparados de tres concentraciones sobre el rango, alta, baja y media, y de un estándar certificado adquirido de un laboratorio comercial (VHG Labs) el cual tenía una concentración aproximada de 29 ppm en DQO, los análisis de estas muestras se hicieron por duplicado durante siete días por dos métodos espectrofotométrico y volumétrico, con diferente analista en los mismos días. El coeficiente de variación, el porcentaje de error, a si como el porcentaje de recuperación para los resultados, estuvieron dentro de los límites requeridos por el IDEAM.

Los porcentajes de recuperación fueron de 105,47% para M1+30% y 110,82% para M1+50%. Valores que están dentro del rango de porcentaje de recuperación recomendado para las metodologías analíticas básicas, que va de 80 a 120%.

Se realizo una carta de control utilizando un estándar de 50 ppm en DQO con la que se evaluó el método, encontrándose una distribución normal alrededor de la media.

ABSTRACT

This paper introduces partial validation of the technique COD closed reflux colorimetric method 5220D of Standard Methods, edition number 21, to rank low in COD of 10 to 90 ppm, in wastewater in the laboratory of Regional Autonomous Corporation Nariño (CORPONARIÑO). To validate this technique began with the pre-validation, standard solutions from potassium phthalate, to determine the linearity and correlation between concentration and absorbance data and variables that may affect the process during the validation; to determine the linear range were measured by triplicate, was calculated the coefficient of determination and a curve was performed Ringbom, once established the working range (10 to 90 ppm) were performed with a calibration curve in duplicate over five patterns 7 days and proceeded to determine the instrumental detection limit (IDL), method detection limit estimated (LDME) and method detection limit (MDL). The average calibration curve obtained showed a correlation coefficient of 0.9998, a slope of -0.0019, with confidence limits between -0.0018 and -0.0020, indicating a high linear correlation between the concentration values and absorbance. The methodology LDI determined with a value of 1.06 ppm and 8.14 ppm equals LDM, measurements and calculations were accuracy and precision of the readings level of repeatability and reproducibility between days. For the calibration curve of average standard deviation was determined from the slope, intercept and random error. Continued validation, making absorbance measurements of real samples, spiked samples, standards prepared in three concentrations over the range, high, low and medium, and a standard certificate acquired from a commercial laboratory (VHG Labs) which had a approximate concentration of 29 ppm in COD, the analyzes of these samples were done in duplicate for seven days by two spectrophotometric and volumetric methods, with different analyst on the same days. The coefficient of variation, the error rate, whether as the recovery rate for the results were within the limits required by the IDEAM.

The recoveries were 105.47% for M1+30% and 110.82% for M1+50%. Values that are within the range recommended recovery percentage for basic analytical methodologies, ranging from 80 to 120%.

We conducted a control card using a standard 50 ppm COD was evaluated by the method, being a normal distribution around the mean.

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN…….. 17
1. OBJETIVOS…….. 19
1.1 Objetivo general…… 19
1.2 Objetivos específicos…….. 19
2. MARCO TEÓRICO…… 20
2.1 ANTECEDENTES…….. 20
2.1.1 Inicios y descripción de la DQO…… 20
2.2 DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO (DQO)…….. 22
2.2.1 Descripción de la DQO…….. 22
2.2.2 DQO a reflujo abierto…….. 25
2.2.3 DQO a reflujo cerrado…… 25
2.2.4 FUNDAMENTOS DE ESPECTROFOTOMETRIA……. 26
2.2.4.1 Ley de Beer…….. 27
2.2.4.2 Espectrofotómetro…… 28
2.2.4.3 DQO Por método espectrofotométrico…….. 28
2.2.5 Residuos químicos producidos en el análisis de DQO…….. 29
3. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALITICOS…… 29
3.1 La selectividad…… 29
3.2 Linealidad y rango…….. 29
3.3 La sensibilidad…… 30
3.4 La precisión…….. 30
3.5 Exactitud…….. 31
3.6 El límite de detección…… 31
3.7 Cartas de control…… 32
4. METODOLOGIA…… 33
4.1 Prevalidación…… 35

4.2 Sensibilidad…… 36
4.3 Precisión…….. 36
4.4 Exactitud…….. 37
4.5 ETAPA DE VALIDACION…….. 37
4.6 Porcentaje de recuperación…….. 38
4.7 Cartas de control…… 38
4.8 Rechazo de datos…….. 38
5 RESULTADOS Y ANÁLISIS…… 38
5.1 PREVALIDACION…….. 39
5. 2 LIMITES DE DETECCION…… 42
5. 2.1 Limite de detección instrumental…….. 43
5. 2.2 Limite de detección del método (LDM)…… 43
5.3 SENSIBILIDAD…… 45
5.4 PRESICION…… 48
5.5 MEDICIONES FINALES DE DQO EN MUESTRAS REALES Y ESTÁNDARES PARA FINALIZAR LA VALIDACION…….. 52
5.6 EXACTITUD…… 59
5.7 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN…… 60
5.8 CARTA DE CONTROL…….. 61
CONCLUCIONES…….. 63
RECOMENDACIONES…… 64
BIBLIOGRAFÍA…….. 65
ANEXOS…… 68

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Ensayos de validación……. 38
Tabla 2. Equipos empleados en la metodología de DQO……. 40
Tabla 3. Fecha y absorbancia promedio de siete ensayos por duplicado……. 42
Tabla 4. Datos para cálculo del límite de detección instrumental…….. 43
Tabla 5. Concentraciones para determinar el límite de detección del método…… 44
Tabla 6. Curvas de calibración realizadas durante siete días y datos de pendiente (b), intercepto (a) y coeficiente de determinación (r^2)..... 46
Tabla 7. Cálculos para determinar $S_{y/x}$, S_b y S_a..... 47
Tabla 8. Ensayos de repetibilidad en un mismo día..... 48
Tabla 9. Precisión al nivel de reproducibilidad…….. 50
Tabla 10. Concentración en ppm de Muestras reales y estándares por Método Colorimétrico…….. 55
Tabla 11. Concentración en ppm de Muestras reales y estándares por Método volumétrico…….. 56
Tabla 12. Análisis de Varianza de los dos métodos A y B……. 57
Tabla 13 Datos para una concentración de 50 ppm de DQO para diferentes días. 61

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura1. Montaje de reflujo…….. 25
Figura 2. Reactor de reflujo……. 26
Figura 3. Absorción de radiación electromagnética por parte de un analito….. 27
Figura 4. Estudios de precisión…….. 31
Figura 5. Elementos Básicos de las Cartas de Control de Medias y Mediciones Individuales……... 34
Figura 6. Procedimiento a seguir en un análisis de DQO a rango bajo……... 35
Figura 7. Rango lineal…….. 41
Figura 8. Curvas de Rinbom……. 41
Figura 9. Curvas de calibración promedio……. 43
Figura10. Curvas de calibración de 7 ensayos por duplicado……... 46
Figura11. Absorbancias Vs Secuencia de lecturas……. 49
Figura12. Reproducibilidad entre días……... 51
Figura13. Presión a nivel de repetibilidad y reproducibilidad……. 51
Figura 14. La laguna……. 52
Figura 15. Puente la Carolina……. 53
Figura 16. Recipientes de hicopor para trasportar muestras……. 54
Figura 17. Muestras…….. 54
Figura 18. Adición de H_2SO_4……... 54
Figura 19 Lecturas realizadas Vs concentración Método Colorimétrico……. 58
Figura 20. Comportamiento del %CV Frente a la Concentración en (ppm) de los dos métodos……. 59
Figura 21. Concentración ppm de DQO Vs porcentaje de error……... 60
Figura 22. Carta de control para evaluar la concentración de 50 ppm de DQO como control…….. 62

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Protocolo de manejo del espectrofotómetro UV-Vis. UV2-100 V4.15SERIE 045004

ANEXO B. Promedio de Absorbancias para determinar el rango Lineal por triplicado

ANEXO C. Absorbancias medidas de 5 soluciones estándar por duplicado

ANEXO D. Absorbancias de Muestras reales, estándares y ensayos finales de validación

ANEXO E. Datos para comparación

ANEXO F. Ejercicio de aplicación "libro de Miller"

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ABS:	Absorbancia
ANOVA:	Análisis de Varianza
APHA:	American Public Health Association
AWWA:	American Water Works Association
BK:	Blanco de reactivos y procedimiento
Con:	Concentración
CORPONARIÑO:	Corporación autónoma regional de Nariño
CV (=CV%):	Coeficiente variación
DBO_5:	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DES:	Desviación estándar
DQO:	Demanda Química de Oxígeno
Ea:	Estándar de concentración alta
Eb:	Estándar de concentración baja
Em:	Estándar de concentración media
EMAR:	Entidad de manejo y administración de recurso
FAS:	Sulfato ferroso amoniacal
Hz:	Herz
IDEAM:	Instituto de hidrología meteorología y estudios ambientales
LC:	Línea Central
LDI:	Límite de detección Instrumental
LDM:	Límite de detección del método
LDM_e:	Límite de detección del método estimado
LIA:	Línea Inferior de Advertencia
LIC:	Línea Inferior de Control
LSA:	Línea Superior de Advertencia
LSC:	Línea Superior de Control
M1:	Muestra natural
M1Aa:	M1 adicionada con un nivel bajo, mínimo 50% de M1
M1Ab:	M1 adicionada con un nivel bajo, máximo 30% de M1
M2:	Muestra natural para mirar el efecto de la matriz real de concentración >> M1
nm:	Nano metro
OAE:	Organismo de acreditación ecuatoriana
ppm:	Partes por millón
R (%R):	Porcentaje de recuperación
r:	Coeficiente de correlación

S:	Desviación estándar
S_a:	Desviación estándar del Intercepto
S_b :	Desviación estándar de la pendiente
S_{BK} :	Desviación estándar de blancos
$S_{y/x}$:	Error aleatorio en y
t:	Estadístico Student
UV-Vis:	Ultravioleta Visible
VMAX:	Valor máximo
VMIN:	Valor mínimo
WHO(OMS):	Organización mundial de la salud
$\overline{X}_{abs}$:	Promedio de absorbancia
Ÿ:	Valor estimado o calculado de la variable dependiente
λ:	Longitud de onda
% E:	Porcentaje de error
$\overline{X}$:	Media de una muestra
$\overline{BK}$:	Promedio de blancos
ν:	Frecuencia

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural, de vital importancia que se debe manejar y tratar de conservar. La calidad del agua y su grado de contaminación, definido este como la modificación fisicoquímica, biológica o radiológica, provocada por las actividades socioeconómicas que limitan su uso, se fijan por la comparación de los valores que asumen los parámetros fisicoquímicos, biológicos, microbiológicos y radiológicos con estándares y criterios preestablecidos[1].

La mayor parte de los problemas concernientes a la calidad del agua tienen que ver con su contaminación por materia orgánica, nutrientes y una amplia gama de sustancias químicas. Esta contaminación puede ser un obstáculo en el uso sostenible del agua para el abastecimiento humano, agrícola, industrial, hidroenergético, recreacional y turístico[1].

Las aguas residuales, las cuales fluyen libremente a vertientes más grandes y finalizan su recorrido en el mar, causan una serie de efectos negativos entre los que se destacan; infecciones por existencia de microorganismos patógenos, toxicidad por presencia de sustancias nocivas (orgánicas e inorgánicas), modificación de la vida acuática por disminución del oxígeno disuelto (materia orgánica), olores y sabores desagradables, contaminación que para su control se hace necesario un análisis y un monitoreo constante[2].

Los usos del agua y residuos líquidos en los distintos países se rigen por leyes y decretos, en Colombia están reglamentados por el decreto 1594 del 26 de junio de 1984. En el departamento de Nariño, la Corporación Autónoma Regional de Nariño (CORPONARIÑO) tiene asignada por ley las funciones de EMAR y por lo tanto debe aplicar los criterios de calidad establecidos en el Decreto 1594, una de sus funciones es la realización de análisis químicos a aguas residuales para aplicar y hacer cumplir las normas sobre vertimientos, además debe establecer modelos de simulación de calidad que permitan determinar la capacidad asimilativa de sustancias biodegradables o acumulativas y la capacidad de dilución de sustancias no biodegradables en los cuales se incluyen análisis de DQO[3].

El método de la DQO es un método que se ha desarrollado con el pasar del tiempo. Comenzando las primeras publicaciones de oxidación de materia orgánica por Adeney y Dawson en 1926, como uno de los primeros informes. El método de DQO todavía se utiliza hoy en día tras haber transcurrido más de 80 años, excepto

[1] G MARTHA; D FELIX; M RODRIGO; G HÉCTOR; V NELSY; D EFRAÍN; V OMAR; P LORENZO; S NANCY; G JEREMIAS; C GUILLERMO. “El agua”. El medio ambiente en Colombia. 2ª versión de la edición de 1998. Bogotá, IDEAM, 2001. p 304.

[2] Análisis Químico Farmacéutico de Medicamento UTEA. Primera edición, Grupo Editorial Limusa México 2001. p 415.

[3] MAYARÍ N Rogelio; ESPINOSA María del C.; SUÁREZ M Margaret; RODRÍGUEZ P Xiomara, ÁLVAREZ LL Yamile. “Revista CENIC Ciencias Químicas, Vol. 36, No. Especial, 2005”. Material de Referencia para la Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en Aguas y Aguas Residuales.

el catalizador de plata el cual parece estar ausente en las primeras etapas y es introducido en investigaciones posteriores. Desde 1949 la DQO ha existido como un procedimiento recomendado oficialmente y ha sido publicado como tal por parte de Standard Methods.

El método para determinar DQO, en el laboratorio de análisis de aguas residuales de CORPONARIÑO es el método clásico volumétrico y se requería la validación de la técnica de DQO por colorimetría en sus análisis, además de incluirlo como parámetro de importancia en su laboratorio, en el proceso de acreditación que se adelantará ante el IDEAM. Así, este trabajo muestra los resultados obtenidos en la medición de DQO por espectrofotometría, con los criterios analíticos de confianza de la metodología como son: exactitud, precisión, linealidad, límites de detección, sensibilidad y porcentaje de recuperación. Todo esto permite demostrar que la metodología analítica validada proporciona resultados confiables y adecuados para el propósito para el cual se plantea.

Los resultados de precisión y exactitud mostrados por cálculos estadísticos en este trabajo son confiables y están dentro del rango que se ha establecido por el IDEAM.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Validar parcialmente la técnica DQO a Rango bajo por reflujo cerrado, mediante colorimetría, utilizando dicromato de potasio como agente oxidante, en las condiciones del laboratorio de aguas residuales de CORPONARIÑO.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Definir el rango de aplicación del método
- ✓ Determinar el límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, precisión y exactitud del método colorimétrico
- ✓ Determinar el porcentaje de recuperación del método colorimétrico
- ✓ Elaborar cartas de control del método colorimétrico
- ✓ Hacer una comparación entre métodos, método volumétrico y colorimétrico

2. MARCO TEORICO

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1 INICIOS Y DESCRIPCION DE LA DQO.

Desde hace mucho tiempo, los agentes químicos oxidantes han sido usados para medir la demanda química de oxígeno de las aguas contaminadas. Durante muchos años se utilizaron soluciones de permanganato de potasio y los resultados se llamaban consumo de oxígeno por permanganato. La oxidación producida por el permanganato era altamente variable en los diferentes tipos de compuestos, y el grado de oxidación cambiaba de manera considerable con la concentración del reactivo usado. Los valores del consumo de oxígeno eran significativamente menores que los de la DBO en cinco días. Este hecho demostraba la incapacidad del permanganato para llevar la oxidación hasta un punto final específico.

El sulfato férrico, el yodato de potasio y el dicromato de potasio son otros agentes oxidantes que han sido extensamente estudiados para la determinación de la demanda química de oxígeno. Se ha visto que el dicromato de potasio es el más práctico de todos[4], puesto que es capaz de oxidar casi completamente una gran variedad de sustancias orgánicas hasta dióxido de carbono. El método empleado tradicionalmente para obtener el valor de la DQO es el denominado Método Normalizado, en el cual el agente oxidante es el dicromato potásico.

Un importante punto a favor del dicromato de potasio es que el exceso se puede medir con relativa facilidad. Para que el dicromato de potasio oxide completamente la materia orgánica, la solución debe ser fuertemente ácida y estar a temperatura elevada. En consecuencia, los materiales volátiles originalmente presentes y los que se han formado durante el periodo de digestión se pierden, a menos que se hagan las previsiones necesarias para evitar su escape. Con este fin se suelen emplear los condensadores de reflujo, que permiten que la mezcla haga ebullición sin pérdida significativa de los compuestos orgánicos volátiles.

Se puede decir, que algunos compuestos orgánicos, tales como, hidrocarburos saturados, piridina y ciertas ligninas, son particularmente resistente a éste proceso de oxidación. No obstante, puede asumirse que para la gran mayoría de las muestras la oxidación de la materia orgánica bajo condiciones específicas alcanza una extensión de alrededor del 95% en relación con el total de la materia orgánica existente en la muestra[4].

[4]Universidad Autónoma de Yucatán Facultad de Ingeniería; maestría en ingeniería opción ambiental práctica n°. 8. Determinación de demanda química de oxigeno (dqo) y demanda bioquímica de oxigeno. p.13.

Indicando de esta manera que el mejor oxidante que se puede emplear para un procedimiento de DQO es el dicromato de potasio, jugando un papel fundamental en el área de materia con difícil oxidación. Las primeras publicaciones fueron realizadas en 1926 como una publicación única por Adeney y Dawson, la cual se cita en 1949 por Moore et al, del Servicio de Salud Pública de los EE.UU. Este documento, citado es uno de los primeros informes en los que se utiliza dicromato y ácido sulfúrico más calor, método para producir un equivalente químico rápido de la medición de DQO. El método de DQO todavía se utiliza hoy en día tras haber transcurrido más de 80 años, excepto el catalizador de plata el cual parece estar ausente en esa etapa. Desde 1949 la DQO ha existido como un procedimiento recomendado oficialmente y había sido publicado como tal por parte de Standard Methods. Moore, experimentalmente considera la eficiencia de la oxidación por dicromato con ácido sulfúrico de 50% v/v más reflujo por 2 h para cerca de 32 compuestos orgánicos de diversas clases[5].

Los estudios siguientes de materia orgánica refractaria a la oxidación fueron reportados por Janicke en 1983, citado ampliamente por Baker 1999. Baker y anteriormente Janicke consideró que 565 especies distintas en 64 clases de productos químicos orgánicos pueden ser oxidados con el método DQO en su forma moderna, incluyendo la presencia de un catalizador Ag_2SO_4. Otro investigador como lo es Kim, es más amplio que Baker, en los estudios de DQO e informa 3 métodos diferentes experimentales:

(a) DQO: convencional dicromato/H_2SO_4 digestión con Ag_2SO_4 catalizador;

(b) DQO: con Mn método alternativo, preferido en Japón y Corea, con permanganato/H_2SO_4 mas Ag_2SO_4 catalizador;

(c) DQOphoto: un método de TiO_2 fotocatalítico desarrollado en laboratorio.

Si bien este método utiliza la misma oxidación foto catalítica de compuestos orgánicos en el UV-TiO_2 iluminado como PeCOD así, el principio de medición es muy diferente. En el aparato de Kim un electrodo de oxígeno se utiliza para medir el cambio en la concentración de oxígeno disuelto en la solución de la muestra debido a la oxidación de los compuestos orgánicos[5].

