

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

ESCUELA DE FORMACIÓN DE TECNÓLOGOS

**VALIDACIÓN DE MÉTODO PARA DETERMINACIÓN DE LA
DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO EN MUESTRAS DE AGUAS
EN ABGES LABORATORIO ANALÍTICO AMBIENTAL CIA. LTDA.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
TECNÓLOGO EN AGUA Y SANEAMIENTO AMBIENTAL**

GUSTAVO JAVIER PORTUGUEZ PAUCAR

gustavo.portuguez@epn.edu.ec

DIRECTOR(A): Ing. Santiago Stalin Guerra Salcedo, M.Sc.

santiago.guerra@epn.edu.ec

CODIRECTOR(A): Dra. Ana Lucia Balarezo Aguilar

ana.balarezo@epn.edu.ec

Quito, Enero 2022

CERTIFICACIÓN

Certificamos que el presente trabajo fue desarrollado por el Sr. Portuguez Paucar Gustavo Javier requerimiento parcial a la obtención del título de Tecnólogo en Agua y Saneamiento Ambiental, bajo nuestra supervisión:

Ing. Santiago Guerra Salcedo MSc.
DIRECTOR(A) DEL PROYECTO

Dra. Ana Lucia Balarezo Aguilar MSc.
CODIRECTOR(A) DEL PROYECTO

DECLARACIÓN

Yo Portuguez Paucar Gustavo Javier con CI: 172520195-6 declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

Sin perjuicio de los derechos reconocidos en el primer párrafo del artículo 144 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación – COESC-, soy titular de la obra en mención y otorgo una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva de uso con fines académicos a la Escuela Politécnica Nacional.

Entrego toda la información técnica pertinente, en caso de que hubiese una explotación comercial de la obra por parte de la EPN, se negociará los porcentajes de los beneficios conforme lo establece la normativa nacional vigente.



Gustavo Javier Portuguez Paucar

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico en primer lugar a Dios por darme fuerzas para poder seguir adelante con todos mis propósitos.

A mi madre Susana y a mi hermano, por darme su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida, por guiar mi vida, y enseñarme a enfrentar todos los retos que se me atraviesen para conseguir cualquier meta que me proponga.

A mi compañero Edison Quieta que Dios lo tenga en su gloria, ya que el escogió este tema de tesis y para honrar su memoria continúe y termine esta tesis la cual se lo dedico a él en especial.

A mi novia Carolina, por darme ánimos y fuerzas para poder culminar esta tesis, y estar junto a mí en los buenos y malos momentos en mi vida.

A mis compañeros y amigos de ABGES que me dieron ánimos para no decaer y poder culminar mi tesis.

Gustavo

AGRADECIMIENTO

A mi madre por siempre apoyarme y presionarme para poder seguir adelante en mi carrera universitaria, dándome su apoyo en cada momento que lo necesite.

A mis docentes de la carrera de ASA y en especial al Ing. Santiago Guerra, por compartir sus conocimientos y experiencias para poder desenvolverme en el ámbito profesional.

A mi novia por estar ahí cuando lo necesite, escuchar mis quejas y darme ánimos para no decaer en la culminación de la tesis.

A mis compañeros y amigos de ABGES que me ayudaron en lo que necesitaba y me daban la mano cuando lo requería.

Gustavo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPITULO 1	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivo general	2
1.2. Objetivos específicos.....	2
1.3. Fundamentos teóricos	3
1.3.1. Características generales del agua	3
1.3.2. Red Hídrica Del Distrito Metropolitano De Quito (DMQ)	3
1.3.3. Demanda Química de Oxígeno	4
1.3.4. Espectroscopia	5
1.3.5. Región visible.....	6
1.3.6. Espectrofotometría.....	6
1.3.7. Transmitancia y Absorbancia	6
1.3.8. Absorbancia.....	7
1.3.9. Ley de Lambert-Beer.....	7
1.3.10. Componentes del espectrofotómetro	8
1.3.11. Espectrofotómetro DR 4000.....	8
1.3.12. Validación	9
1.3.13. Definición de validación.	9
1.3.14. Parámetros a validar	10
CAPITULO 2	14
2. METODOLOGÍA.....	14
2.1. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en la matriz de agua potable.	14
2.1.1. Equipos, materiales y reactivos.....	14
2.1.2. Procedimiento para el análisis de la demanda química de oxígeno en matriz de agua potable	14
2.2. Validación.....	18