Las únicas dos moléculas orgánicas identificadas como totalmente resistente a la oxidación fotocatalítica son tetracloruro de carbono y ácido cianúrico. El primero, CCl_4, se cree que es debido a que la resistencia del proceso de oxidación fotocatalítica se inicia con la abstracción de un hidrógeno orgánico, pero el CCl_4 no contiene hidrógeno.

[5] Acuadiagnostic, Concerning Recalcitrant/Refractory Organic Species and Chemical Oxygen Demand (COD) analysis by two different methods: (a) CODCr (the dichromate method) and (b) TiO_2/UV photo electrochemistry (the PeCOD™ method). p.2-12

Esta última, con la fórmula $(CNOH)_3$, es una molécula muy estable y es muy resistente a la oxidación. El ácido cianúrico es un compuesto químico industrial útil, usado como un precursor o un componente de la lejía, desinfectantes y herbicidas[6].

2.2 DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO (DQO)

Se denomina DQO a la cantidad de materia orgánica e inorgánica en un cuerpo de agua susceptible de ser oxidada y se expresa en miligramos de oxígeno por litro (mg O_2/L). La prueba se basa en que todos los compuestos orgánicos, con unas pocas excepciones, pueden ser oxidados por la acción de agentes oxidantes fuertes. Los nitrógenos aminados (con un número de oxidación de -3) se convierten a nitrógeno amoniacal (Ecuación 1). Sin embargo, el nitrógeno orgánico en estados más altos de oxidación se convierte a nitratos. La DQO permite hacer estimaciones de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), que a su vez es una medida de la cantidad de oxígeno consumido en el proceso biológico de degradación de la materia orgánica en el agua; el término degradable puede interpretarse como expresión de la materia orgánica que puede servir de alimento a las bacterias; a mayor DBO, mayor grado de contaminación. En los parámetros de (DQO) se acelera los procesos de biodegradación que realizan los microorganismos, mediante un proceso de oxidación forzada, utilizando oxidantes químicos y métodos debidamente estandarizados, que tienen por objeto garantizar la reproducibilidad y la repetibilidad de las mediciones[7].

2.2.1 Descripción de la DQO

La (DQO), representa la cantidad de oxígeno equivalente a la cantidad de agente oxidante químico ($K_2Cr_2O_7$, $KMnO_4$) empleado en la reacción de oxidación, el ensayo se lleva a cabo en presencia de sulfato de plata (que actúa como catalizador), sulfato de mercurio (II), el cual evita la interferencia de los iones cloruro, en medio acido (H_2SO_4) y a reflujo (abierto o cerrado); el $K_2Cr_2O_7$ no reducido se determina bien mediante valoración con sulfato de hierro (II) y amonio (FAS) e indicador ferroína, donde la cantidad de dicromato reducida (cantidad inicial ─ cantidad remanente) es una medida de la materia orgánica oxidada. También, se emplea el método espectrofotométrico (λ=620 o λ=600 nm para Cr^{3+}, y λ=420 nm para Cr^{6+}). Las unidades son también mg de O_2/L. Este ensayo mide materia orgánica total, aunque también incluye la contribución de compuestos inorgánicos reducidos (Fe^{2+}, Mn^{2+}, NO_2^-, S^{2-}, etc.), si están presentes en la muestra[8].

[6] Ibid.,p.21.

[7] HARVEY David. "Modern Analytical Chemistry". De Pauw University. USA . McGraw-Hill Higher Education. p.346-653.

[8] Contaminación Ambiental. Análisis de contaminantes ambientales, Instrumentos de gestión medioambiental en la industria p 35.

El dicromato de potasio, es más práctico y produce resultados reproducibles y es capaz de oxidar una gran variedad de sustancias casi completamente a dióxido de carbono y agua. La piridina (C_5H_5N) y los compuestos relacionados con ella resisten la oxidación y compuestos como los hidrocarburos aromáticos, no son oxidados bajo ninguna circunstancia. El amoniaco presente en la materia orgánica que contiene nitrógeno, o liberado desde ella, no es oxidado en ausencia de una concentración significativa de iones cloruro libres. Otros compuestos orgánicos, tales como alcoholes y aminoácidos, no son oxidados por el dicromato a menos que exista un catalizador; los iones plata cumplen efectivamente esta función y por esto se adiciona sulfato de plata como catalizador [9,10].

En la muestra sometida a reflujo por dos horas con dicromato de potasio en ácido sulfúrico concentrado ocurre la reacción indicada en la ecuación 1.

$$MO\ (C_nH_aO_bN_c) + Cr_2O_7^{-2} + H^+ \xrightarrow{\triangle} NH_4^+ + 2Cr^{3+} + CO_2 + H_2O \qquad (1)$$

MO = Materia Orgánica.

El ion dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$) es el agente oxidante porque en solución ácida consume electrones y el cromo hexavalente se reduce a cromo trivalente reacciones expresadas en las ecuación 2 y 3.

$$Cr_2O_7^{-2} + 14H^+ + 6e \longrightarrow 2Cr^{3+} + 7H_2O \qquad (2)$$

$$Cr^{6+} + 3e \longrightarrow Cr^{3+} \qquad (3)$$

Cuando se determina el dicromato residual después de la digestión haciendo uso del método volumétrico, el FAS suministra los iones ferrosos reductores (Fe^{2+}) presentándose una reacción de oxidación (ecuación 4)[9,10].

$$6Fe^{2+} + Cr_2O_7^{-2} + 14H^+ \longrightarrow 6Fe^{3+} + 2Cr^{3+} + 7H_2O \qquad (4)$$

El punto final en este método se determina utilizando ferroina (1,10-fenantrolina), que forma un complejo de color rojo con el ion ferroso, a medida que el dicromato color naranja, es reducido a Cr^{3+} de color verde, los iones Fe^{2+} forman un complejo con el indicador ferroina para producir un color carmelita rojizo. El vire final es muy claro de un color azul verdoso a rojo carmelitoso[11].

[9] ROMERO ROJAS Jairo Alberto. "Acuiquimica". Primera edición: febrero de 1996, Santa fe de Bogotá Colombia. p.302.

[10] APHA-AWWA-WPCF. Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, USA: American Public-Health.

[11] Ibid., p.23.

El sulfato de plata puede ser incluido para catalizar los procesos de la oxidación de alcoholes y ácidos de bajo peso molecular. Los iones del cloruro dan una interferencia positiva por la reacción mostrada en la ecuación 5. La interferencia es reducida por la adición del sulfato de mercurio (II), el cual es agregado a la muestra antes de adicionar los otros reactivos, evitando la interferencia causada por los cloruros por la formación de un complejo de cloro, que además no permite que se precipite la plata como AgCl (ecuación 6).

$$Cr_2O_7^{-2} + 6Cl^- + 14H^+ \longrightarrow 2Cr^{3+} + 3Cl_2 + 7H_2O \qquad (5)$$

$$2Cl^- + Hg^{++} \longrightarrow HgCl_2 \quad \text{(Complejo poco reactivo)} \qquad (6)$$

Se prefiere el método de reflujo de dicromato a los procedimientos que utilizan otros oxidantes debido a su mayor capacidad oxidante, a su aplicabilidad a una mayor variedad de muestras y a su fácil manipulación. La oxidación de la mayoría de los compuestos orgánicos es del 95 al 100 % del valor teórico[12].

En los ensayos de DQO se utiliza, para controlar la técnica y calidad de los reactivos, como solución estándar, una solución preparada a partir de 425 mg de biftalato de potasio, $KC_8H_5O_4$, en 1000 mL de agua destilada. La oxidación de biftalato de potasio, en el ensayo de DQO se representa en la ecuación 7. Además, la oxidación biftalato de potasio en presencia de ácido sulfúrico se puede representar con la ecuación 8.

$$41H_2SO_4 + 10K_2Cr_2O_7 + 2KC_8H_5O_4 \longrightarrow 10Cr_2(SO_4)_3 + 11K_2SO_4 + 16CO_2 + 46H_2O \qquad (7)$$

$$2\,KC_8H_5O_4 + 15\,O_2 + H_2SO_4 \longrightarrow 16\,CO_2 + 6H_2O + K_2SO_4 \qquad (8)$$

La reacción (ecuación 8) indica que 2 moles de biftalato de potasio consumen 15 moles de oxígeno, por tanto 10 moles de $K_2Cr_2O_7$ tienen el mismo poder oxidante que 15 moles de oxígeno.

La solución estándar de $KC_8H_5O_4$ tiene una DQO teórica de 500 mg/L. En el ensayo se recupera prácticamente el 100 % de la DQO teórica del biftalato de potasio. Como se demuestra en el ensayo de DQO anterior el biftalato de potasio tiene una DQO teórica de 1.176 mg O_2/mg de $KC_8H_5O_4$ (500/425)[9]. La solución de biftalato de potasio es estable hasta 3 meses cuando se congela en ausencia de crecimiento biológico visible.

[12] Ibid., p.23.

2.2.2 DQO a reflujo abierto.

Este método se basa en los principios químicos explicados anteriormente para la prueba DQO y se realiza en un montaje de calentamiento a reflujo por 2 horas a presión atmosférica (figura 1)[9]. La cantidad de muestra utilizada está entre 50 y 100 mL. La consecuencia de una menor temperatura de digestión en el sistema abierto, se compensa con una mayor concentración en la solución digestora. El método es aplicable a muestras con DQO relativamente alto (mayores de 10 mg O_2/L). Para muestras con bajos valores de DQO, se deben emplear alícuotas de solución digestora de 5 mL y reducir todas las proporciones en esta misma escala, en balones de reacción de 50 mL de capacidad.

Figura 1. Montaje de reflujo

Fuente: Esta investigación.

2.2.3 DQO a reflujo cerrado.

Es aplicable a muestras previamente homogenizadas o de naturaleza muy homogénea y/o cuando la disponibilidad de muestras es escasa.

Los compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en la muestra de agua se oxidan bajo condiciones de ácido crómico fuerte, durante un período de digestión de dos horas a una temperatura de 150 ºC en un reactor precalentado (figura 2). Los reactores, emplean un bloque calentador con un sistema de control de temperatura muy preciso, para garantizar que la temperatura de digestión sea exactamente de 150ºC ±2ºC. Los recipientes para depositar las muestras son viales de diferentes tamaños [13, 14].

Figura 2. Reactor de reflujo

[13] APHA-AWWA-WPCF. Standar Methods. Op.,cit. p. 23.

[14] R. RUIZ CHAVEZ, J. A. Rodríguez Castro, R. García Acevedo, J. A. Chávez Cárdenas, M. Serrano Medrano. Determinación de la demanda química de oxígeno y su importancia en la ingeniería ambiental.p.155-157.

Fuente: Esta investigación

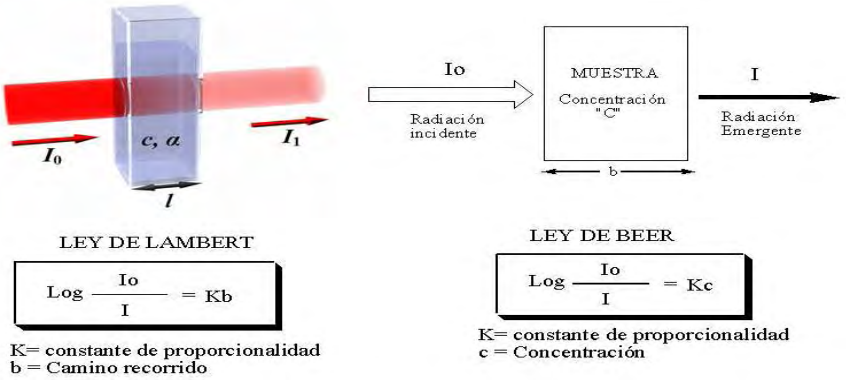
El método a reflujo cerrado es más económico en cuanto al uso de reactivos, pero requiere una mayor homogenización de las muestras que contienen sólidos suspendidos para obtener resultados reproducibles. Básicamente consiste en someter las muestras a tratamiento térmico durante unas dos horas en un digestor, después de la adición de un exceso conocido del oxidante.

2.2.4 FUNDAMENTOS DE ESPECTROFOTOMETRIA

Cada especie molecular puede absorber sus frecuencias características de radiación electromagnética. La ley de absorción (Ley de Beer-Lambert), indica cuantitativamente la forma en que el grado de atenuación depende de la concentración de las moléculas absorbentes y de la longitud del trayecto en el que ocurre la absorción.

Como se muestra en la figura 3 la intensidad de la energía radiante incidente I_o puede ser absorbida por el analito, lo que produce la transmisión de menor energía radiante, I. En la figura 3 se ilustra la atenuación de un haz paralelo de radiación monocromática a su paso por una solución absorbente con grosor de b cm y concentración de *c* mol/L. Debido a las interacciones de los fotones con las partículas absorbentes la fuerza radiante del haz se reduce de I *a* I_o (P_o a P)

Figura 3.Absorción de radiación electromagnética por parte de un analito



Fuente: Ley de Beer Lambert[en línea]. Disponible en es.wikipedia.org/wiki/

Ley_de_Beer-Lambert

La transmitancia *T* de la solución es la fracción de radiación incidente que se trasmite en la solución, como se muestra en la formula (F1).Es frecuente que se exprese como un porcentaje, denominado porcentaje de transmitancia.

$$T = \frac{P}{Po} \text{(F1)}$$

La absorbancia *A* de una solución se relaciona con la transmitancia de manera logarítmica, como lo indica la formula F2.

$$A = -Log\ \mathrm{T} = Log\ \frac{Po}{P} \text{ (F2)}$$

Normalmente, la transmitancia y absorbancia, según se definen en las formulas F1 y F2 y se ilustra en la figura 3, no son susceptibles de medida como se muestran, ya que la solución que se estudia debe mantenerse en algún tipo de recipiente (celda o cubeta) [15].

2.2.4.1 Ley de Beer.

Según la ley de Beer, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente *c* y a la longitud del trayecto *b* del medio de absorción, como se expresa en la formula F3.

$$A = \mathrm{Log}\frac{Po}{P} = abc \text{(F3).}$$

En F3 a es la constante de proporcionalidad llamada absortividad. Dado que la absorbancia es una cantidad sin unidades, la absortividad debe tener unidades que eliminen a las de *b* y *c*. Cuando la concentración se expresa en mol/L y *b* en centímetros, la constante de proporcionalidad se llama absortividad molar y recibe el símbolo especial de ε.

2.2.4.2 Espectrofotómetro

Los instrumentos espectroscópicos característicos incluyen cinco componentes: (1) una fuente estable de energía radiante, (2) un recipiente transparente para contener la muestra, (3) un dispositivo que aislé una región del espectro para la medida, (4) un detector de radiación que convierta la energía radiante en una

[15] D.A SKOOG, D.M WEST, F.J HOLLER, S.R CROUCH “fundamentos de química analítica”; octava Edición.

señal eléctrica, (5) un sistema de procesamiento y lectura de la señal que visualice la señal detectada en una escala medida.

Para el método validado de DQO, se utilizó un equipo UV-Vis de doble haz, en este tipo de instrumentos, un espejo en forma de V denominado divisor de haz forma dos haces en el espacio. Un haz pasa a través de la solución de referencia y continua hasta un fotodetector, simultáneamente el segundo atraviesa la muestra hasta un segundo detector. Las dos señales de salida se amplifican y su cociente (o el log de su cociente) se determina electrónicamente y se visualiza mediante un dispositivo de salida[16].

2.2.4.3 DQO Por método espectrofotométrico

La materia orgánica presente en una muestra de agua es oxidada por el dicromato de potasio, presentándose un cambio en el estado de oxidación del cromo de Cr^{6+} a Cr^{3+}. Los dos estados de oxidación en estas especies del cromo son coloreados y absorben radiación electromagnética en la región visible del espectro. El ion dicromato ($Cr_20_7^{2-}$) absorbe fuertemente en los 420 nm región dónde la absorción de él ion cromo (Cr^{+3}) es mucho menor. El ion cromo (Cr^{+3}) absorbe fuertemente en los 600 nm, región dónde el dicromato presenta muy poca absorción[17].

Para los valores de DQO entre 100 y 900 mg/L (ppm), aumenta la concentración de Cr^{+3} por lo cual es determinado a 600 nm, para valores más altos de DQO es necesaria la dilución de la muestra. Los valores de DQO de 90 mg/L o menores pueden ser cuantificados siguiendo la disminución del ion dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$) a 420 nm. La generación correspondiente de Cr^{+3} a un aumento de absorción pequeño a 420 nm, pero esto se compensa en el procedimiento de la calibración[18].

2.2.5 Residuos químicos producidos en el análisis de DQO

Una vez finalizado el análisis, se considera que por lo menos un 95% de la materia orgánica se oxida y que se obtienen como productos principales CO_2, residuos de materia orgánica (eventualmente puede quedar una pequeña parte sin oxidarse) y la solución acuosa, principalmente con especies de cromo, plata y en menor proporción de mercurio (el que permanece sin reaccionar con los cloruros de la muestra a analizar). En el líquido también se presentan algunos precipitados, principalmente cuando la muestra tiene cloruros (especialmente por la acción de la plata y el mercurio con ellos), además de compuestos químicamente estables que se forman debido a los enlaces carbono mercurio. Dada las concentraciones con las que quedan el cromo, la plata y el mercurio en los residuos de análisis de DQO

[16] Ibid., p. 27.

[17] APHA-AWWA-WPCF. Standar Methods. Op.,cit. p. 23.

[18] APHA-AWWA-WPCF. Standar Methods. Op.,cit. p. 23.

(máximo del orden de 1,53 g/L; 3,27 g/L y 7,52 g/L, respectivamente), estos no se pueden eliminar por las alcantarillas, especialmente por el poder contaminante del cromo y el mercurio, ya que estos valores están muy por encima de lo que recomienda la organización mundial de la salud (los valores deben estar por debajo de 0,1 mg/L, 2 µg/L y 25 µg/L, respectivamente en los tres metales) (WHO, 2000). En Colombia se debe cumplir el decreto 1594 de 1984 (Normativa ambiental de aguas) y en México, la norma es la NOM-052-ECOL-1993[19].

3. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALITICOS

La Validación de métodos analíticos es la confirmación mediante examen y aporte de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico de un método de análisis químico. La validación consiste en una serie de ejercicios que tiene por objeto medir o determinar el desempeño de un método analítico antes de implementar su uso como rutinario en el laboratorio y debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de la aplicación del método. Algunos de los principales parámetros que miden el desempeño de un método analítico son.

3.1 La selectividad.

La selectividad es la capacidad del método para medir las sustancias de interés, en presencia de los componentes que se suponen estén presentes dentro de la muestra. La falta de selectividad de un método suele ser origen de muchos errores sistemáticos[20,21].

La selectividad de un método analítico se debe determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, porque debe conocerse en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencia de otras sustancias relacionadas con el de una u otra forma[22].

3.2 Linealidad y rango.

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la

[19] LOPEZ-GALAN Jorge E. “Separación de plata, mercurio y cromo de residuos provenientes de demanda química de oxigeno (DQO). Escuela de Ingeniería Química, Universidad del Valle, Cali, Colombia. p.115.

[20] http:/www.udistrial.edu.co/comunidad/estudiantes/dlilian/que_es_valid.htm#_3.7.4. Parámetros marzo 21/09.

[21] RIUS F.Xavier, MAROTO Alicia, BOQUE Ricard, RIU Jordi. “La validación de métodos analíticos. Instituto de estudios avanzados. Universidad Rovira Virgili, Tarragona España. p.48 .

[22] AGUIRRE ORTEGA Leticia. GARCIA F Javier. MORENO Susana. GARCIA AVILA. Antonia ENCIMA GARCIA Gregorio. CORTES LORAS Rogelio.. “Validación de Métodos Analíticos”. Barcelona: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria AEFI 2001. p.331.

concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido, que es el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método. El estudio de la linealidad no solo involucra una representación gráfica si no que es necesario realizar una comprobación estadística, mediante la determinación de la ecuación de la recta, calcular el coeficiente de correlación (r) y de determinación (r^2), varianza residual constante (homoscedasticidad), análisis de varianza, test de linealidad y test de proporcionalidad[20, 22].

3.3 La sensibilidad.

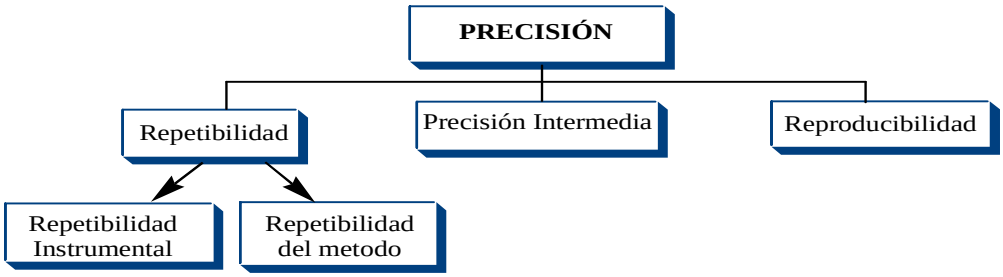
La sensibilidad es por definición, "el cambio en la respuesta con respecto al cambio en la concentración "$\Delta R/\Delta C$". La sensibilidad del método está dada por la pendiente de la curva de calibración (ejemplo, Absorbancia Vs Concentración). Al igual que el rango, la sensibilidad de un método analítico tiene una aplicación limitada debido a que es fácilmente manejable alterando algunas variables de la medición[23].

3.4 La precisión.

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea. En este sentido la precisión es una medida del grado de "reproducibilidad" de las medidas para un determinado conjunto de mediciones. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o como desviación estándar relativa (coeficiente de variación).

La precisión incluye diferentes tipos de análisis como se indican en la figura 4[24, 25].

Figura 4. Estudios de precisión



Fuente: Esta investigación

[23] Ibid., p. 30.

[24] D.A SKOOG, Op. Cit., p. 27

[25] COY Gustavo Alfonso, "Protocolo Estandarización de métodos analíticos" Instituto de Hidrológica, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM). Bogotá. Noviembre 199. P.44 .

Repetibilidad: es la medida de precisión de datos obtenidos por un solo operador trabajando siempre en las mismas condiciones (equipo, materiales y reactivos).

Precisión intermedia: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y un mismo laboratorio.

Reproducibilidad: es la medida de la precisión de los datos obtenidos entre dos o más analistas y/o laboratorios que utilizan el mismo método y similares condiciones.
La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas y se calcula como se indica en la fórmula 4:

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} \text{ x } 100 \text{ (F4)}$$

Dónde:
S = Desviación estándar
$\bar{X}$ = Media aritmética de los resultados

3.5 La exactitud.

La exactitud de un procedimiento analítico que expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado. El valor aceptado como verdadero puede ser obtenido de diferentes formas: una es comparando los resultados con un método que se ha establecido como referencia; en esta aproximación se asume que la incertidumbre del método de referencia es conocida. La forma más usual de evaluar la exactitud del método de análisis es a través del porcentaje de recuperación, haciendo una adición conocida de analito en la muestra. Frecuentemente se aplica un ensayo t student para encontrar diferencias significativas entre el porcentaje de recuperación obtenido y el esperado [26,27].

3.6 El límite de detección.

El límite de detección se define a partir de la más pequeña cantidad detectable por encima del ruido de un procedimiento y dentro de un límite declarado de aceptación, establecido de modo que las probabilidades de que se presenten

[26] Ibid., p. 31.

[27] RODRÍGUEZ, Y. "Establecimiento de una metodología analítica para la determinación de nitratos en agua superficial y lluvia y de nitrógeno orgánico en agua superficial por el método de electrodo de ión selectivo". Universidad Nacional de Colombia. F de Ciencias. Bogotá. 2005.

errores de tipo I (falso positivo) y errores de tipo II (falso negativo) sean razonablemente pequeños[13].

De acuerdo a la metodología de validación del IDEAM, implementada en la validación de DQO se definen los siguientes términos y la forma de determinarlos:

Límite de detección instrumental (LDI). Concentración de analito que produce una señal superior a cinco veces la relación señal/ruido del instrumento; se ha establecido en 1,645 veces el valor s de los análisis de blancos. Es la mínima cantidad de analito que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar.

Límite de detección del método (LDM). Concentración de analito que, cuando se procesa a través del método completo, produce una señal con una probabilidad de 99% de ser diferente del blanco. Para siete réplicas de la muestra, la media debe ser 3,14s veces superior al blanco, donde s es la desviación estándar de siete muestras. Es la mínima concentración de analito presente en la muestra que se puede cuantificar con una adecuada precisión y exactitud[28,29].

Para determinar el LDM se añade el analito al agua grado reactivo o a la matriz de interés para obtener una concentración estándar del blanco (CEb) próxima al LDM estimado; se analizan 10 partes de esta solución y se calcula la desviación estándar, a partir de una tabla de distribución desigual de t, se selecciona el valor de t para n-1 grados de liberta y un nivel de confianza del 95% o el deseado[1430].

3.7 Cartas de control.

Las cartas de control son gráficas que permiten observar y analizar el comportamiento sobre el tiempo de un producto, o de un proceso, con el propósito de conocer si dicho producto o proceso se encuentran o no bajo control.
La forma típica de una carta de control viene dada por tres líneas paralelas a intervalos equidistantes. La línea central (LC) muestra el promedio de la variable que se está analizando; mientras que las otras dos líneas, superior e inferior, a la línea central, se denominan límite de control superior (LCS) y límite de control inferior (LCI).

El fundamento de los gráficos de control se basa en la asunción de la normalidad de los resultados de medida: cuando se lleva a cabo algún proceso de forma sistemática, es decir, bajo las mismas fuentes de influencia o variación, el proceso se verá afectado por errores aleatorios que conducirán a una distribución normal de los resultados. Esta afirmación es una consecuencia del teorema del límite

[28] AGUIRRE. Op. Cit., p. 30.

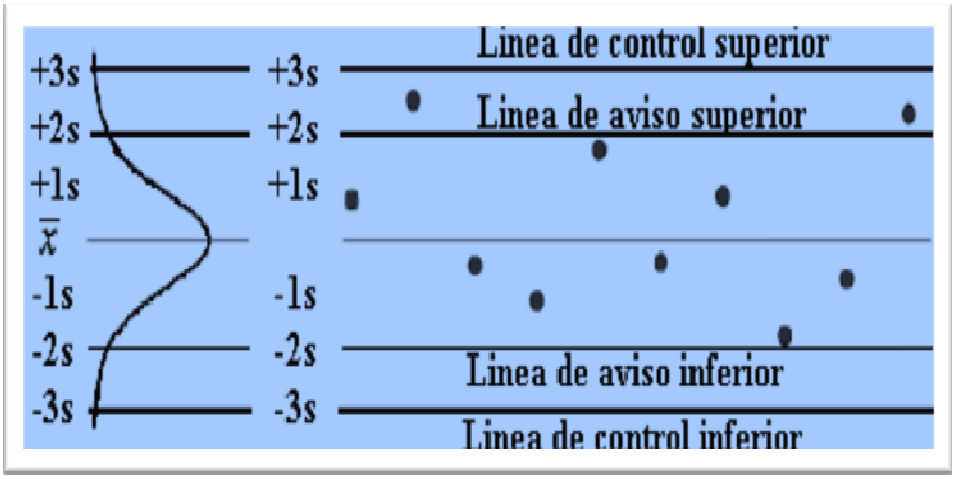
[29] COY. Op. Cit., p. 31.

[30] RIUS. Op. Cit., p. 30.

central, se dirá que el método analítico está bajo control si los resultados obtenidos con este método siguen las características de una distribución normal, es decir aproximadamente el 67% de los resultados han de encontrarse dentro del intervalo: valor de la muestra de control ± 1S (donde S es la desviación estándar asociada a los análisis de la muestra de control con el procedimiento que se desea monitorear), aproximadamente el 95% de los resultados han de encontrarse dentro del intervalo: valor de la muestra de control ± 2S y aproximadamente el 99% de los resultados han de encontrarse dentro del intervalo: valor de la muestra de control ± 3S.Estos intervalos proporcionan los siguientes elementos básicos de las cartas de control de medias y mediciones individuales:

- ✓ La línea central (LC) que puede ubicarse en la mejor estimación del valor medio de la variable o en el valor certificado de un material de referencia.
- ✓ Líneas inferior y superior de advertencia o aviso (LIA y LSA), cada una localizada a dos desviaciones estándar de la línea central (±2S).
- ✓ Líneas inferior y superior de control o acción (LIC y LSC), cada una localizada a tres desviaciones estándar del valor medio (±3S).

Figura 5.Elementos Básicos de las Cartas de Control



Fuente: Evaluación de una arcilla modificada con hierro en la oxidación catalítica de carga orgánica presente en lixiviados producidos en el relleno sanitario antanas (RSA) de pasto.

Cuando los resultados de los análisis de la muestra de control a lo largo del tiempo se encuentran dentro de los límites aceptados, se dice que el sistema se encuentra bajo control estadístico. Cuando se encuentran puntos fuera de los límites especificados, o se encuentran tendencias, se dice que el sistema se encuentra fuera de control[31,32].

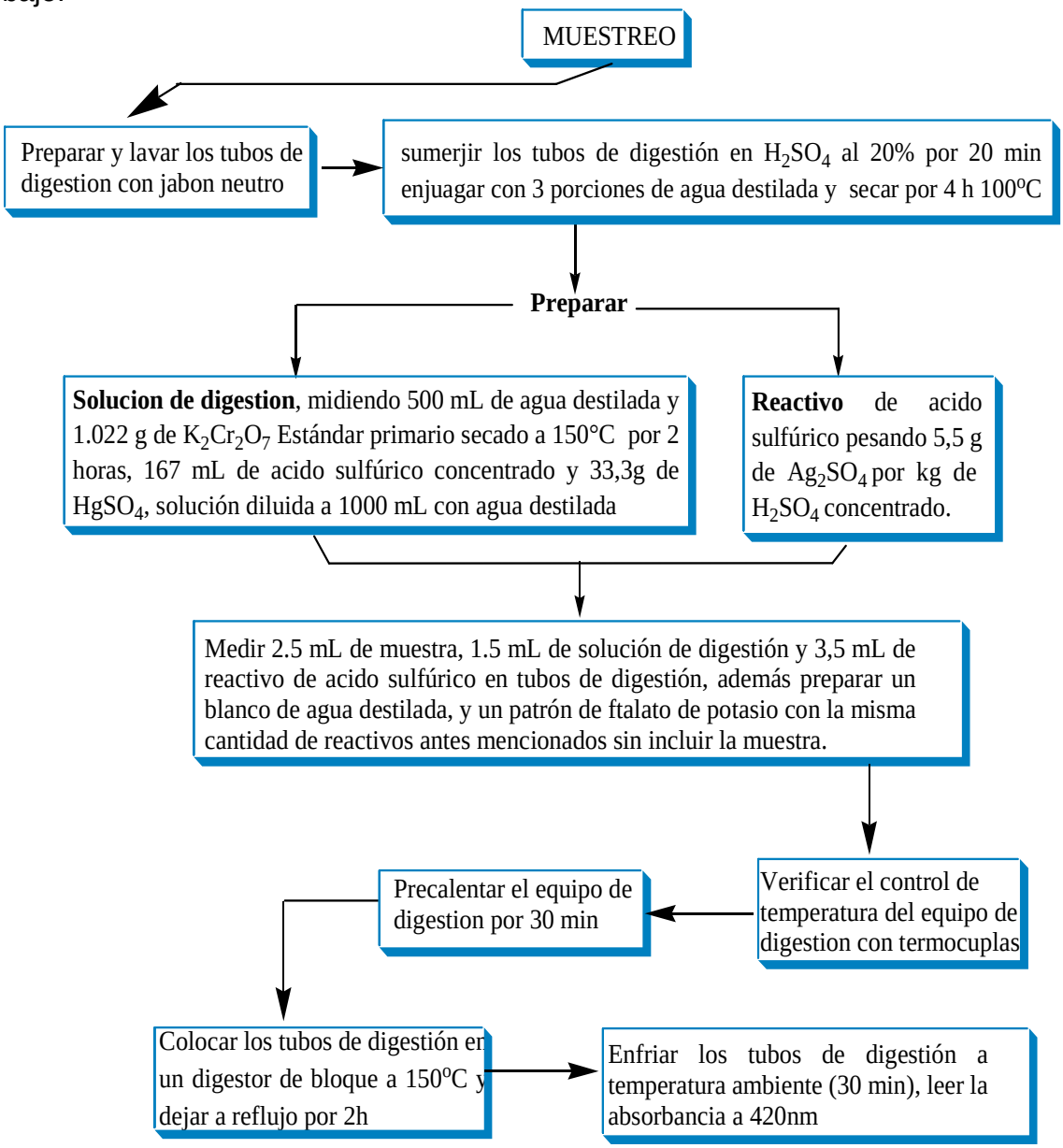
[31] FIGUEROA Jazmin del Rosario; TUTALCHA C Melva J. "Evaluación de una arcilla modificada con hierro en la oxidación catalítica de carga orgánica presente en lixiviados producidos en el relleno sanitario antanas (RSA) de Pasto. Universidad de Nariño, Pasto – Colombia. p.93.

[32] J.C.MILLER. J.N. MILLER. "Estadística para química analítica". Segunda edición, Adison-Wesley Iberoamericana. p.113 .

4. METODOLOGIA.

Se validó el método analítico de DQO 5220 D para la determinación de DQO a reflujo cerrado por el método colorimétrico a rango bajo del Estándar Methods, para el análisis de aguas y aguas residuales de la APHA-AWWA-WPCF, que comprende el procedimiento de la (Figura 6)

Figura 6. Procedimiento a seguir en un análisis de DQO a rango bajo.



4.1 Prevalidación.

Se elaboró el protocolo de manejo del espectrofotómetro UNICAN UV-Vis, que incluye partes del equipo y sus características, funcionamiento y cuidado, donde se presentan de forma clara las indicaciones para el correcto uso del equipo, medición de absorbancia y elaboración de curvas de calibración. El documento elaborado se presenta como anexo en el presente trabajo (Anexo A).

Se validó la determinación de DQO por el método colorimétrico siguiendo el protocolo de validación de métodos analíticos del Instituto de Hidrológica, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) revisado y actualizado en noviembre 10 de 1999[33].

Antes de iniciar el proceso de validación se hizo el montaje de la metodología, para verificar linealidad y determinar rango de concentraciones, se preparó 1000 mL de solución de estándar de ftalato de potasio con un requerimiento químico de oxigeno (DQO) de 500 ppm pesando 425 mg de ftalato de potasio y aforando hasta 1 L, a partir de esta solución se prepararon disoluciones de las siguientes concentraciones: 3, 4, 5, 6, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 90 ppm en DQO y se procedió con la metodología antes mencionada (figura 6) y se analizaron por triplicado durante cuatro días.

Una vez establecido el intervalo de trabajo se realizó una curva de calibración con cinco patrones por duplicado durante 7 días y se procedió a determinar el límite de detección instrumental (LDI), límite de detección del método estimado (LDM_e) y límite de detección del método (LDM)

Límite de Detección Instrumental: Se prepararon blancos utilizando agua destilada, solución de digestión y reactivo de ácido sulfúrico y se realizaron lecturas de absorbancia. Para calcular el límite de detección instrumental aplicando la formula (F5), que resulta útil para valorar la concentración de analito necesaria para producir una señal que permita calcular LDM estimado, el valor indicado de 1,645 es establecido en los protocolos del IDEAM.

$$LDI = 1{,}645 \times s_{BK} \quad (F5)$$

s_{BK} : Desviación estándar de los blancos (BK)

Límite de Detección del método estimado: Se calculó mediante la fórmula (F6)

[33] COY. Op. Cit., p. 31.

$$LDM_{Estimado} = \overline{BK} + (t \times s_{BK})$$

$\overline{BK}$: Promedio de blancos
t : Valor de tabla de distribución desigual t para n-1 grados de libertad al 99% de confianza (F6)

Límite de Detección del método: A partir del LDM estimando se prepararon soluciones de concentración de blancos (CEb) próximas al LDM estimado: 3, 4, 5 y 7 ppm y se analizaron por duplicado. El LDM experimental se determinó mediante la siguiente formula.

$$LDM = \overline{CEb} + (t \times s_{CEb})$$

$\overline{CEb}$: Promedio de concentraciónes de CEb
t : Valor de tabla de distribución desigual t para n-1 grados de libertad al 99% de confianza (F7)

Para estos análisis se determinó coeficiente de variación y límites de confianza al 95%.

4.2 Sensibilidad:

Se realizaron 14 curvas de calibración en el rango establecido en diferentes periodos de tiempo y se tomó el promedio de la pendiente de todas las curvas para reportar la sensibilidad, desviación estándar y límites de confianza al 95%. Además de reportar la curva de calibración promedio, para la cual se calculó desviación estándar de la pendiente y el intercepto, el error aleatorio en y, empleando las siguientes formulas.

Fórmula para el cálculo del error aleatorio en Y

$$\boldsymbol{S_{y/x}} = \sqrt{\frac{\sum_i (yi - \hat{y}i)^2}{n-2}} \quad \text{(F8)}$$

Fórmula para el cálculo de la desviación estándar del intercepto

$$\boldsymbol{Sa} = S_{y/x}\sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n\sum_i (xi - \bar{x})^2}} \quad \text{(F9)}$$

Fórmula para el cálculo de la desviación estándar de la pendiente

$$\boldsymbol{S_b} = \frac{S_{y/y}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{(F10)}$$

4.3 Precisión:

Se realizaron ensayos para determinar la Repetibilidad y reproducibilidad de la siguiente manera.

Repetibilidad: Una vez definido el intervalo lineal del método se analizaron estándares de concentración baja (Eb) de 10 ppm, 20 ppm, media (Em) de 40 ppm, 60 ppm y alta (Ea) de 90 ppm DQO dentro del rango lineal, en un mismo día, realizando 7 lecturas para cada una de ellas.

Reproducibilidad: Se analizaron muestras de características similares a las de repetibilidad realizando las lecturas en días diferentes.

4.4 Exactitud:

A partir del error relativo de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad se analizó la exactitud del método, también se realizo análisis de la exactitud a partir de la comparación con un patrón certificado cuya concentración era de 29 ppm en DQO y con los porcentajes de recuperación en los ensayos finales de validación.

4.5 ETAPA DE VALIDACION

Montado el método se realizaron 7 ensayos en días diferentes con las disoluciones indicadas en la tabla 1

Tabla 1. Ensayos de validación.