2.2.1. Selectividad.....	18
2.2.2. Exactitud	18
2.2.3. Límite de detección y de cuantificación	18
2.2.4. Linealidad.....	18
2.2.5. Precisión	18
2.2.6. Repetibilidad	18
2.2.7. Incertidumbre	19
CAPITULO 3	20
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
3.1. Curvas de calibración	20
3.2. Validación.....	24
3.2.1. Validación Demanda Química de Oxígeno	24
3.2.2. Diseño estadístico de validación del parámetro DQO.....	28
3.2.3. Incertidumbre	32
CAPITULO 4	33
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
4.2. Recomendaciones.....	34
CAPITULO 5	35
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	35
6. ANEXOS	38
ANEXO I: TABLA PARA CALCULO DE T CRITICA Y FCRITICA.....	i
ANEXO II: REGISTRO FOTOGRAFICO DE LOS EQUIPOS NO CALIBRADOS.....	3
ANEXO III: CALCULOS.....	v

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de agua en la tierra.	3
Figura 2. Espectro electromagnético.	5
Figura 3. Componentes del espectrofotómetro.....	8
Figura 4. Diagrama de Ishikawa.	17
Figura 5 Curva de Calibración día 1.	18
Figura 6. Curva de calibración día 2.	19
Figura 7. Curva de calibración día 3.	20
Figura 8. Curva de calibración día 4.	21
Figura 9. Espectro fotómetro DR 4000U.....	vii
Figura 10. Reactor de DQO 16500 – 10.	vii
Figura 11. Micropipeta de 1 – 10 ml	viii

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Longitud de onda con relación al color	6
Tabla 2. Datos técnicos del espectrofotómetro DR4000	9
Tabla 3. Equipos, materiales y reactivos para el análisis de DQO	13
Tabla 4. Datos de la curva de calibración día 1.....	18
Tabla 5 Datos de la curva de calibración día 2	19
Tabla 6 Datos de la curva de calibración del día 3.....	20
Tabla 7. Datos de la curva de calibración del día 4.	21
Tabla 8. Datos de las concentraciones	22
Tabla 9. Curvas de calibración validación.....	23
Tabla 10. Estimación lineal de las curvas de calibración.....	24
Tabla 11. Criterios de aceptación y rechazo obtenidos de las 3 curvas de calibración.....	25
Tabla 12. Límite de detección y cuantificación	25
Tabla 13. Resultados de la concentración obtenida.....	26
Tabla 14. Grados de libertad.	26
Tabla 15. Resultado de la Suma de cuadrados – Entre Grupos y Dentro de Grupos.....	27
Tabla 16. Resultado de la Suma de cuadrados Total.....	27
Tabla 17. Resultado del promedio de los cuadrados - Entre Grupos y Dentro de grupos ...	27
Tabla 18. Resultado de la Prueba F.....	28
Tabla 19. Resultado de la F crítica.....	28
Tabla 20 Datos obtenidos de repetibilidad y reproducibilidad.....	28

RESUMEN

Este proyecto de titulación presenta la validación del método 8000 de HACH, método de digestión y colorimetría, para ABGES Laboratorio Analítico Ambiental Cía. Ltda. En la actualidad el laboratorio no tiene validado ningún parámetro para calidad de agua y para garantizar la confiabilidad de los resultados, estos parámetros se subcontratan, lo que genera una pérdida financiera para la empresa.

Para la construcción de este proyecto de titulación, se recopiló información de los equipos que se necesita, material volumétrico y solución patrón a partir de ftalato acido de potasio, y equipos que son necesarios para eliminar interferencias que puedan existir. Además, se comprobó el estado óptimo del dispositivo para identificar posibles problemas.

Luego de hacer una revisión con la información obtenida, se determinó la matriz de agua, basándose en que, para los análisis de la DQO, la mayor interferencia que se tiene son cloruros, y el laboratorio no cuenta con equipos para análisis de los mismos. El único tipo de agua que no tendrá presencia de cloruros será el agua potable, en este contexto, el método ha sido validado, en base a los parámetros de validación, ANOVA e incertidumbre, para decidir si puede ser aplicado dentro del laboratorio.

Para concluir con el documento, los resultados obtenidos del proyecto de titulación no son del todo confiables, ya que al recopilar la información se determinó que los equipos no se encontraban calibrados, por tanto, los datos podrían presentar errores y los resultados carecían de la confiabilidad requerida.

ABSTRACT

This project presents the validation of HACH method 8000, digestion and colorimetry method, for ABGES Laboratorio Analítico Ambiental Cia. Ltda. At present, the laboratory has not validated any parameter for water quality and to ensure the reliability of the results, these parameters are outsourced, which generates a financial loss for the company.

For the construction of this project, information was collected on the equipment needed, volumetric material and standard solution from potassium phthalate acid, and equipment that is necessary to eliminate interferences that may exist. Additionally, the optimal condition of the device was checked to identify possible problems.

After reviewing the information obtained, the water matrix was determined, based on the consideration that in COD analysis the greatest interference is chlorides, and the laboratory does not have equipment to quantify them. In this context, the only type of water that will not have the presence of chlorides will be drinking water, in this context, the method has been validated, based on validation parameters, ANOVA and uncertainty, to decide if it can be applied within the laboratory.

To conclude, the results obtained are not completely reliable, since when collecting the information it was possible to determine that the equipment was not calibrated and therefore the data could present errors.

CAPITULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La norma ISO / IEC 17025 es útil para laboratorios que realizan ensayos, muestreos o cualquier tipo de calibración de acuerdo con un conjunto de normativas y requisitos para obtener resultados confiables que garanticen la calidad de sus ensayos. Los laboratorios emplean la norma ISO 17025 para implementar un sistema de gestión de la calidad que garantice la competencia técnica y la competencia administrativa competente. Para que un laboratorio mantenga su acreditación debe ser evaluado constantemente, razón por la cual la acreditación se otorga por un período de tiempo determinado (Benítez, 2020).

En Quito y en el resto del país las descargas de aguas servidas y residuos desechados por actividades industriales van en aumento equitativamente con el incremento de la población. En Ecuador, país rico en este recurso, no se gestiona de manera correcta, debido a falta de políticas ambientales, a su vez el aumento de la población es la mayor amenaza que se tiene para los ríos, Chavez Solution (2020) indica que “del 100 % del líquido vital distribuido para consumo humano en Ecuador, el 70 % se dirige a los sistemas de alcantarillado, de este porcentaje el 55,8 % son descargas tratadas, y el 44,2 % son descargas a pozos sépticos o canales. Si se continúa con esta práctica, este recurso, que es indispensable para la vida en general, disminuirá sensiblemente tanto en calidad y cantidad.”

En este contexto, la Organización Internacional de Normalización ha establecido normas de calidad para que las empresas que produzcan bienes y prestan servicios las cumplan, dependiendo de las actividades que realizan. Todas estas empresas cuentan con un cronograma, ya sea mensual, bimestral o anual, dirigido a ensayos, calibraciones y/o inspecciones que tienen como objetivo la acreditación de los procedimientos por entidades como el SAE (Servicio de Acreditación Ecuatoriano), el cual regulariza que se cumplan las normas establecidas (Pimentel & Zevallos, 2018).

El Laboratorio de Análisis Ambiental de ABGES, como proveedor profesional de servicios especializados en el campo de la higiene ambiental e industrial, cuenta con el equipo y equipo técnico especializado para garantizar la pronta entrega del servicio, seguridad, personalización y eficiencia para satisfacer las necesidades del cliente. Los servicios que brindan se realizan con procedimientos específicos basados en metodologías validadas y estandarizadas. El laboratorio está acreditado por SAE de acuerdo con los estándares de calidad según la norma NTE - INEN ISO / IEC 17025: 2006, existe uno de los puntos de verificación importantes, es decir, la confirmación,

mediante la prueba y proporcionando prueba de los objetivos actualizados de que se cumplen los requisitos para el uso de un método analítico (Norma ISO/IEC 17025, 2006).

Es importante señalar que a pesar de que el laboratorio se encuentre acreditado por el organismo competente, esta acreditación no es universal y debe realizarse por cada uno de los parámetros para los cuales se pretende realizar un servicio. En este particular, y a pesar de que varios parámetros de análisis se encuentran validados, el ensayo de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) por digestión y espectrofotometría no lo está, lo que ocasiona la entrega de resultados erróneos que pueden generar sanciones a futuro al cliente y la suspensión de la evaluación al laboratorio (SAE, 2016). Para que esto no suceda el laboratorio se ve en la necesidad de realizar una subcontratación a otro laboratorio acreditado para asegurar la confianza en los resultados, con las consecuentes pérdidas económicas para la empresa.