Ensayo	Concentración Muestras ppm								
	BK	10	50	90	M1	M2	M1+30%	M1+50%	StrCer
1,2, …7	Agua destilada más reactivos para DQO								

Dónde:
BK: Blanco de reactivos y procedimiento
M1: Muestra de agua natural, rio Pasto para mirar el efecto de la matriz real de concentración menor al 50% del rango
M2: Muestra de agua natural, rio Pasto para mirar el efecto de la matriz real de concentración >> M1
M1+30%: M1 adicionada con un 30% de su concentración.
M1+50%: M1 adicionada con un 50% de su concentración.
Cada ensayo de esta etapa se realizó el mismo día y por duplicado.
StrCer = Patrón Certificado

4.6 Porcentaje de recuperación.

A partir de los datos promedios de las muestras adicionadas M1+30% y M1+50% se determinó el porcentaje de recuperación, mediante la fórmula 11.

$$\%R = \frac{C_{MA} - C_M}{C_A} \times 100$$

C_{MA}: Concentración de la muestra adicionada
C_M: Concentración de la muestra sin adición
C_A: Concentración conocida adicionada a la muestra

(F11)

4.7 Cartas de control.

Para monitorear el método se elaboró una carta de control a partir de un estándar de ftalato de potasio de 50 ppm en DQO, del cual se hicieron 35 mediciones en diferentes días. Se calculó el coeficiente de variación y la desviación estándar. Se establecieron unos límites de confianza del valor medio más dos desviaciones estándar y el valor medio menos dos desviaciones estándar, denominadas limites superior e inferior.

4.8 Rechazo de datos

Mediante la prueba de Grubbs (G ó T) aplicada al valor mínimo y valor máximo, se comprobó la hipótesis nula H_0: todas las medidas proceden de la misma población, frente a la hipótesis alternativa H_1: el valor comparado no pertenece a la misma población de datos y es un dato anómalo que es rechazado. El rechazo de datos se realizó aplicando la fórmula 12. Se acepta la hipótesis nula si G calculado es menor que el valor crítico (Para un nivel de confianza del 95% y n mediciones)

$$G = \frac{|\text{Valor Sospechoso} - \bar{X}|}{s} \quad \text{(F12)}$$

Los datos se ordenaron de menor a mayor y por definición los valores sospechosos serán el valor mínimo y el valor máximo, a los cuales se aplicó la formula anterior, aceptando la hipótesis nula si el G calculado es menor al valor critico a un nivel de confianza del 95% (Valores críticos T para rechazo de datos Anexo E).

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

El material de vidrio utilizado fue: clase A y todos los equipos empleados estaban calibrados por empresas contratistas por parte de Corponariño. Las características de los equipos y algunos materiales empleados en la validación son las siguientes:

Tabla 2. Equipos empleados en la metodología de DQO.

EQUIPOS Y MATERIALES	DESCRIPCION
Pipetas	De capacidad 0,5;1;2;5 y 10 mL Clase A con sus tolerancia respectiva de (±0,006; 0,01; 0,02 mL)
Buretas	De capacidad 25 y 50 mL con tolerancia de (±0,03; 0,05)
Balones aforados	De capacidad 50, 100, y 1000 mL con tolerancia de (±0,05; 0,08 y 0,30 mL)
Mufla con rampas de temperatura	Marca VULCAN modelo # 3-550 120V 50/60 HZ serial N^{O} AKW9542-127
Balanza Analítica	Marca PRECISA 180 A. TYP 290 – 9221/G 180 A, MAX 180 g, 110 v T 160 mA
Agitador magnético con plancha de calentamiento	Marca SCHOTT- GERATE G mbh D657 hofheim/ Ts, Typ MR 106 s, 115 v
Termo Reactor Hach de DQO	P/N 456000-00S/N 941100011705 VOLTS 115/230 V~5
Horno de secado de material	Temp Schutz n. DIN 12880 klasse, Typ1705309900312 N_o#950060 Nentemperatur 099 – $0^{o}C$
Espectrofotómetro UV- Vis	Type: UV2 – 100 240/120 V ~ NC: 9423 UV2 – 1000E 50/60 Hz No UV2 045004 350 VA Made in England

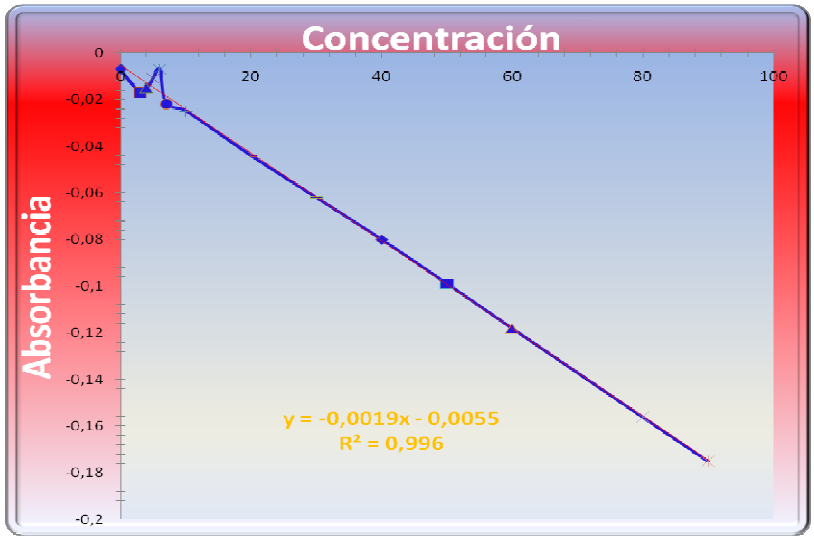
5.1 PREVALIDACION

En la tabla de la figura 7 se presenta los resultados de absorbancia promedio, cálculos que resultaron de los datos registrados en el anexo B (Absorbancias para determinar el rango Lineal). Se observa que La curva de calibración (figura 7) con las distintas soluciones estándar, presenta una buena correlación lineal entre concentración y absorbancia promedio de las mediciones realizadas. Los indicativos de precisión en el Anexo B, son buenos, así como su coeficiente de determinación. Además de las determinaciones y observaciones realizadas se realizó para estos datos las curvas de Ringbom (figura 8) de Concentración Vs absortancia y también la de logaritmo de concentración Vs Transmitancia, para obtener un óptimo intervalo de concentraciones (relación lineal entre absorbancia y concentración). La figura de regresión (figura 7) al igual las curvas de Ringbom nos indica una linealidad desde una concentración aproximada de 8 ppm, sin

embargo se procedió a realizar la prevalidación sobre el intervalo 10 a 90 ppm que era el rango requerido.

Figura 7. Rango lineal

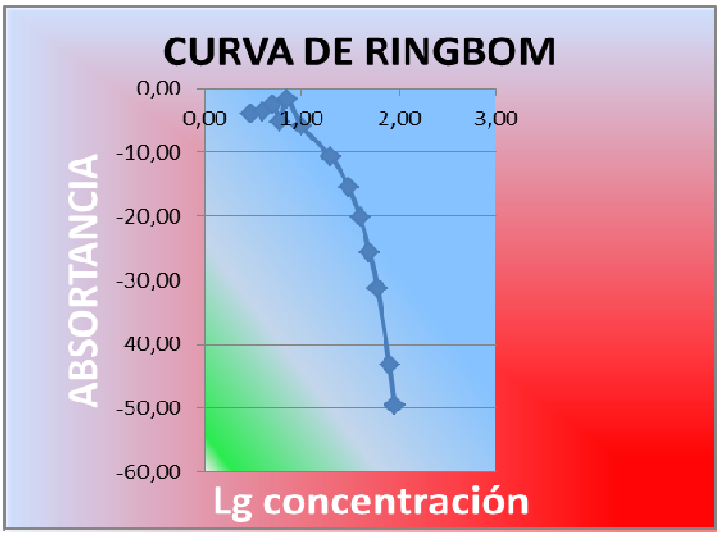
Estándar	Abs
0	-0,007
3	-0,017
4	-0,015
5	-0,011
6	-0,007
7	-0,022
10	-0,025
20	-0,044
30	-0,062
40	-0,08
50	-0,099
60	-0,118
80	-0,156
90	-0,175



Fuente: Esta investigación.

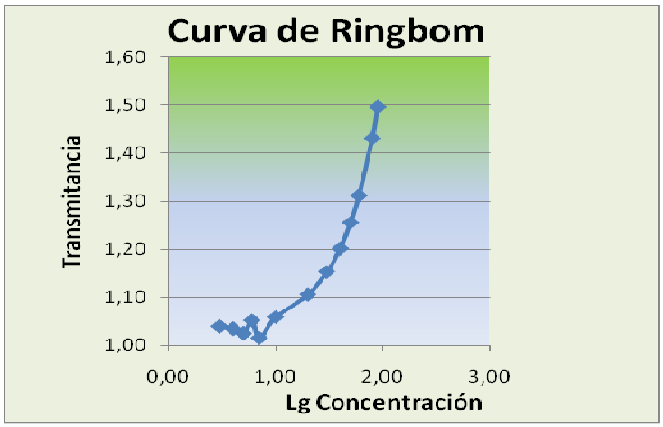
Figura 8. Curvas de Ringbom

Lg C	Absrt
0,48	-3,99
0,60	-3,51
0,70	-2,57
0,78	-5,20
0,85	-1,62
1,00	-5,93
1,30	-10,66
1,48	-15,35
1,60	-20,23
1,70	-25,60
1,78	-31,22
1,90	-43,22
1,95	-49,62



Fuente: Esta investigación.

Lg C	T
0,48	1,04
0,60	1,04
0,70	1,03
0,78	1,05
0,85	1,02
1,00	1,06
1,30	1,11
1,48	1,15
1,60	1,20
1,70	1,26
1,78	1,31
1,90	1,43
1,95	1,50



Fuente: Esta investigación.

En la figura anterior de Transmitancia Vs Lg de concentración podemos apreciar que para el Lg de concentración uno (Lg C 1), la transmitancia es de 1,06; valor que corresponde a un estándar de concentración 10 ppm en DQO, desde este punto y a medida que se incrementa la concentración, la gráfica comienza a tener linealidad, sobre el rango desde la concentración 8,14 según el limite de detección del método, hasta 90 ppm (Lg C 1,95 y T= 1,50 correspondiente al estándar de 90) se cumple los parámetros establecidos para este intervalo.

Una vez verificado el comportamiento lineal de las soluciones patrón para el rango de concentraciones de 10 a 90 ppm en DQO se procedió a realizar curvas de calibración durante siete días según lo indicado en el protocolo. Para las curvas obtenidas de los estándares preparados de concentraciones 10, 20, 40, 60 y 90 ppm de DQO, las cuales se realizaron por duplicado y durante 7 días, el coeficiente de determinación (r^2) de la curva promedio es de 0,9998 valor que aporta una significación alta en correlación de absorbancia frente a la concentración (figura 9). La ecuación de regresión lineal obtenida se utilizó para realizar todos los cálculos de concentración a partir de las absorbancias de las diferentes soluciones, límite de detección instrumental, así como el límite de detección del método y para análisis posteriores de sensibilidad

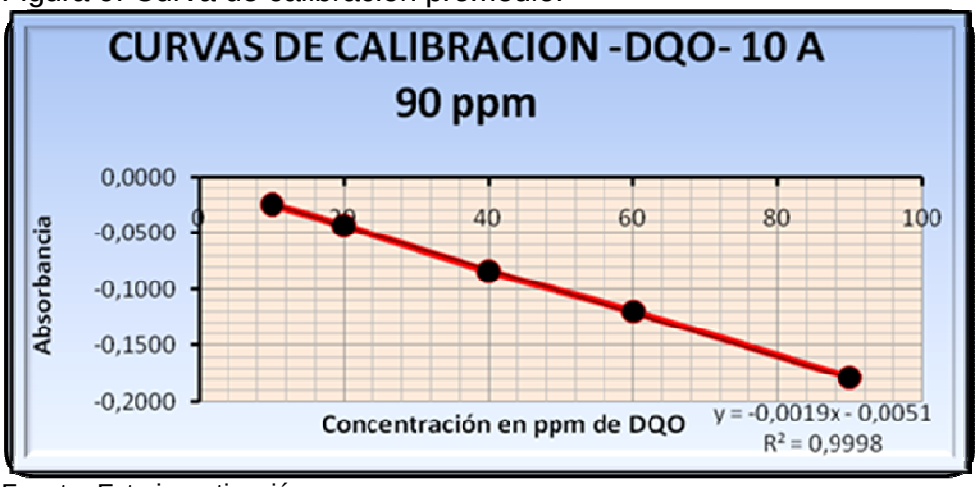
TABLA 3.Fecha y absorbancia promedio de siete ensayos por duplicado.

ppm	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha
	18/5/2010	19/5/010	20/5/010	21/5/010	24/5/010	25/5/010	26/5/010
10	-0,028	-0,026	-0,022	-0,025	-0,024	-0,022	-0,024
20	-0,047	-0,046	-0,041	-0,043	-0,045	-0,035	-0,046
40	-0,083	-0,084	-0,075	-0,082	-0,083	-0,083	-0,080
60	-0,118	-0,119	-0,122	-0,121	-0,119	-0,119	-0,121
90	-0,179	-0,175	-0,177	-0,183	-0,175	-0,179	-0,184
b	-0,0019	-0,0018	-0,002	-0,002	-0,0019	-0,002	-0,002

b = Pendiente

Las absorbancias de la tabla 3 Al igual que la mayoría de las absorbancias registradas en todas las tablas, de los estándares trabajados son negativas debido a que se trabaja a una longitud de onda de 420 nm, para medir la disminución de concentración del ion $Cr_2O_7^{-2}$.

Figura 9. Curva de calibración promedio.



Fuente: Esta investigación.

5. 2 LÍMITES DE DETECCIÓN

5. 2.1 Limite de detección instrumental.

Para determinar el límite de detección instrumental se utilizó la ecuación promedio de regresión lineal y 10 datos de concentración de lectura de blancos preparados. Los datos de absorbancias y concentraciones obtenidos se reportan en la tabla 4.

Tabla 4. Datos para cálculo del límite de detección instrumental.

Blanco	ABS DE BK	CONCENTRACION DE BK EN ppm
1	-0,009	2,1
2	-0,009	2,1
3	-0,009	2,1
4	-0,009	2,1
5	-0,008	1,5
6	-0,007	1,0
7	-0,006	0,5
8	-0,008	1,5
9	-0,007	1,0
10	-0,006	0,5
PROMEDIO	-0,008	1,44
DESVIACION ESTANDAR	0,0016	0,647
t (n-1) para el límite de detección 2,82 al 99%		

Al aplicar la formula F5 (pág. 35) se obtiene un LDI igual a 1,06 ppm, valor que corresponde a la mínima cantidad que puede detectar el equipo aunque no es cuantificable bajo las condiciones experimentales.

5.2.2 Límite de Detección del método

Para calcular el límite de detección del método (LDM) en primer lugar se determinó el límite de detección del método estimado (LDMe) empleando la fórmula 6 (pág. 36) y los datos registrados en la Tabla 4, arrojando un valor de 3,26 ppm en DQO, valor a partir del cual se prepararon soluciones estándar de ftalato de potasio con concentraciones de 3, 4, 5, y 7 ppm en DQO, para determinar el límite de detección del método experimental, que presentaron las concentraciones reportadas en la tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones para determinar el límite de detección del método

Muestra	Concentración en ppm de DQO			
	3	4	5	7
1	3,1	4,2	6,5	6,4
2	1,0	5,2	6,5	6
3	1,0	3,6	7,5	7,5
4	6,3	4,2	4,9	7,0
5	-0,1	5,2	8,1	7,0
6	1,0	4,5	7,0	6
7	1,0	3,6	4,9	7,2
8	0,5	4,2	4,4	7,0
9	-0,1	5,2	4,9	6,7
10	1,5	4,7	4,4	6,5
Promedio	0,73	4,46	5,91	6,73
DES	0,575	0,613	1,367	0,501
CV	79,32	13,75	23,14	7,45
%E	-75,83	11,50	18,20	-3,86
VALOR MINIMO	-0,1	3,6	4,4	6
VALOR MAXIMO	1,5	5,2	8,1	7,5
T bajo	1,43	1,40	1,10	1,46
T alto	1,35	1,21	1,60	1,54
Valor T crítico para rechazo de datos (G) 2,18 Anexo E				

Los datos 3,1 y 6,3 ppm correspondientes a la solución estándar de 3 ppm de la tabla 5, fue necesario rechazarlos porque al aplicar la prueba de Grubs el valor de T calculado fue mayor al de T crítico para este número de datos.
Según los valores de la tabla 5 para el patrón de 3 ppm en DQO las concentraciones varían desde valores negativos como -0,1 ppm en DQO hasta

concentraciones altas de 1,5 ppm de DQO, su coeficiente de variación es de 79,32% mostrando poca precisión en la determinación de la concentración. Hechos similares se presentan en la determinación de concentración para los patrones de 4 y 5 ppm de DQO, aunque con menor coeficiente de variación (13,75% y 23,14% respectivamente). Sin embargo, para el patrón de concentración de 7 ppm de DQO el promedio de las diez determinaciones dio como resultado 6,73 ppm en DQO, valor para el cual se presentó el menor coeficiente de variación (7,45%) y el menor error absoluto (- 3,86%).

Según lo establecido por la guía Eurachem de 1993, para la determinación experimental del límite cuantificación (límite de detección del método) el coeficiente de variación debe ser menor al 10%, por tanto, en base a este criterio y a los resultados de concentración obtenida para los diferentes patrones, el límite de detección del método para la determinación de DQO se calcula a partir de la concentración promedio obtenida, para el patrón de 7 ppm y aplicando la fórmula 7 (pág. 36), obteniéndose como límite de detección del método 8,14 ppm de DQO, correspondiente a la mínima concentración cuantificable con adecuada precisión y exactitud. El límite de detección del método es menor a 10 ppm en DQO que es la concentración más baja empleada en las curvas de calibración, siendo adecuado el rango de 10 ppm a 90 ppm para la validación del método.

5.3 SENSIBILIDAD

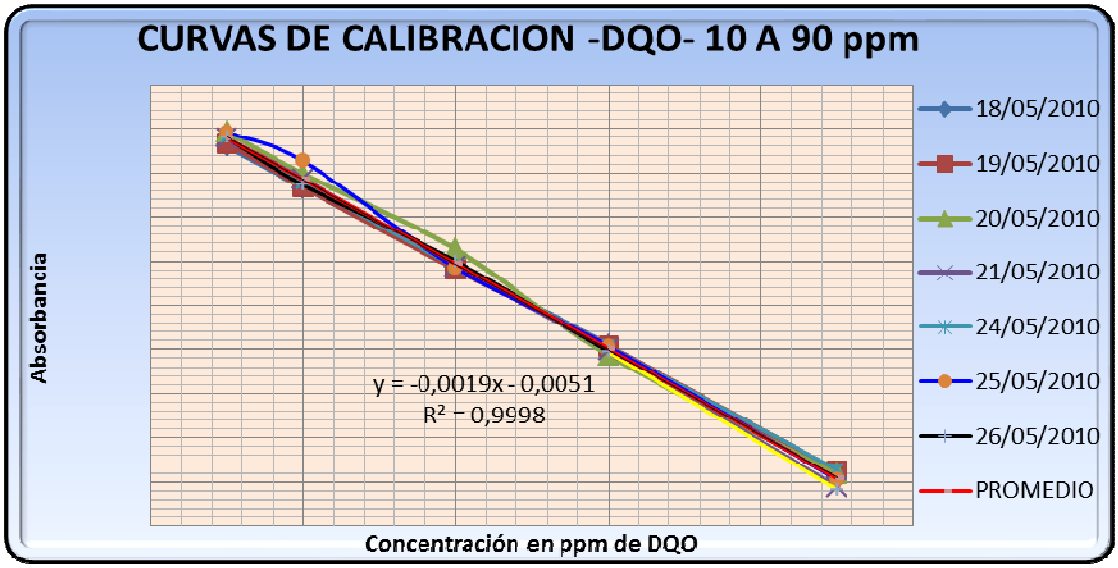
Para la valoración de este parámetro se realizaron 7 curvas de calibración por duplicado en el rango establecido en diferentes periodos de tiempo. En la tabla 6 se reportan datos de absorbancia de estándares de 10 a 90 ppm con sus respectivas fechas, para los que se graficó las curvas de calibración indicadas en la figura 10, las cuales fueron obtenidas en la etapa de prevalidación; la tabla incluye los valores de pendiente, intercepto y coeficiente de determinación para cada curva, así como el promedio de pendiente e intercepto.