Los objetivos de este proyecto incluyen el desarrollo y validación de HACH 8000: Método de digestión de reactor para la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO), utilizando agua potable como sustrato.

1.1. Objetivo general

Validar el método de ensayo para la determinación de la Demanda Química de Oxígeno en muestra de agua en ABGES Laboratorio Analítico Ambiental Cía. Ltda.

1.2. Objetivos específicos

- 1) Elaboración del método de ensayo de acuerdo con normativas nacionales, internacionales, necesidades y equipamiento del laboratorio.
- 2) Elaboración de los objetivos y diseño experimental con base a la metodología de ensayo propuesta.
- 3) Estimación de la incertidumbre.
- 4) Declaración del método validado y puesta a punto

1.3. Fundamentos teóricos

1.3.1. Características generales del agua

El agua es un elemento natural que juega un papel importante en los ciclos terrestres de organismos vivos y ecosistemas. Es sinónimo de vida porque suministra a los animales, plantas y otros seres vivos sus moléculas para crecer y sobrevivir. Los ecosistemas acuáticos y terrestres están estrechamente relacionados porque dependen de ellos para equilibrar sus ecosistemas (Roldan, 2020).

Al ser un componente de origen natural, como indica Carrión M. (2020) “La cantidad de agua disponible en la Tierra es de 1.386 millones de kilómetros cúbicos, que se encuentra entre el agua salada del océano y el agua pura”. Estos últimos se encuentran, en su mayor parte, en glaciares congelados, enterrados bajo la superficie en acuíferos, ríos y lagos, y solo el 0,007 del total está disponible para los humanos. La distribución en la tierra es mostrada de formas más detallada en la figura 1 a continuación:



Figura 1. Distribución de agua en la tierra.

Fuente: (Carrión, 2020)

1.3.2. Red Hídrica Del Distrito Metropolitano De Quito (DMQ)

El deterioro de las condiciones del agua de los ríos de Quito se debe a una serie de factores, principalmente aglomeración, sedimentación de residuos domésticos e industriales, mala disposición de residuos, etc. (DMQ, 2016).

El estudio de vulnerabilidad del sector agua radica en evaluar la sensibilidad y exposición de las fuentes de agua para el suministro de líquido apto para el consumo para una población estimada de 24 millones de habitantes. Este estudio se basa en dos tipos de unidades de análisis: el primero las cuencas hidrográficas aportantes de agua cruda, y el segundo las zonas de servicio de agua potable (DMQ, 2016).

Dentro del Distrito Metropolitano de Quito los sistemas de agua potable desde la captación, conducción, tratamiento y distribución trabajan en cumplimiento al control de calidad ligado a la normativa nacional e internacional. Existen varios sistemas de captación de agua de diferentes puntos, para que luego este recurso sea conducido a las diferentes plantas de potabilización.

De acuerdo con la EPMAPS (2008) “La producción de agua potable es una serie de procesos químicos e hidráulicos destinados a eliminar sólidos del agua, filtrar y desinfectar. Este proceso se lleva a cabo en 39 plantas ubicadas en DMQ, de las cuales 4 son las más representativas: la planta El Placer, la planta Bellavista, la planta El Troje y la planta Puengasí”.

1.3.3. Demanda Química de Oxígeno

La DQO es una medición indirecta de la materia orgánica existente en la muestra. Este procedimiento de caracterización puede medir todos los compuestos orgánicos necesarios para iniciar la degradación de contaminantes. Esta medición es importante para determinar la eficiencia de una planta de tratamiento y purificación, permite identificar los problemas que pueden surgir durante el funcionamiento de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales. Por ello, es una medida indispensable en los procesos industriales y municipales (Hannainstruments, 2019).

Al evaluar la materia orgánica, en muestras tanto de agua residual como natural, la DQO y la DBO son de vital importancia para determinar su cantidad presente en la muestra, ya que residuos con alto contenido orgánico deben pasar por un tratamiento, reduciendo su cantidad en el líquido vital para que éste sea purificado o descargado. El análisis de la DBO requiere 5 días para completarse, por tanto, es importante el uso de la DQO para realizar monitoreos del proceso de tratamiento en operaciones diarias (Hanna Instruments, 2019).