TABLA 6.Curvas de calibración realizadas durante siete días y datos de: b, a y r^2

ppm	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha
	18/5/2010	19/5/2010	20/5/2010	21/5/2010	24/5/010	25/5/2010	26/5/2010
10	-0,0279	-0,026	-0,021	-0,025	-0,024	-0,025	-0,024
20	-0,0467	-0,046	-0,044	-0,043	-0,045	-0,043	-0,046
40	-0,0825	-0,084	-0,083	-0,082	-0,083	-0,083	-0,080
60	-0,1180	-0,119	-0,120	-0,121	-0,119	-0,119	-0,121
90	-0,1785	-0,175	-0,177	-0,183	-0,175	-0,179	-0,184
b	-0,0019	-0,0018	-0,0018	-0,002	-0,0019	-0,0019	-0,002
a	-0,008	-0,008	-0,004	-0,003	-0,006	-0,004	-0,003
r^2	0,9999	0,9998	0,9998	0,9996	0,9999	0,9998	0,9999
Pendiente promedio = -0,0019				Intercepto promedio = -0,0051			

b = Pendiente a = Intercepto r^2= Indicé de determinación

Figura 10. Curvas de calibración de siete ensayos por duplicado.



Fuente: Esta investigación.

Los datos con los que se graficó la curva de calibración promedio se muestran en la tabla 6, se obtuvieron de los promedios de absorbancia de las curvas realizadas durante 7 días (Tabla 6 y anexo C), para esta curva promedio se realizó regresión lineal y cálculos que comprenden, desviación estándar de la pendiente (S_b), desviación estándar del intercepto (S_a) y error aleatorio en *y* ($S_{y/x}$), presentados en la tabla 7. Los datos que se registran en la tabla 7, fueron calculados con las formulas 8 para el error aleatorio en *y*, F9 para desviación estándar del intercepto la pendiente y F10 para desviación estándar de la pendiente indicadas en la página 36.

Tabla 7.Cálculos para determinar $S_{y/x}$, S_b, S_a

X_i	Y_i	X_i^2	$\hat{y}$	Yi - $\hat{y}$	(Yi -$\hat{y}$)^2	Xi - $\bar{x}$	(Xi - $\bar{x}$)^2
10	-0,0243	100	-0,024	-0,0002	4E^{-08}	-34	1156
20	-0,0431	400	-0,043	0,0000	0,0	-24	576
40	-0,0835	1600	-0,081	-0,0024	5,8x10^{-6}	-4	16
60	-0,1197	3600	-0,1191	-0,0006	3,6x10^{-7}	16	256
90	-0,1785	8100	-0,1761	-0,0024	5,8x10^{-6}	46	2116
$\bar{x}$=44					∑ = 1,2x10^{-5}		∑= 4120
X = concentración en ppmY = Absorbancia							

$S_{y/x}$	S_b	S_a
0,0020	3,1x10^{-5}	0,0016

Para la curva de calibración promedio la sensibilidad está dada por la pendiente promedio -0,0019 y sus límites de confianza se calcularon mediante la formula $b \pm [t_{(n-2)} x\ S_b]$, donde *b* es el valor de la pendiente promedio (tabla 6) y S_b es la desviación estándar de la pendiente (tabla 7), obteniéndose el valor de -0,0019± $9{,}9x10^{-5}$ a un nivel de confiabilidad del 95%. Este límite de confianza demuestra que la sensibilidad del método es estable entre -0,0018 y -0,0020 como valores de la pendiente de la curva de calibración.

El límite de confianza para el intercepto se obtuvo mediante la formula $a \pm [t_{(n-2)} x S_a]$, donde *a* es el valor del intercepto promedio (tabla 6) y S_a es la desviación estándar del intercepto (tabla 7), obteniéndose el valor de -0,0051 ±0,0051 a un nivel de confiabilidad del 95%. Este límite de confianza indica que el intercepto con el eje *y* se encontraría entre 0 y -0,0102.

La ecuación de la recta promedio determinada mediante regresión lineal (figura 10) incluyendo valores de desviación estándar de la pendiente y del intercepto (tabla 7) es la siguiente:

$$Y = (-0{,}0019 \pm 9{,}9x10^{-5})\ X - (0{,}0051 \pm 0{,}0051)$$

Dónde:
X = DQO en ppm
Y = Absorbancia (ABS)
A partir de la ecuación lineal se obtiene la formula F13 utilizada para determinar la concentración de DQO

$$\mathrm{DQO} = \frac{ABS + (0{,}0051 \pm 0{,}005)}{(-0{,}0019 \pm 9{,}9x10^{-5})} \quad \text{F13}$$

La ecuación obtenida por regresión lineal tiene un coeficiente de determinación (r^2) de 0,9998 y un coeficiente de correlación (r) 0,9999 indicando que existe una alta correlación lineal entre los valores de x (concentración) y de *y* (absorbancia).

5.4 PRECISIÓN

Los datos del ensayo de repetibilidad realizados con soluciones patrón de 10 a 90 ppm se presentan en la tabla 8, que incluye valores de absorbancia y sus respectivas concentraciones en DQO.

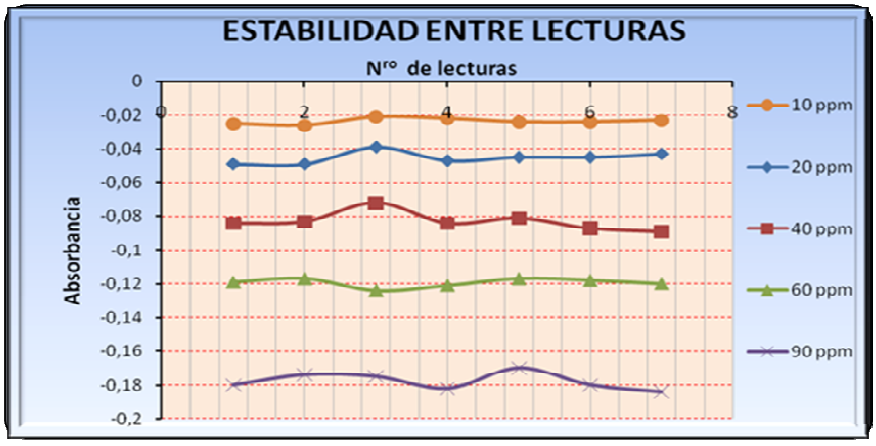
Tabla 8. Ensayos de repetibilidad en un mismo día

ppm	Absorbancias										
	Lec 1	Lec 2	Lec 3	Lec 4	Lec 5	Lec 6	Lec 7				
10	-0,025	-0,026	-0,021	-0,022	-0,024	-0,024	-0,023				
20	-0,049	-0,049	-0,039	-0,047	-0,045	-0,045	-0,043				
40	-0,084	-0,083	-0,072	-0,084	-0,081	-0,087	-0,089				
60	-0,119	-0,117	-0,124	-0,121	-0,117	-0,118	-0,12				
90	-0,18	-0,174	-0,175	-0,182	-0,17	-0,18	-0,184				
ppm	Concentración calculada										
	Con 1	Con 2	Con 3	Con 4	Con 5	Con 6	Con 7	$\bar{X}$	S	CV	%E
10	10,5	11,0	8,4	8,9	9,9	9,9	9,4	9,7	0,8	8,6	2,9
20	23,1	23,1	17,8	22,1	21,0	21,0	19,9	21,2	1,9	8,8	-5,4
40	41,5	41,0	35,2	41,5	39,9	43,1	44,2	40,9	2,9	7,0	-2,3
60	59,9	58,9	62,6	61,0	58,9	59,4	60,5	60,2	1,3	2,2	-0,3
90	92,1	88,9	89,4	93,1	86,8	92,1	94,2	90,9	2,6	2,9	-1,0

La precisión al nivel de repetibilidad se determinó mediante los resultados de la tabla 8, en esta tabla se presentan datos de absorbancia de estándares de 10, 20, 40, 60, y 90 ppm en DQO, con la cual se determinó la concentración dada por cada absorbancia empleando la fórmula de la recta promedio, para cada estándar de 10 a 90 ppm se presenta, la concentración promedio así como la desviación estándar y el coeficiente de variación. El coeficiente de variación indicado en la tabla 8 para los distintos estándares, es menor que el 10% indicando que la precisión a este nivel cumple con los parámetros preestablecidos por el IDEAM.

Para observar el comportamiento de precisión de forma gráfica, se representó los siete datos de absorbancia dados por cada concentración versus la secuencia de lecturas para cada estándar estudiado (10 a 90 ppm), en la figura 11 se indica de forma consecutiva e individual cada punto hasta la séptima lectura. Como se puede apreciar en esta figura, la absorbancia entre una lectura y otra de la solución a la misma concentración, tiene pequeños cambios a lo largo del eje y.

Figura 11. Absorbancias Vs Secuencia de lecturas



Tanto el coeficiente de variación como el porcentaje de error indicados en la tabla 8, están ubicados en el intervalo del 10% establecido en los protocolos del IDEAM[34], el coeficiente de variación en general, tiene una tendencia a disminuir a medida en que se incrementa la concentración, mostrando valores que van desde 8,6% para una concentración de 10 ppm hasta 2,2% para una concentración de 60 ppm, indicando que la precisión a este nivel es buena. El porcentaje de error indicado en la tabla 8 presenta valores variables que van desde 2,9 % para una concentración de 10 ppm, hasta -5.4% para una concentración de 20 ppm.

Para evaluar la precisión al nivel de reproducibilidad también se realizaron siete mediciones de soluciones de concentración de 10, 20, 40, 60 y 90 ppm en días diferentes y diferente analista, resultados que se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Precisión al nivel de reproducibilidad

ppm	Absorbancias						
	Lec 1	Lec 2	Lec 3	Lec 4	Lec 5	Lec 6	Lec 7
10	-0,026	-0,026	-0,022	-0,022	-0,024	-0,024	-0,023
20	-0,049	-0,049	-0,039	-0,047	-0,045	-0,045	-0,042
40	-0,084	-0,083	-0,072	-0,084	-0,081	-0,087	-0,088
60	-0,119	-0,117	-0,124	-0,121	-0,117	-0,118	-0,121
90	-0,18	-0,174	-0,175	-0,182	-0,17	-0,18	-0,184

ppm	Concentración calculada										
	Con 1	Con 2	Con 3	Con 4	Con 5	Con 6	Con 7	$\bar{X}$	S	CV	%E
10	11,0	11,0	8,9	8,9	9,9	9,9	9,4	9,9	0,9	8,9	1,3
20	23,1	23,1	17,8	22,1	21,0	21,0	19,4	21,1	1,9	9,2	-5,1
40	41,5	41,0	35,2	41,5	39,9	43,1	43,6	40,8	2,8	6,8	-2,1
60	59,9	58,9	62,6	61,0	58,9	59,4	61,0	60,2	1,4	2,2	-0,4
90	92,1	88,9	89,4	93,1	86,8	92,1	94,2	90,9	2,6	2,9	-1,0

La tendencia de la absorbancia en esta tabla al igual que en la tabla 8 es de disminuir a medida que la concentración aumenta en el rango establecido. El porcentaje de error en valor absoluto así como el coeficiente de variación para esta tabla se encuentran también dentro de los límites permisibles establecidos en protocolos proporcionados por el IDEAM indicando precisión y exactitud adecuada.

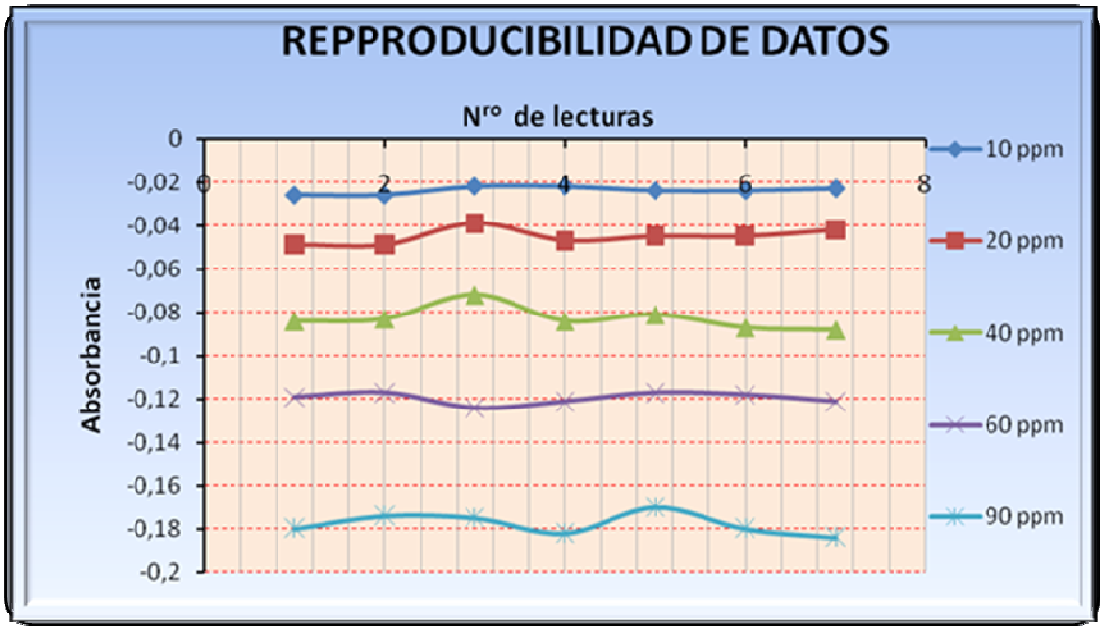
El coeficiente de variación indicado en la tabla 9 para los distintos valores de concentración, se encuentra entre un valor menor del 10%, sin embargo podemos notar que los estándares de concentración entre 40, 60 y 90 ppm presentan valores menores que los estándares de 10 y 20 ppm, indicando que la precisión es mayor en las 3 primeras concentraciones.

[34] COY. Op. Cit., p. 31.

Tanto en La tabla 8 como en la tabla 9 se presenta valores de concentración, los cuales varían en pocas unidades del valor de la concentración de los patrones, esto es debido a errores aleatorios inherentes al método (Analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo) que no pueden ser bien controlados; vemos que la absorbancia aumenta y disminuye en valores pequeños influyendo de esta manera en los resultados de CV y %E.

Las variaciones para absorbancia de cada dato proporcionado por la medición en días diferentes se pueden apreciar con la figura 12, en donde también se observa que todas las concentraciones presentan variación en su lectura de absorbancia diaria.

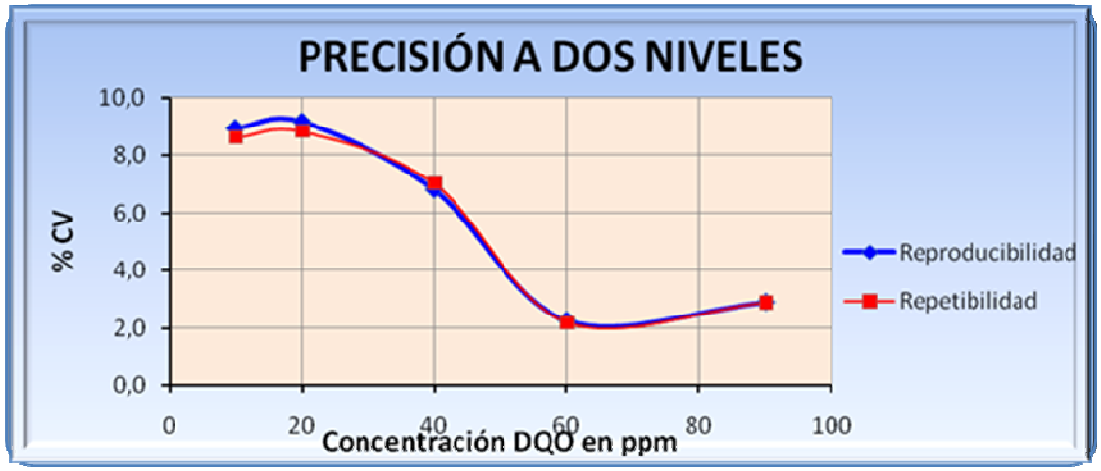
Figura 12. Reproducibilidad entre días



Fuente: Esta investigación.

En la figura 13 precisión a nivel de repetibilidad y reproducibilidad, se representa la concentración versus el coeficiente de variación, para evaluar el comportamiento decreciente que presenta el coeficiente de variación frente a cada concentración a los dos niveles de precisión (repetibilidad y reproducibilidad).

Figura 13. Precisión a nivel de repetibilidad y reproducibilidad



Fuente: Esta investigación.

En la figura 13 se observa que para ensayos de repetibilidad entre lecturas (tabla 8) y reproducibilidad entre días (tabla 9), los valores de coeficiente de variación presentan comportamiento similar, sin embargo, se observa mejor precisión en el análisis que representa la repetibilidad (línea roja), que tiene mejor precisión que la reproducibilidad para las concentraciones de 10 y 20 ppm, para ambos casos los valores de CV, son inferiores al 10% valores aceptados en protocolos establecidos por el IDEAM.

5.5 MEDICIONES FINALES DE DQO EN MUESTRAS REALES Y ESTÁNDARES PARA FINALIZAR LA VALIDACION

Para la medición de DQO en muestras reales, se localizaron puntos de muestreo que poseían una DQO dentro del rango validado, según historial de reportes de mediciones realizadas con el método volumétrico, entre estos puntos de muestreo se evaluaron; las aguas del rio Pasto sobre el punto de descarga la laguna y el rio Pasto, (bajo el puente la Carolina); estos puntos de muestreo fueron seleccionados por que se tenía conocimiento del comportamiento fisicoquímico, reportado por análisis realizados en el laboratorio de Corponariño.

Figura 14. La Laguna

Fuente: Esta investigación.

Figura 15. Puente la Carolina

Fuente: Esta investigación.

Los muestreos se realizaron de forma puntual y por duplicado de cada punto de muestreo, el día 9 de junio: el primer muestreo se hizo del punto de vertimiento la Laguna a las 10:23 AM y se finalizó los muestreos en las aguas del rio Pasto, bajo el puente la Carolina a las 10:57 AM. Cada muestra de estos dos puntos se colocaron en recipientes de vidrio de aproximadamente 350 mL, debidamente rotulados: Se designó como M1 a la muestra obtenida del puente la carolina y como M2 a la muestra hecha del vertimiento la laguna, estas muestras se trasladaron de inmediato a las instalaciones del laboratorio de CORPONARIÑO en recipientes de icopor con geles de enfriado (figura 16). Las 4 muestras en el laboratorio, se trataron con 0,5 mL H_2SO_4 (Figura 17 y 18) para mantener el pH 2 y se refrigeraron a 4 ^oC para su posterior análisis.