Los niveles mayores de contaminación se deben a concentraciones altas de DQO, y éstas también pueden proceder de fuentes naturales que provocan un agotamiento en el oxígeno del agua, lo que conlleva a la muerte masiva de animales acuáticos, también puede ser tóxica para el medio ambiente o acumularse en la cadena alimenticia (Huyghe, 2021).

El método HACH 8000 para DQO se desarrolló en dos etapas: la etapa de digestión y la determinación colorimétrica, para la fase de digestión en donde se prepara las muestras para su posterior lectura, para la preparación, se utiliza los tubos de reactivos de digestión DQO, ftalato de potasio y agua desionizada como reactivos, los equipos utilizados para la primera fase consta el reactor de DQO 16500-10, micropipeta, e instrumentos de laboratorio. En la segunda fase, se necesita agua desionizada para la limpieza de los viales por fuera y el espectrofotómetro DR 4000U, este último sirve para obtener el resultado de la DQO por medio de una lectura de concentración, absorbancia o transmitancia.

1.3.4. Espectroscopia

El término luz se refiere a la forma visible de radiación electromagnética, así como a la forma invisible de radiación ultravioleta e infrarroja. En espectrometría de absorción, las regiones visible y ultravioleta se utilizan con mayor frecuencia. El espectro electromagnético se observa de mejor manera en la figura 2 (Diaz, y otros).

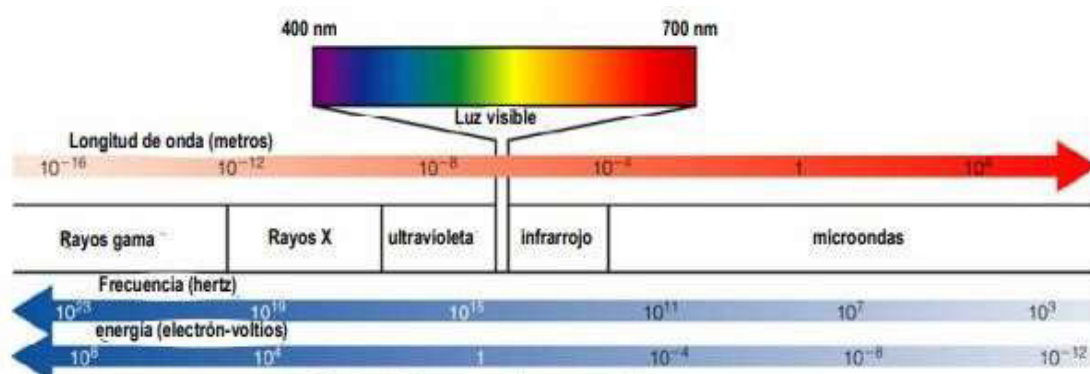


Figura 2. Espectro electromagnético.

Fuente: (Diaz et al)

1.3.5. Región visible

Esta es la región donde los humanos pueden percibir el espectro electromagnético. Estas son longitudes de onda de luz que se transmiten, no se absorben. Su rango de longitud de onda es 400-750nm y el color se define como la sensación que produce la luz en el ojo, dependiendo de la longitud de onda corresponden al rango descritos en la Tabla 1 (Diaz et al).

Tabla 1. Longitud de onda con relación al color.

Longitud aproximada de onda	Color de luz que absorbe	Color de luz que refleja
390 – 435	Violeta	Amarillo verdoso
435 – 490	Azul	Amarillo
490 – 580	Verde	Rojo
580 – 595	Amarillo	Azul
595 – 650	Naranja	Azul verdoso
650 – 780	Rojo	Verde azulado

Fuente: (Diaz et al)

1.3.6. Espectrofotometría

Es el procedimiento en el cual posibilita la medición de la cantidad de luz que esta puede absorber de una sustancia la cual cuenta con una cierta longitud de onda (Perez, 2021)

1.3.7. Transmitancia y Absorbancia

Transmitancia

Transmisión es la cantidad de energía transferida a través del cuerpo durante un período de tiempo. Existen varios tipos de transmisión, dependiendo de la forma de energía considerada (Gonzalez, 2010).

La transmitancia óptica se trata de la cantidad de luz, de una longitud de onda específica, que atraviesa un objeto. Por lo que el cuerpo absorbe parte de la luz y el resto la atraviesa. El valor de la transmitancia de la luz se puede calcular mediante la siguiente ecuación 1. (Gonzalez, 2010).