Al siguiente día se retiraron las muestras del refrigerador, se dejó estabilizar su temperatura por media hora y se realizó los pasos correspondientes al análisis de DQO por reflujo cerrado, al terminar este proceso se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midió su absorbancia, el procedimiento se realizó por duplicado durante siete días. Los datos de concentraciones se reportan en la tabla 10, datos que se obtuvieron de las mediciones totales de absorbancia, reportadas en anexos C.

Figura 16. Recipientes de icopor para trasportar muestras.

Fuente: Esta investigación.

Figura 17. Muestras

Figura 18. Adición de H_2SO_4

Fuente: Esta investigación.

Tabla 10.

Concentración en ppm de Muestras reales y estándares por Método Colorimétrico

#D	10	50	90	M1	M2	M1+30%	M1+50%	StrCer (29DQO)
1	9,42	47,32	94,68	24,16	69,42	33,63	37,84	27,84
2	9,42	47,84	88,89	24,68	67,32	32,58	37,32	27,84
3	9,95	49,42	89,42	24,16	67,32	32,58	38,37	26,79
4	10,47	48,89	90,47	23,63	66,79	33,63	37,32	26,26
5	9,95	51,53	92,05	24,16	68,89	31,00	40,47	29,95
6	9,42	54,16	91,00	23,11	66,79	31,53	36,26	31,53
7	8,89	54,16	89,95	22,05	68,89	32,58	37,84	27,84
8	10,47	53,63	89,95	23,11	69,42	31,53	39,95	29,42
9	9,95	49,42	89,42	22,05	68,89	31,53	38,37	33,63
10	9,95	46,26	86,79	24,68	68,37	31,53	37,84	33,11
11	10,47	47,42	91,53	24,68	68,89	32,05	37,84	33,63
12	9,95	49,42	86,26	26,79	67,84	32,58	38,37	31,53
13	10,47	51,00	88,37	26,26	67,32	32,05	37,32	31,00
14	9,42	50,47	87,32	26,79	66,79	31,53	38,37	32,05
	9,87	50,07	89,72	24,31	68,07	32,17	38,11	30,17
S	0,50	2,57	2,23	1,52	1,01	0,80	1,07	2,54
% CV	5,06	5,14	2,49	6,27	1,48	2,50	2,80	8,43
% E	-1,28	0,14	-0,31					4,04
% R						105,47	110,82	
MINIMO	8,89	46,26	86,26	22,05	66,79	31,00	36,26	26,26
MAXIMO	10,47	54,16	94,68	26,79	69,42	33,63	40,47	33,63
T bajo	1,96	1,48	1,55	1,48	1,27	1,45	1,73	1,54
T alto	1,20	1,59	2,23	1,63	1,35	1,82	2,22	1,36
LC a 95%	0,29	1,48	1,29	0,88	0,58	0,46	0,62	1,47
T critico al 95% para rechazo de datos cuando n=14 es de 2,37								

#D = Numero de datos

Las concentraciones indicadas en esta tabla, fueron calculadas con las absorbancias mostradas en el anexo D.

Ninguno de los datos reportados tanto en la tabla 10 como en la tabla 11, se tuvo que rechazar puesto que al hacer los cálculos para rechazo de datos, aplicando la fórmula 12 (prueba de Grubbs para rechazo de datos), los valores T bajo y T alto resultantes, son menores al T crítico reportado (Anexo E).

En la tabla 11, se indica los resultados de las mediciones obtenidas por el método volumétrico, las cuales se realizaron por duplicado y por un analista diferente, a estos datos se les hizo sus respectivos cálculos estadísticos, para su comparación.

Tabla 11.Concentración en ppm de Muestras reales y estándares por Método volumétrico

#D	10	50	90	M1	M2	M1+30%	M1+50%	StrCer (29DQO)
1	9,73	48,66	92,13	27,87	75,12	35,43	39,21	33,54
2	10,11	48,66	88,35	27,87	77,01	33,54	39,21	33,54
3	9,73	50,55	94,02	29,76	77,01	31,65	41,10	31,65
4	10,11	50,55	95,91	29,76	77,01	35,43	37,32	29,76
5	10,87	54,33	92,13	24,09	67,56	31,65	37,32	27,87
6	10,49	52,44	92,13	22,21	67,56	33,54	39,21	31,65
7	10,11	52,44	90,24	22,21	63,78	35,43	41,10	29,76
8	10,49	48,66	90,24	22,21	63,78	35,43	41,10	33,54
9	9,92	49,61	89,29	26,93	64,72	32,60	38,27	26,93
10	9,54	47,72	93,07	23,15	72,28	34,49	40,16	28,82
11	9,54	47,72	94,96	25,04	60,95	32,60	42,05	30,71
12	10,68	53,39	94,96	21,26	64,72	34,49	42,05	26,93
13	11,06	55,28	94,96	25,04	72,28	34,49	38,27	28,82
14	9,54	47,72	93,07	23,15	60,95	34,49	36,38	34,49
$\bar{X}$	10,14	50,55	92,53	25,04	68,91	33,95	39,48	30,57
S	0,51	2,59	2,34	2,92	6,05	1,37	1,83	2,56
% CV	5,01	5,13	2,52	11,65	8,78	4,04	4,64	8,39
% E	1,37	1,10	2,81					5,43
% R						119,58	116,01	
MINIMO	9,54	47,72	88,35	21,26	60,95	31,65	36,38	26,93
MAXIMO	11,06	55,28	95,91	29,76	77,01	35,43	42,05	34,49
T bajo	1,17	1,09	1,79	1,30	1,32	1,67	1,70	1,42
T alto	1,81	1,82	1,44	1,62	1,34	1,08	1,40	1,53
LC al 95%	0,29	1,50	1,35	1,68	3,49	0,79	1,06	1,48
T critico al 95% para rechazo de datos cuando n=14 es de 2,37								

De las tablas anteriores tabla 10 y tabla 11 se tomaron todos los datos y se insertaron en un paquete estadístico (statgraphics plus 5.1) para realizar la

correspondiente comparación, se clasificaron todas las mediciones hechas con el método volumétrico, como mediciones por el método A y a las realizadas por el método espectrofotométrico como mediciones por el método B. Los datos insertados en programa, se procesaron y se les aplico un análisis de varianza factorial, para determinar la diferencia significativa entre los dos métodos, con resultados indicados (Tabla 12), porque el análisis de las muestras o los datos indicados en la tablas 10 y 11, son el resultado de análisis de las mismas muestras por dos métodos diferentes (volumétrico y colorimétrico) y además prevalecen el factor de las condiciones de trabajo sobre los niveles de concentración.

Tabla 12. Análisis de Varianza de los dos métodos A y B.

Fuente E. PRINCIPALES	SMDS	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
A: C Original	132131,0	9	14681,2	2519,08	0,0000
B: Método	59,1197	1	59,1197	10,14	0,0017
RESIDUOS	1241,36	213	5,82799		

Dónde:
E= Efectos SMDS= Suma de cuadrados

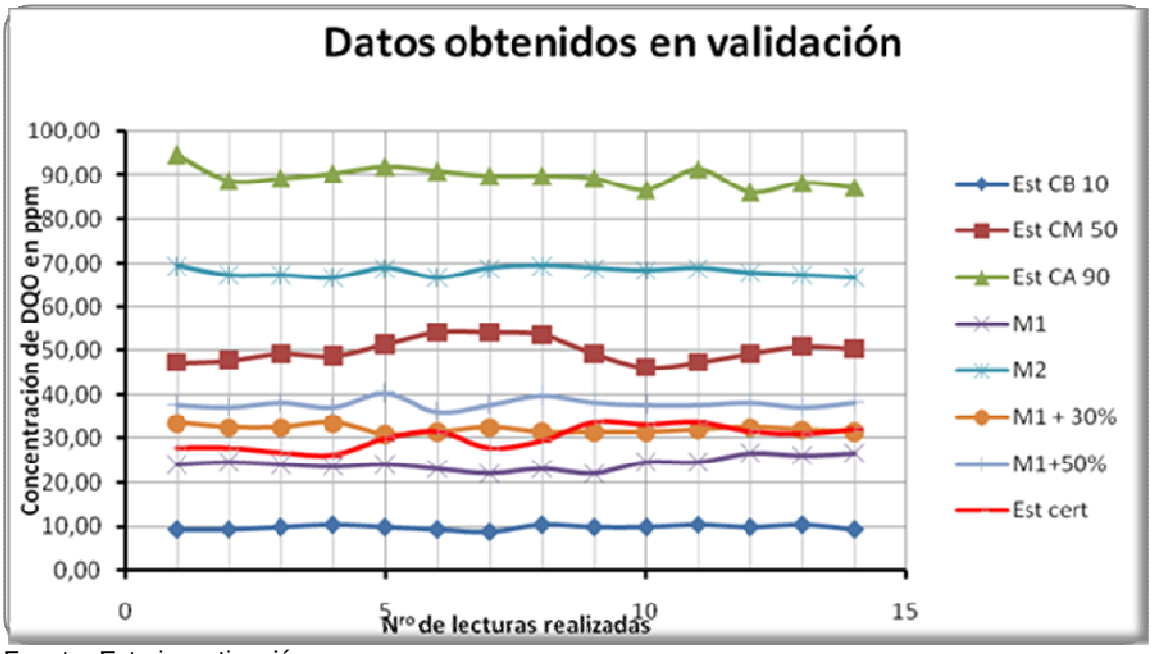
Con ANOVA, se observa que hay una diferencia significativa entre el método A y B con una probabilidad de 0,0017en las mediciones realizadas. Al existir diferencia significativa entre las mediciones de los métodos en estudio (A y B) se analizó los indicativos de precisión y exactitud indicados en las tablas 10 y 11.

En la tabla 10 y 11, al hacer la comparación en cuanto a indicativos de precisión se observa que el coeficiente de variación de los dos métodos, en general se encuentran por debajo de 11,65 %, el método colorimétrico cumple con los criterios de aceptación que se impone pudiéndose utilizar este método con seguridad. Los dos métodos en cuanto a desviación estándar presentan valores pequeños, pero entre los dos métodos el método espectrofotométrico registra valores más pequeños, indicando así que el grado de dispersión alrededor de las medias de cada análisis es bajo y que el grado de concordancia entre cada serie de medidas de cada muestra tiene menor variación.

Para los dos métodos el porcentaje de error, con respecto al estándar certificado de concentración (29 ppm en DQO), evaluando en este caso la exactitud, se podría decir que el método que arrojo valores más exactos es el método espectrofotométrico ya que tiene un porcentaje de error (%E) de 4,04%, mientras que el método colorimétrico tiene un porcentaje de erros del 5,43% (Tablas 10 y 11).

En la figura 21 se evalúa la precisión durante los ensayos de validación para datos obtenidos por el método colorimétrico, la figura representa el número de lecturas realizadas versus la concentración. En esta figura se observa la variación en la concentración para las diferentes soluciones.

Figura 19.Lecturas realizadas Vs concentración Método Colorimétrico

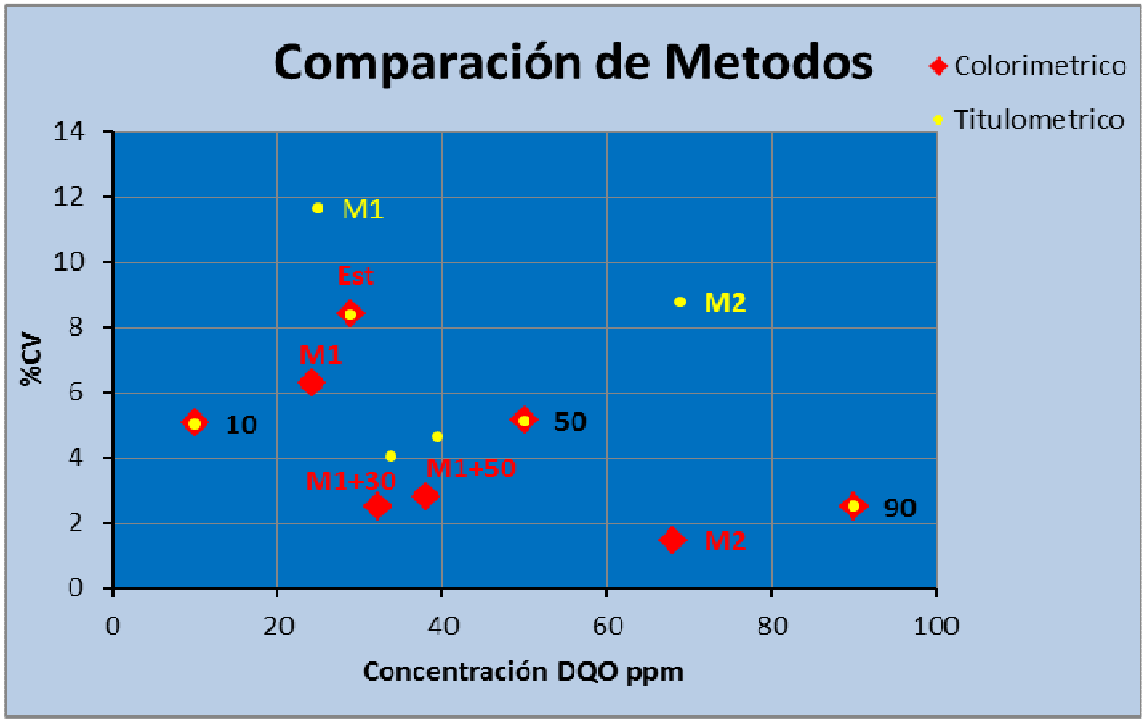


Fuente: Esta investigación.

En la figura 19 observamos que los 14 puntos consecutivos de 7 mediciones por duplicado con mayor dispersión sobre el eje *y* es el estándar de concentración de 50 ppm, hecho relacionado con el límite de confianza reportado en la tabla 10; para las concentraciones restantes el grado de dispersión a lo largo del eje *y* es menos pronunciado, indicando que las mediciones son buenas y por consiguiente hay buena repetibilidad; mostrando que la preparación y manipulación de las distintas muestras se realizó de manera correcta, debido a que la repetibilidad del método depende generalmente del proceso de preparación de la muestra, es decir cuanto mayor es la manipulación de la muestra más probable es que aumente la variabilidad del método.

En la figura 20 se presenta el análisis del coeficiente de variación de las mediciones realizadas en la validación, que incluyen muestras reales, muestras adicionadas, estándar certificado y estándares preparados para los dos métodos.

Figura 20. Comportamiento del %CV Frente a la Concentración en (ppm) de los dos métodos.



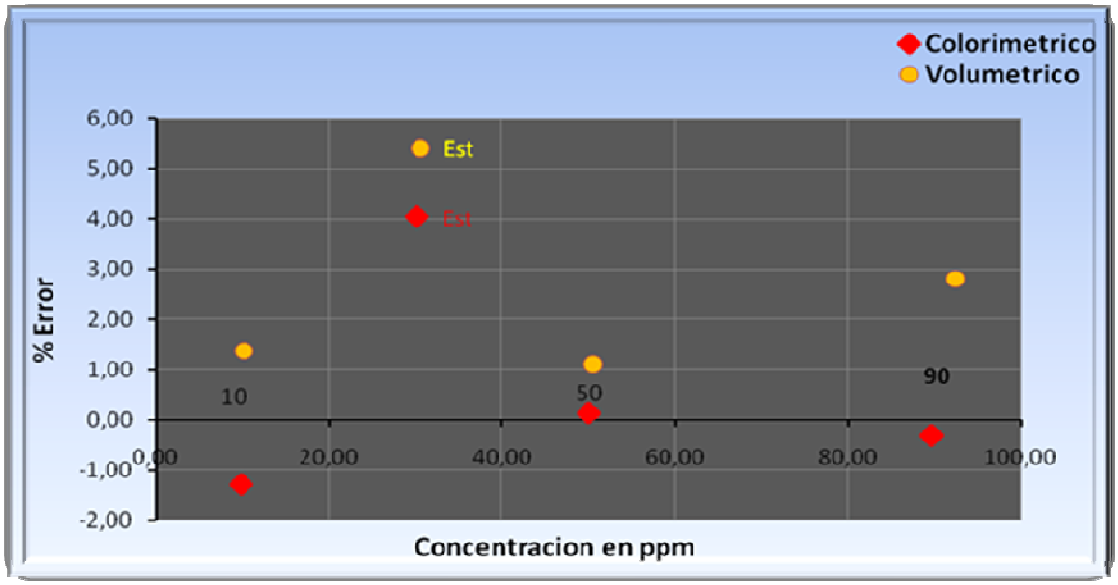
Fuente: Esta investigación.

En figura 20 podemos observar que la muestra M1, medida por el método volumétrico, tiene el %CV más alto (%CV = 11,65%); seguido de M2 la cual tiene un %CV de 8,78. Para M1+30%, M1+50% y los estándares de concentración de 10 ppm, 50 ppm y 90 ppm en DQO el coeficiente de variación tienen valores menores al 6%. Para el método colorimétrico vemos que todos los valores de coeficiente de variación son menores al 10%; con valores de: 5,06; 5,14; 2,49; 6,27; 1,48; 2,50; y 2,80, para 10; 50; 90; M1; M2; M1+30% y M1+50% respectivamente. En cuanto al estándar certificado vemos que ambos métodos presentan %CV similar con un valor de 8,43 para el método colorimétrico y de 8,39 para el método volumétrico.

5.6 EXACTITUD

En la figura 21 se presenta el porcentaje de error versus la concentración de DQO para los resultados obtenidos en validación por los dos métodos, con el fin de evaluar la exactitud.

Figura 21.Concentración ppm de DQO Vs porcentaje de error



Fuente: Esta investigación.

Podemos observar que las concentraciones evaluadas por el método espectrofotométrico, de 10,50 y 90 ppm en DQO, presentan un porcentaje de error en valor absoluto que está en un intervalo de -1,28% y 0,14%, mientras que para estas mismas concentraciones para el método volumétrico, el porcentaje de error está entre 1,10 y 2,81%. Al comparar los porcentajes de error presentados en la medición de DQO en el estándar certificado, indicado por los dos métodos encontramos que el valor arrojado por el método espectrofotométrico es menor (4,04%) que el valor dado por el método volumétrico (5,43%). En general el porcentaje de error de las mediciones por los dos métodos es pequeño y está dentro de los límites aceptados establecidos por el IDEAM (menor al 10%).

5.7 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

Para el cálculo de los porcentajes de recuperación de los dos métodos se empleó la formula F11, indicada en la página 38, en la cual se asignó como concentración de la muestra adicionada (C_{MA}) a las concentraciones promedio de M1+30% y M1+50% con valores promedio 32,17 y 38,11 en DQO, para el método espectrofotométrico y de 33,95 y 39,48 respectivamente para el método volumétrico; concentración de la muestra sin adición (C_M) a la concentración de M1 con un valor de 24,31, para el método espectrofotométrico y de 25,04 ppm para el método volumétrico y como concentración conocida adicionada (C_A) a la muestra, a los valores de concentración adicionados: 7,5 ppm para M1+30 y 12,45 ppm para M1+50%.
Los porcentajes de recuperación presentados son de 105,47% para M1+30% y 110,82% para M1+50% en el método espectrofotométrico y en el método

volumétrico valores de 119,58% para M1+30% y de 116,01% para M1+50% valores que están dentro del rango de porcentaje de recuperación recomendado para las metodologías analíticas básicas, que va de 80 a 120%[35,36]. Estos resultados indican que para este tipo de aguas, el analito presente en la matriz, no sufre alteraciones apreciables debidas a la preservación, almacenamiento de las muestras, ni al método de análisis, porque los cambios sistemáticos de los resultados durante los siete días de análisis son pequeños. No siempre se obtienen valores de recuperación cercanos al 100 %, ya que este depende de la matriz de la muestra, de la efectividad del método de preparación y de la concentración del analito.

5.8 CARTA DE CONTROL

Para monitorear el método se elaboró una carta de control a partir de un estándar de ftalato de potasio de 50 ppm en DQO, del cual se hicieron 35 mediciones en diferentes días. Se calculó el valor promedio y la desviación estándar, valores que se presentan en la tabla 13. Se establecieron unos límites de confianza del valor medio más dos desviaciones estándar denominado límite superior e inferior de aviso y valor medio más tres desviaciones estándar, denominadas límites superior e inferior de control.

Tabla 13 Datos para una concentración de 50 ppm de DQO para diferentes días.

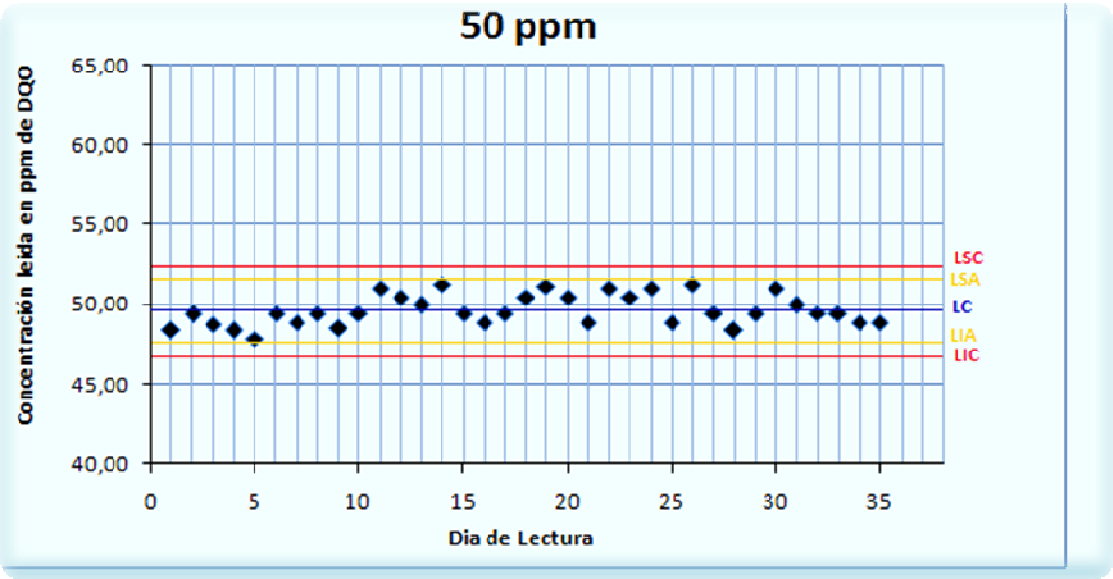
Concentración leída por días												
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Con.	48,37	49,37	48,74	48,37	47,84	49,42	48,89	49,42	48,47	49,42	51,00	50,47
Día	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Con.	49,95	51,21	49,42	48,89	49,42	50,47	51,16	50,47	48,89	51,00	50,47	51,00
Día	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
Con.	48,89	51,21	49,42	48,37	49,42	51,00	49,95	49,42	49,42	48,89	48,89	
$\bar{X}$ = 49,63			S = 0,966									

En la figura 22 se muestra la carta de control que se realizó teniendo en cuenta los datos de la tabla 13.

[35] AGUIRRE. Op. cit., p. 30.

[36] SÁNCHEZ MARTÍNEZ Diana Lilian; "Validación de métodos para la determinación en aguas superficiales de metales alcalinos (sodio y potasio) por absorción atómica a la llama y alcalinotérreos (calcio y magnesio) por volumetría con EDTA". p.164. Trabajo de grado, Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Figura 22. Carta de control para evaluar la concentración de 50 ppm de DQO como control



Fuente: Esta investigación.

En esta figura se ha trazado las líneas correspondientes a línea central (LC) que corresponde al promedio de las 35 mediciones, con un valor de 49,63 ppm en DQO, la Línea superior e inferior de aviso (LSA 51,6 ppm y LIA 47,7 ppm), como también, las líneas superior e inferior de control (LSC 52,5 ppm y LIC 46,7 ppm. Estas líneas fueron trazadas teniendo en cuenta la desviación estándar registrada en la tabla 13 y los criterios de trazado de cada línea, la LSA y la LIA se han ubicado a dos desviaciones estándar de la línea central; la LSC y la LIC se ubican a 3 desviaciones estándar de la línea central.

Los datos que se obtuvieron para elaborar la carta de control, presentan una distribución normal alrededor de la media. Cuando cinco de los datos consecutivos presenten tendencia ascendente o descendente alrededor de la media, significara que los datos obtenidos al utilizar este control, en la sexta lectura no se podrán reportar, obligando de esta manera a revisar la metodología de análisis[37, 38].

La carta de control realizada se puede emplear en el laboratorio para el control rutinario del método de análisis de DQO, verificando con regularidad la trazabilidad del método. Esta carta de control demuestra que los procedimientos analíticos desarrollados durante la validación, proporcionan resultados confiables.

[37] FIGUEROA. Op. cit., p. 34.

[38] J.C.MILLER. Op. Cit., p. 34.

6 CONCLUSIONES

Se estableció que el rango estudiado, para la determinación de materia orgánica por espectrofotometría UV-Vis es parcialmente lineal en el intervalo de concentración estudiada, basado en el valor obtenido para el coeficiente de correlación y corroborado con la inspección visual de la gráfica de la curva de calibración. Adicionalmente, se comprobó mediante las curvas de Ring Bom, se confirmó que el valor de la pendiente en el rango de validación (10 a 90 ppm en DQO) es significativamente distinto de cero y que el intercepto no está estadísticamente alejado de cero.

Los datos de los Límites de Detección y Límites de Cuantificación obtenidos en el proceso de validación del método para análisis químico de Demanda Química de Oxígeno (DQO), se encuentran dentro de los límites requeridos por Corponariño. Por tanto, la metodología desarrollada es adecuada para su aplicación en aguas residuales bajo las condiciones de trabajo realizadas en el laboratorio.

El método evaluado, que incluyo estudios de linealidad, precisión y exactitud demostró que los resultados obtenidos en la validación están entre los límites requeridos por el IDEAM, que establece valores aceptables menores al 10% en %CV y %E: Además, nos indican que el método es apropiado para determinaciones de DQO en el rango de 10 a 90 ppm, con las condiciones presentes en laboratorio de CORPONARIÑO.

Mediante el estudio de la exactitud por la prueba de adición/recuperación, se demostró que el porcentaje de recuperación, está dentro de los criterios de aceptación y además la exactitud evaluada con el porcentaje de error relativo en cuanto al patrón de referencia certificado adquirido de VHG Labs se ubica dentro del %E establecido con un valor de 4,04; por lo tanto la metodología se considera exacta.

La metodología implementada y analizada presenta un desempeño analítico adecuado, por lo tanto, podría ser usado en un programa de aseguramiento de la Calidad.

7 RECOMENDACIONES

Que el laboratorio tenga y ejecute un plan sistemático de mantenimiento de los equipos analíticos, en este caso el espectrofotómetro de absorción UV- Vis, de manera que no se presenten limitaciones en el trabajo por falta de insumos o repuestos adecuados. Elaborar un instructivo de mantenimiento programado del equipo, así como la preparación de soluciones de chequeo para verificar la longitud de onda y su correcto funcionamiento.

Continuar con los trabajos de validación espectrofotométrica para determinar DQO a rangos medio y alto, teniendo en cuenta las diferentes variables presentes y las características de las soluciones a analizar.

Tras los resultados y análisis obtenidos en esta validación se inicie los procesos de validación ante el IDEAM de esta metodología.

BIBLIOGRAFÍA

Acuadiagnostic, Concerning Recalcitrant/Refractory Organic Species and Chemical Oxygen Demand (COD) analysis by two different methods: (a) CODCr (the dichromate method) and (b) TiO2/UV photoelectrochemistry (the PeCOD™ method), 40 p.

AGUIRRE ORTEGA Leticia. GARCIA F Javier. MORENO Susana. GARCIA AVILA. Antonia ENCIMA GARCIA Gregorio. CORTES LORAS Rogelio.. "Validación de Métodos Analíticos". Barcelona: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria AEFI 2001. 331 p.

Análisis Químico Farmacéutico de Medicamento UTEA. Primera edición, Grupo Editorial Limusa México 2001. 415 p.

APHA-AWWA-WPCF. Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, USA: American Public-Health

CONTAMINACIÓN AMBIENTAL. Análisis de contaminantes ambientales, Instrumentos de gestión medioambiental en la industria.184 p.

COY Gustavo Alfonso, "Protocolo Estandarización de métodos analíticos" Instituto de Hidrológica, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM). Bogotá. Noviembre 199. 44 p.

DOUGLAS A.SKOOG; F.JAMES HOLLER; TIMOTHY A. "Principios de Análisis Instrumental". Quinta Edición, McGraw-Hill Interamericana de España S.A.U. Asociation, 1995. 1028 p.

DOUGLAS.A SKOOG, D.M WEST, HOLLER F.J, S.R CROUCH "fundamentos de química analítica"; octava Edición. McGraw-Hill 735 p.

ENVIRONMENTAL ENGINEERING SCIENCE: Volume 20, Number 6, 2003; Semimicro Determination of COD Employing Microwave Digestion 815 p.

FIGUEROA Jazmin del Rosario; TUTALCHA C Melva J. "Evaluación de una arcilla modificada con hierro en la oxidación catalítica de carga orgánica presente en lixiviados producidos en el relleno sanitario antanas (RSA) de Pasto. Universidad de Nariño, Pasto – Colombia. 93 p.

G MARTHA; D FELIX; M RODRIGO; G HÉCTOR; V NELSY; D EFRAÍN; V OMAR; P LORENZO; S NANCY; G JEREMIAS; C GUILLERMO. “El agua”. El medio ambiente en Colombia. 2ª versión de la edición de 1998. Bogotá, IDEAM, 2001. 304 p.

HARVEY David. “Modern Analytical Chemistry”. De Pauw University. USA . McGraw-Hill Higher Education. 798 p.

http://www.ideam.gov.co/publica/index4.

http:/www.udistrial.edu.co/comunidad/estudiantes/dlilian/que_es_valid.htm#_3.7.4.

J.C.MILLER. J.N. MILLER. “Estadística para química analítica”. Segunda edición, Adison-Wesley Iberoamericana. 113 p.

JURADO José M. “Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos”. Departamento de Química Analítica: 1 de abril del 2008. 47 p.

LOPEZ-GALAN Jorge E. “Separación de plata, mercurio y cromo de residuos provenientes de demanda química de oxigeno (DQO). Escuela de Ingeniería Química, Universidad del Valle, Cali, Colombia. 115 p

LUÍS ENRIQUE RODRÍGUEZ GOMEZ. Evolución del agua residual depurada durante su transporte por tubería. Universidad de la laguna marzo 1998 135 p.

Manual de Manejo del Espectrofotómetro Unicam UV-Vis 55 p.

MAYARÍ N Rogelio; ESPINOSA María del C.; SUÁREZ M Margaret; RODRÍGUEZ P Xiomara, ÁLVAREZ LL Yamile. “Revista CENIC Ciencias Químicas, Vol. 36, No. Especial, 2005”. Material de Referencia para la Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en Aguas y Aguas Residuales 552 p.

Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Decreto número 3100 de 30 Octubre. 2003 “Por medio del cual se reglamentan las tasas retributivas por la utilización directa del agua como receptor de los vertimientos puntuales y se toman otras determinaciones”. Decreto 3440 de octubre 21 de 2004.

OCAMPO CASTRILLON Pamela; Química, “Métodos analíticos estandarizados para el seguimiento de la calidad fisicoquímica del agua. Santiago de Cali, Diciembre de 1996 296 p.

Organismo de Acreditación Ecuatoriana (OAE). “Alcance de acreditación” Laboratorios HAVOC. Certificado de acreditación N^{O} OAE LE 2C 05-007. Parametros_marzo 21/09 49 p.

R. RUIZ CHAVEZ, J. A. Rodríguez Castro, R. García Acevedo, J. A. Chávez Cárdenas, M. Serrano Medrano. Determinación de la demanda química de oxígeno y su importancia en la ingeniería ambiental 568 p.

REEVE Roger N. “Introduction to Environmental Analysis”.Copyright, Inglaterra. 2002, John Wiley&SonsLtd. 301 p.

Revista Mexicana de Ingeniería Química aplicación de las ecuaciones de Stefan Maxwell; R. Aguilar-Corona, P. Castilla Hernández y M; Meras Rodríguez 293 p.

RIUS F.Xavier, MAROTO Alicia, BOQUE Ricard, RIU Jordi. “La validación de métodos analíticos. Instituto de estudios avanzados. Universidad Rovira Virgili, Tarragona España. 216 p.

RODRÍGUEZ, Y. “Establecimiento de una metodología analítica para la determinación de nitratos en agua superficial y lluvia y de nitrógeno orgánico en agua superficial por el método de electrodo de ión selectivo”. Universidad Nacional de Colombia. F de Ciencias. Bogotá. 2005 196 p.

ROMERO ROJAS Jairo Alberto. “Acuiquimica”. Primera edición: febrero de 1996, Santa fe de Bogotá Colombia. 302 p.

SÁNCHEZ MARTÍNEZ Diana Lilian; “Validación de métodos para la determinación en aguas superficiales de metales alcalinos (sodio y potasio) por absorción atómica a la llama y alcalinotérreos (calcio y magnesio) por volumetría con EDTA”. Trabajo de grado, Universidad Distrital Francisco José de Caldas 164 p.

Universidad Autónoma de Yucatán Facultad de Ingeniería; maestría en ingeniería opción ambiental práctica n^{o}. 8. Determinación de demanda química de oxigeno (dqo) y demanda bioquímica de oxigeno 96 p.

VISIÓN SOFTWARE Help Espectrofotómetro Unicam UV-VIS 89 p.

ANEXOS Descripción de elementos y datos de apoyo para la validación

ANEXO A

PROTOCOLO DE MANEJO DEL ESPECTROFOTOMETRO UV-Vis. UV2-100 V4.15 SERIE 045004

Generalidades y Mantenimiento del equipo

El espectrofotómetro UNICAM es un espectrofotómetro de doble haz (figura 1), que cuenta con detector fotodiodo y ancho de banda fijo de 2 nm, con pantalla LCD. Este espectrofotómetro está equipado con dos lámparas, una de deuterio que emite radiación en un intervalo de longitud de onda de 160-380 nm para espectroscopia de absorción UV, y una lámpara de tungsteno halógeno que emite radiación en un intervalo de longitud de onda de 240-2500 nm para espectroscopia de UV-Vis e infrarrojo cercano [39, 40].

Figura 1. Espectrofotómetro de doble haz

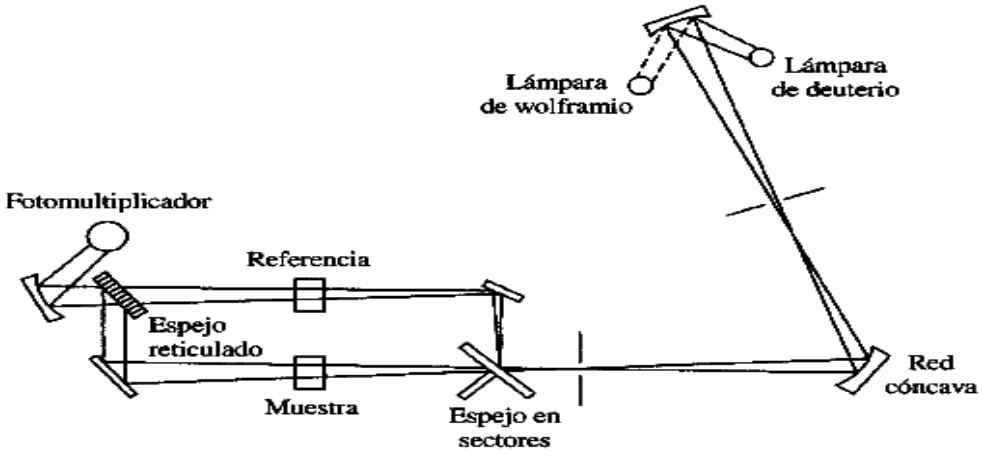


Figura tomada del libro de, Principios de análisis Instrumental pg 344.

El espectrofotómetro cuenta con un compartimiento de ocho portaceldas para igual números de celdas de sílice para muestras y una portacelda donde se ubica una cubeta de referencia (blanco), por la cual pasa el haz de referencia (figura 2); también este equipo tiene puertos de conexión para impresora, sipper y peltier los cuales se pueden utilizar con el software visión V3.5 Unicam y un ordenador adecuado.

[39] DOUGLAS A.SKOOG; F.JAMES HOLLER; TIMOTHY A. “Principios de Análisis Instrumental”. Quinta Edición, McGraw-Hill Interamericana de España S.A.U. Asociation, 1995.

[40] VISIÓN SOFTWARE Help Espectrofotómetro Unicam UV-Vis.

El sipper es un accesorio que se conecta al equipo y se usa para bombear un volumen moderado de muestra a un flowcell y ser analizado, el peltier es accesorio de control de temperatura que funciona al ser conectado al equipo, este tiene tres opciones de temperatura fija (25, 30 y 37 ^{o}C) y una opción de temperatura variable. En la figura 3 se observa las partes descritas anteriormente, además de otras funciones como: botón de encendido, puertos para PC, perilla para control de pantalla LCD y aberturas de evacuación de líquidos.

Figura 2. Partes internas del espectrofotómetro UNICAM

Fuente: Esta investigación.

Figura 3. Partes externas del espectrofotómetro UNICAM

Fuente: Esta investigación.

Para análisis de muestras en la región visible se enciende la lámpara de wolframio y de ser necesario análisis en la región ultravioleta se enciende la lámpara de deuterio. La lámpara de wolframio se enciende automáticamente, mientras que la de deuterio requiere de encendido manual.

Para verificar el correcto funcionamiento del equipo se hace un chequeo, midiendo la absorbancia de una solución de yoduro de sodio (NaI) y una solución de nitrito de sodio (NO_2) de la siguiente forma;

Solución	*Longitud de onda (nm)*	*Absorbancia*	*Límite*
NaI	220	4,7140	> 3,7
NO_2	340	4,9176	> 3,7

En la realización de análisis de rutina se pueden emplear soluciones que deterioren el equipo de UV- Vis., para evitar esto, después de cada análisis de una muestra se debe limpiar muy bien los compartimientos donde se colocan las celdas con paños húmedos[41].