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Ecuación 1. Cálculo de transmitancia

Donde:

I= Cantidad de luz transmitida

I₀= Cantidad de luz incidente

1.3.8. Absorbancia

La absorbancia es una medida de la radiación reflejada a medida que atraviesa un elemento. Este es un concepto relacionado con la muestra porque indica la cantidad que absorbe de luz (Escalante, 2021). Cuanta más luz se absorbe, mayor es la capacidad de absorción del cuerpo y menos luz pasa por el cuerpo y menos luz se transmite a través del cuerpo (Gonzalez, 2010).

$$A = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

Ecuación 2. Cálculo de transmitancia

Donde:

I = Cantidad de luz transmitida.

I₀ = Cantidad de luz incidente.

1.3.9. Ley de Lambert-Beer

Esta ley describe la relación obtenida entre la absorción de luz monocromática y la concentración de cromóforos en solución (Diaz et al.). Esto se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$A = C * \epsilon * L$$

Ecuación 3. Cálculo ley de Lambert – Beer.

Donde:

A= Absorbancia de la muestra.

C= Concentración del cromóforo.

L= Longitud de paso óptico de la muestra.

ϵ = Absortividad molar.

1.3.10. Componentes del espectrofotómetro

QuimiNet (2011) indica que “el espectrofotómetro consta de las siguientes partes”:

1. Fuente de Luz: ilumina la muestra química para que realice su función sujeta a determinadas condiciones como estabilidad direccional, etc.
2. Monocromador: aísla la radiación de la longitud de onda deseada, produciendo luz monocromática.
3. Colimador: Lente que transmite un haz luminoso incidente de una longitud de onda específica.
4. Compartimiento de muestra: almacenamiento para R.E.M.
5. Detector: se encarga de resaltar la radiación para que pueda ser estudiada posteriormente y saber qué tipo de reacción van a enfrentar.
6. Registrador: convierte los fenómenos físicos en números proporcionales al analito.
7. Fotodetectores: se encargan de detectar simultáneamente señales a 16 longitudes de onda y cubrir el espectro visible.

Los componentes del espectrofotómetro se demuestran en la Figura 3.



Figura 3. Componentes del espectrofotómetro.

Fuente: (Baker, 2019)

1.3.11. Espectrofotómetro DR 4000

Las especificaciones y características técnicas se las puede visualizar en la tabla 2, y obtenidas del manual del instrumento (HACH, 1999).

Tabla 2. Datos técnicos del espectrofotómetro DR4000

Gama de longitud de onda	De 190 a 1100 nm (DR 4000U), de 320 a 1100 nm (DR 4000V).
Precisión de longitud de onda	± 1 nm
Reproducibilidad de longitud de onda	± 0,1nm
Resolución de longitud de onda	0,1nm
Fuente de luz	Tungsteno y deuterio (DR 4000U), tungsteno (DR 4000V)

1.3.12. Validación

Validar un método analítico es un gran paso para garantizar que los resultados proporcionados por el método sean coherentes y válidos para el objetivo planificado. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010).

1.3.13. Definición de validación.

Según la ISO/IEC 17025 define “a la validación como la confirmación, a través del examen y del aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso previsto” (SAE, 2017).

Conforme con la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (2009), la validación es vista a través de un proceso de dos etapas: en la primera establece que el laboratorio instaure en qué medida puede producir resultados óptimos dentro de límites conocidos, sin embargo, estos resultados pueden tener sesgos, por así, decirlo equivocarse sistemáticamente, entonces en la segunda etapa, para resolver el problema, el laboratorio tendrá que mirar hacia afuera y contrastar sus datos con puntos de referencia acordados (UNIDO, 2009).

Los métodos analíticos pueden ser:

- Normalizados
- No normalizados: nuevos o desarrollados.
- Normalizados con una modificación significativa

1.3.14. Parámetros a validar

Los parámetros relacionados con el proceso de medición son:

Selectividad es la medida en el que se puede usar el método para identificar un analito particular en una mezcla o matriz sin interferencia de diversos componentes que se comportan de manera similar (Instituto de Salud Pública Chile, 2010).

Exactitud: El grado de correspondencia entre el resultado de la medición y el valor real de la cantidad medida (Moreno).

La exactitud se determinará mediante el porcentaje de recuperación obtenido entre la concentración obtenida del análisis y el valor de concentración teórica (Vinagre, 2007), esta se la calcula de la siguiente manera:

$$\%R = \frac{X \text{ obtenido}}{X \text{ esperado}} * 100$$

Ecuación 4. Porcentaje de recuperación.