1.2. Encendido del espectrofotómetro

Para el encendido y manejo del espectrofotómetro UV-Vis, inicialmente se conecta la fuente de alimentación y se enciende presionando el interruptor, que está ubicado en el costado izquierdo del equipo al lado del cable de alimentación y se espera por 30 minutos para que el equipo pueda ser utilizado. Pasado este periodo de tiempo en la pantalla LCD aparece un menú de inicio (HOME), el cual contiene parámetros como: BARRIDO, FIJA, CUANTIT, CINETICA, BIBLIOTE, y HORAS INSTRUMENT. También, en la parte de debajo de la pantalla se encuentran en casillas divididas parámetros como: ORGANIZ, AUTOTEST, ACCESORIOS, LAMPARA, REMOTO, que se activan con las teclas que hay bajo cada parámetro, como se representan en la figura 4.

Figura 4. Teclas de activación de parámetros

Al encender el espectrofotómetro se activa de manera programada dos lámparas (deuterio y tungsteno), pero dependiendo del tipo de análisis que se baya a realizar (región ultravioleta ó visible), se puede apagar la lámpara de deuterio, ya que esta lámpara tiene periodo de vida corto y es costosa [23]. Para encender o apagar la lámpara de deuterio, se debe presionar en el menú de inicio la tecla LÁMPARA, luego en el siguiente menú desplegado se presiona (conecte) para

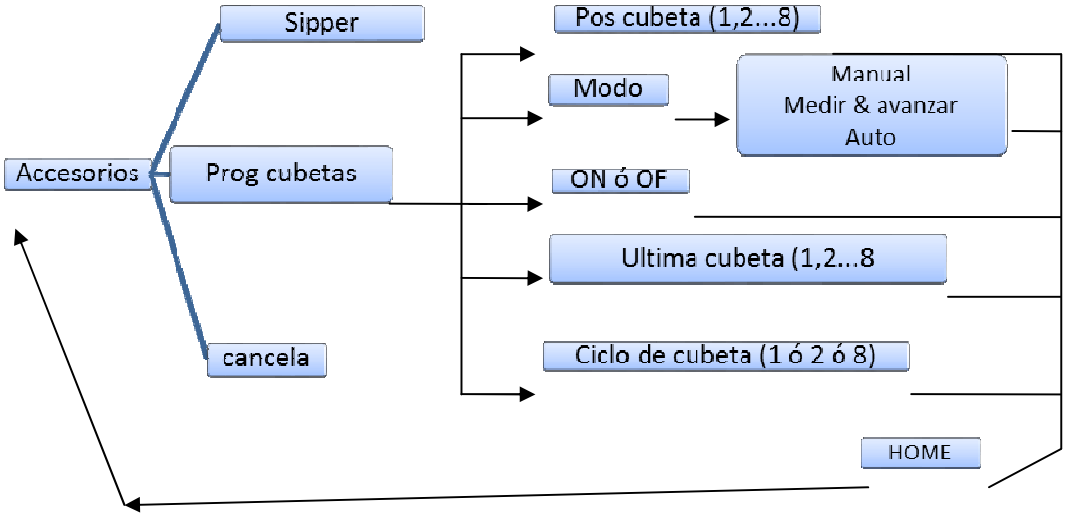
[41] Manual de Manejo del Espectrofotómetro Unicam UV-Vis.

colocar la lámpara de deuterio en modo OFF o ON. Para regresar al menú de inicio se presiona la tecla HOME.

1. CURVA DE CALIBRACION

Para la elaboración de una curva de calibración, dependiendo del número de estándares que se baya a utilizar, en el menú inicio se programan las celdas a emplear. Para la programación de las celdas se presiona la tecla ACCESORIOS, que despliega un menú donde se encuentran listados los parámetros indicados en el figura 5.

Figura 5. Despliegue del parámetro accesorios



Con las teclas de desplazamiento del equipo (flechas) se selecciona PROG CUBETAS seguido de la tecla ENTER, lo cual hace que se despliegue un submenú con una serie de parámetros que se selecsionan con las teclas de desplazamiento y se editan con la tecla EDIT. Este procedimiento se repite para cada parámetro.

2.1. ON ó OF: se activa la programación de cubetas con la opción ON ó OF, seguido de la tecla ENTER.
2.1.2. Pos cubeta: se selecciona en pos con las teclas del panel de números el número de celda desde el cual se quiere empezar a leer la absorbencia, seguido de la tecla ENTER, como mínimo se puede comenzar en 1 y como máximo en 8.

2.1.3. Modo: se ubica esta función y se presiona la tecla edit. Se puede elegir una de tres alternativas (Manual, Medir & avanzar y Auto). Para lecturas individuales de recomienda la opción manual y para muestras consecutivas la opción auto.

2.1.4. Última cubeta: en este parámetro se escoge el número de cubeta con la cual se finaliza una serie de lecturas y vuelva a su posición inicial. Para esto se utiliza el panel de números, se selecciona y se presiona ENTER.

2.1.5. Ciclo de cubetas: permite programar el número de veces que se desea repetir la medición de absorbencia para una misma muestra en una serie programada. El ciclo de repeticiones máximo es 3, se escoge el número de ciclo y se presiona ENTER.

Después de haber editado estos parámetros, para regresar al menú de inicio se presiona la tecla HOME, quedando de esta manera el equipo ya preparado para realizar una cuantificación con estándares (curva de calibración).

En el menú inicio, donde están los parámetros (BARRIDO, FIJA, CUANTIF, CINETICA, BIBLIOTECA), se escoge el parámetro CUANTIF y se presiona la tecla ENTER, que despliegue un menú en el cual aparecen los siguientes parámetros:

2.2. Despliegue del parámetro CUANTIF

- ID:
- LONGITUD DE ONDA: (190 a 1100 nm)
- ANCHO DE BANDA: (fijo a 2 nm no se puede cambiar)
- INTEGRACIÓN: (1 a 9999 segundos)
- NÚMERO DE ESTÁNDARES: (1 a 6)
- REPETICIONES: (1 a 3)
- UNIDADES: (de trabajo, ppm, g/L, M, N, etc)
- TIPO DE CURVA: (Lineal, Lineal por cero, Cuadrática, Cuadrática por cero)
- CAMBIAR LAMPARA: (varios intervalos, Hg, deuterio … etc)
- OPERARIO: (nombre de persona que está realizando el análisis)

Aquí en este menú se editan los parámetros necesarios, seleccionando con la tecla ✥ y presionando EDIT;

2.2.1. Selección de identificación del trabajo (ID): al activar esta función se despliegan caracteres, los cuales se seleccionan con la tecla de desplazamiento seguido de ENTER. Se coloca un nombre o una forma de identificar el trabajo que se está realizando, para lo cual se elije los caracteres, se presiona ENTER por cada carácter y se finaliza con la tecla ACEPTA.

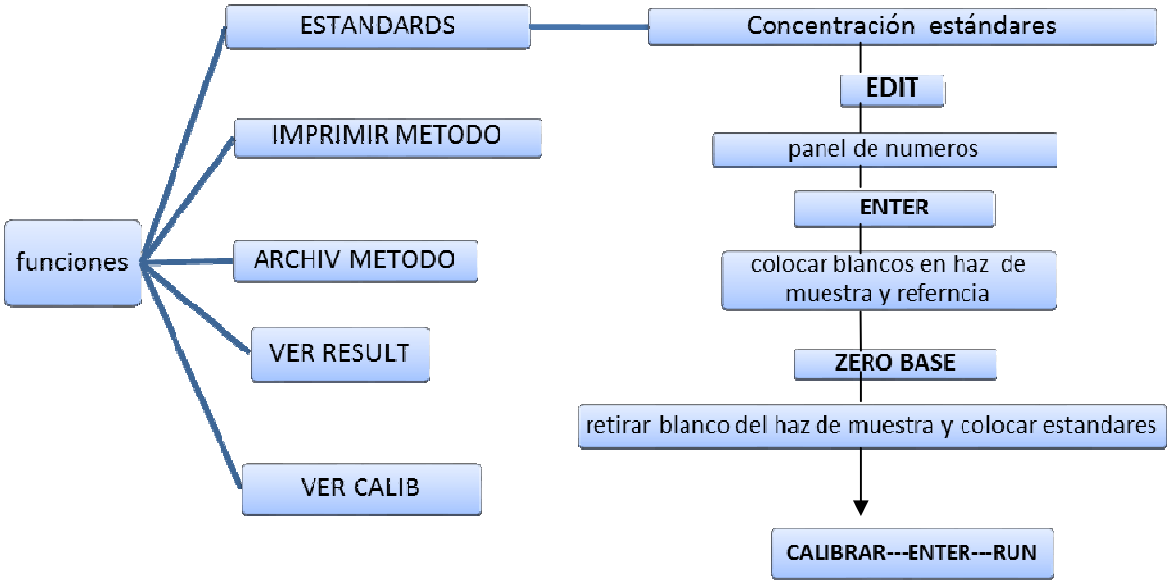
2.2.2. Selección de longitud de onda: Activada esta función con la tecla EDIT, se digita el números de longitud de onda que se utilizara en el análisis y se presiona ENTER.

2.2.3. Selección de unidades: desplegada esta función se escogen las unidades de concentración que se requieren y se presiona la tecla ACEPTA.

2.2.4. Selección de lámpara: permite escoger la lámpara a utilizar, según lo establecido al encender el equipo. Se selecciona y se presiona la tecla ENTER.
En el menú CUANTIF también se encuentran otras funciones necesarias para programar concentraciones de las soluciones y finalizar el proceso de programar la curva de calibración que se indican a continuación.

2.3. Programación de estándares: Estas funciones están desplegadas en la parte inferior del menú CUANTIF, como se indica en la figura 6.

Figura 6. Menú programación de estándares



2.3.1 ESTANDARDS: se presiona la tecla ESTANDARDS, para cada línea se presiona la tecla EDIT, se introduce la concentración de los estándares con los números del panel del equipo, seguido de la tecla ENTER.
2.3.2 BLANCOS: Terminado el proceso anterior se colocan las cubetas con la solución de referencia (blancos) en el haz de muestra y de referencia, se presiona la tecla ZERO BASE, se retira el blanco del haz de la muestra.

2.3.3 FIN CURVA DE CALIBRACION: se colocan las cubetas con los estándares en las celdas programadas, se cierra el equipo y se presiona la tecla CALIBRAR, seguido de ENTER y finalizar con RUN. El equipo comienza a leer las muestras de forma automática y representa la curva de calibración. Para mirar la ecuación lineal, coeficiente de determinación y absorbancias de cada patrón, se escoge la opción ver resultados.

Cuando se requiera hacer uso de estos datos almacenados, desde el menú inicio se presiona la tecla BIBLIOTE y se carga los datos necesarios [22, 23].

Anexo B. Promedio de Absorbancias para determinar el rango Lineal por triplicado.

E	ABS	10	50	90	M1	M2	M1+30%	M1+50%	Stcr
1	1	-0,023	-0,095	-0,185	-0,051	-0,137	-0,069	-0,077	-0,058
	2	-0,023	-0,096	-0,174	-0,052	-0,133	-0,067	-0,076	-0,058
2	1	-0,024	-0,099	-0,175	-0,051	-0,133	-0,067	-0,078	-0,056
	2	-0,025	-0,098	-0,177	-0,050	-0,132	-0,069	-0,076	-0,055
3	1	-0,024	-0,103	-0,180	-0,051	-0,136	-0,064	-0,082	-0,062
	2	-0,023	-0,108	-0,178	-0,049	-0,132	-0,065	-0,074	-0,065
4	1	-0,022	-0,108	-0,176	-0,047	-0,136	-0,067	-0,077	-0,058
	2	-0,025	-0,107	-0,176	-0,049	-0,7	-0,065	-0,081	-0,061
5	1	-0,024	-0,099	-0,175	-0,047	-0,136	-0,065	-0,078	-0,069
	2	-0,024	-0,093	-0,170	-0,052	-0,135	-0,065	-0,077	-0,068
6	1	-0,025	-0,095	-0,179	-0,052	-0,136	-0,066	-0,077	-0,069
	2	-0,024	-0,099	-0,169	-0,056	-0,134	-0,067	-0,078	-0,065
7	1	-0,025	-0,102	-0,173	-0,055	-0,133	-0,066	-0,076	-0,064
	2	-0,023	-0,101	-0,171	-0,056	-0,132	-0,065	-0,078	-0,066

Est= Estándar $\overline{Abs}$ = Absorbancia promedioAbsort = Absortancia (100-%T)

Anexo C.

Absorbancias medidas de 5 soluciones estándar por duplicado.

Estandar		10 ppm	20 ppm	40 ppm	60 ppm	90 ppm
1	ABS_1	-0,025	-0,044	-0,084	-0,117	-0,177
	ABS_2	-0,031	-0,049	-0,081	-0,119	-0,180
2	ABS_1	-0,027	-0,049	-0,083	-0,117	-0,174
	ABS_2	-0,026	-0,044	-0,084	-0,120	-0,176
3	ABS_1	-0,021	-0,043	-0,084	-0,120	-0,175
	ABS_2	-0,020	-0,045	-0,083	-0,121	-0,178
4	ABS_1	-0,022	-0,047	-0,084	-0,121	-0,182
	ABS_2	-0,027	-0,039	-0,081	-0,120	-0,183
5	ABS_1	-0,024	-0,045	-0,084	-0,117	-0,170
	ABS_2	-0,024	-0,044	-0,081	-0,121	-0,179
6	ABS_1	-0,025	-0,042	-0,087	-0,118	-0,178
	ABS_2	-0,024	-0,043	-0,079	-0,119	-0,180
7	ABS_1	-0,025	-0,048	-0,081	-0,122	-0,183
	ABS_2	-0,023	-0,043	-0,079	-0,120	-0,184

Anexo D.
Absorbancias de Muestras reales, estándares y ensayos finales de validación

E	ABS	10	50	90	M1	M2	M1+30%	M1+50%	Stcr
1	1	-0,023	-0,095	-0,185	-0,051	-0,137	-0,069	-0,077	-0,058
	2	-0,023	-0,096	-0,174	-0,052	-0,133	-0,067	-0,076	-0,058
2	1	-0,024	-0,099	-0,175	-0,051	-0,133	-0,067	-0,078	-0,056
	2	-0,025	-0,098	-0,177	-0,050	-0,132	-0,069	-0,076	-0,055
3	1	-0,024	-0,103	-0,180	-0,051	-0,136	-0,064	-0,082	-0,062
	2	-0,023	-0,108	-0,178	-0,049	-0,132	-0,065	-0,074	-0,065
4	1	-0,022	-0,108	-0,176	-0,047	-0,136	-0,067	-0,077	-0,058
	2	-0,025	-0,107	-0,176	-0,049	-0,7	-0,065	-0,081	-0,061
5	1	-0,024	-0,099	-0,175	-0,047	-0,136	-0,065	-0,078	-0,069
	2	-0,024	-0,093	-0,170	-0,052	-0,135	-0,065	-0,077	-0,068
6	1	-0,025	-0,095	-0,179	-0,052	-0,136	-0,066	-0,077	-0,069
	2	-0,024	-0,099	-0,169	-0,056	-0,134	-0,067	-0,078	-0,065
7	1	-0,025	-0,102	-0,173	-0,055	-0,133	-0,066	-0,076	-0,064
	2	-0,023	-0,101	-0,171	-0,056	-0,132	-0,065	-0,078	-0,066

Stcr = Estándar Certificado.
AnexoE. Datos para comparación

Valores críticos T para rechazo de datos

n	95%	n	95%	N	95%
3	1,15	14	2,37	25	2,66
4	1,46	15	2,41	26	2,67
5	1,67	16	2,44	27	2,69
6	1,82	17	2,47	28	2,71
7	1,94	18	2,50	29	2,72
8	2,03	19	2,53	30	2,74
9	2,11	20	2,56	31	2,87
10	2,18	21	2,58	32	2,96
11	2,24	22	2,6	33	3,03
12	2,29	23	2,62	34	3,21
13	2,33	24	2,64	35	

n = Numero de datos (muestra)

Valores de distribución T para calcular el límite de confianza LC al 95%

GL	95%	gl	95%	gl	95%	gl	95%
1	12,71	11	2,20	21	2,08	50	2,01
2	4,30	12	2,18	22	2,07	∞	1,96
3	3,18	13	2,16	23	2,07		
4	2,78	14	2,14	24	2,06		
5	2,57	15	2,13	25	2,06		
6	2,45	16	2,12	26	2,06		
7	2,36	17	2,11	27	2,05		
8	2,31	18	2,10	28	2,05		
9	2,26	19	2,09	29	2,05		
10	2,23	20	2,09	30	2,04		

Valores de la distribución t al (99%) para calcular LDM

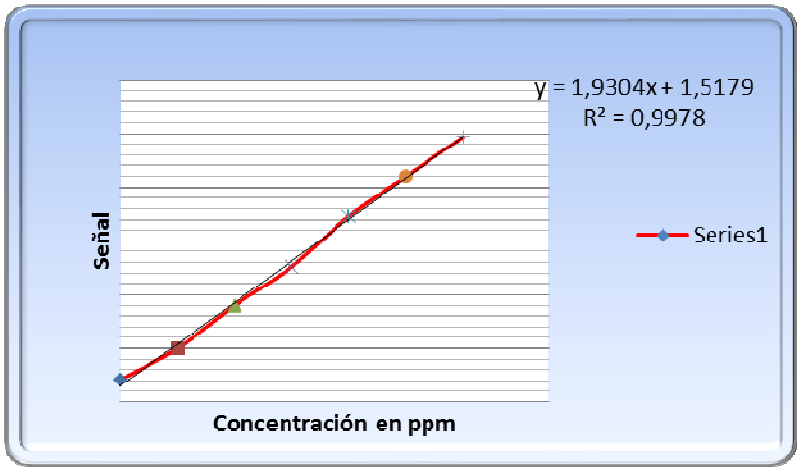
GL	99%	GL	99%	GL	99%	GL	99%
1	31,82	11	2,72	21	2,52	40	2,42
2	6,96	12	2,68	22	2,51	50	2,4
3	4,54	13	2,65	23	2,5	60	2,39
4	3,75	14	2,62	24	2,49	70	2,38
5	3,36	15	2,6	25	2,48	80	2,37
6	3,14	16	2,58	26	2,48	90	2,37
7	3	17	2,57	27	2,47	100	2,36
8	2,9	18	2,55	28	2,47	∞	2,33
9	2,82	19	2,54	29	2,46		
10	2,76	20	2,53	30	2,46		

GL = Grados de libertad

Anexo F. Ejercicio de aplicación “libro de Miller”

Xi	Xi^2	Yi	ŷ	Yi -ŷ	$(Y_i - \hat{y})^2$	$(X_i - \bar{X})$	$(Xi - \bar{X})^2$
0	0	2,1	1,52	0,58	0,3388	-6	36
2	4	5	5,38	-0,38	0,1434	-4	16
4	16	9	9,24	-0,24	0,0574	-2	4
6	36	12,6	13,10	-0,50	0,2503	0	0
8	64	17,3	16,96	0,34	0,1149	2	4
10	100	21	20,82	0,18	0,0317	4	16
12	144	24,7	24,68	0,02	0,0003	6	36
$\bar{X}=6$	$\Sigma=$ 364	$\Sigma=$13,1			$\Sigma=$0,9368		$\Sigma=$112

Sy/x	Sb	Sa
0,4328	0,0409	0,2949



t(n-2) = 2,57 Para un nivel de confianza del 95% Y=(1,93 ± 0,11) X + 1,52 ±0,76

a = 1,52 ± 0,76 b = 1,93 ± 0,11