Donde:

X obtenido: es el promedio total de la concentración obtenida del análisis de las muestras fortificadas y del material de referencia.

X esperado: es el valor de la concentración teórica.

Precisión: es el grado de conformidad entre mediciones independientes obtenido en determinadas condiciones. Se pueden realizar en términos de repetibilidad y reproducibilidad (Bravo, 2013).

Dentro de la precisión se encuentra:

- Repetibilidad: coincidencia dentro de un periodo corto para el mismo analista con la misma instrumentación (PAHO, 2008). Estas se encontrarán al analizar una misma muestra varias veces, en un tiempo determinado sin cambiar el equipo y el analista.
- Reproducibilidad: Coincidencia en los resultados entre laboratorio (PAHO, 2008). Estas se determinarán al analizar varias muestras en distintas condiciones, como por ejemplo cambio de analista o de equipo.

Límite de detección (LOD): Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, pero no cuantificarse en condiciones experimentales de acuerdo con la siguiente fórmula: (Romero, Vera, Pesantez, & Jumbo, 2019).

$$LOD = \frac{3 slo}{m}$$

Ecuación 5. Límite de detección

Donde:

Slo = desviación estándar del intercepto.

m = Pendiente de la curva de calibración.

Límite de cuantificación (LOC): es la mínima cantidad de analito presente en la muestra que puede cuantificarse en las condiciones experimentales descritas para este método (Romero, Vera, Pesantez, & Jumbo, 2019), para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$LOC = \frac{10 slo}{m}$$

Ecuación 6. Límite de cuantificación.

Donde:

Slo = desviación estándar del intercepto.

m = Pendiente de la curva de calibración.

Linealidad: método analítico que puede establecer una relación lineal entre la concentración del objeto a analizar y su respuesta (Bravo, 2013). Para determinar el rango lineal, se traza la gráfica de concentración frente a la reacción, llamado patrón de curva (Instituto de Salud Publica Chile, 2010).

Para evaluar la linealidad, existen diferentes maneras dentro de las cuales se encuentra la representación gráfica de los datos de los puntos de calibración. Para esto es necesario obtener el coeficiente de correlación (R^2), que proporciona la relación entre la concentración y la señal de emite el instrumento. Este valor esta entre 0 y 1, siendo 1 el valor que posee una mayor correlación, en técnicas espectrofotométricas es aceptable un valor mayor o igual a 0,99 (AEAS, 2012).

Para poder tener el método bajo control y asegurando su funcionamiento, se calculan a partir de las curvas de calibración los criterios de aceptación y rechazo para la pendiente e intercepto (punto donde la recta cruza con el eje vertical)

Para controlar el método y asegurar su operación, los criterios de aceptación y rechazo para el pendiente e intercepto (el punto donde la línea se cruza con el eje vertical) se calculan a partir de la curva de calibración (ASECAL, 2013).

Estos criterios se calculan al conocer los valores de la pendiente, desviación de pendiente y del intercepto. Además, el valor de t crítico de la tabla t-student teniendo en cuenta los grados de libertad, que es el número de variaciones en la curva de calibración (ASECAL, 2013)., esta tabla se podrá visualizar en el ANEXO I.

Se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Criterio de Pendiente } (m) = m \pm (sm * tcritica)$$

Ecuación 7. Criterios de pendiente

$$\text{Criterio de Intercepto } (Lo) = Lo \pm (slo * tcritica)$$

Ecuación 8. Criterio de intercepto

Incertidumbre: Este es un parámetro vinculado al resultado que caracteriza la dispersión de valores debido a la medición. Para su determinación, es necesario verificar primero los componentes de la incertidumbre de la medición como reactivos, instrumentos, condiciones de medición, etc. (Instituto de Salud Publica Chile, 2010).

Para analizar las fuentes de incertidumbre, se utilizan los diagramas de Ishikawa, también conocidos como espinas de pescado. La incertidumbre consta de varios componentes, los cuales pueden ser evaluados según el tipo contenido en los métodos (Instituto de Salud Publica Chile, 2010) estos son:

- Incertidumbre tipo A: es la evaluación monocomponente que se realiza mediante una evaluación estadística de los valores obtenidos en las condiciones de medición definidas (Instituto de Salud Publica Chile, 2010).
- Incertidumbre tipo B: es la incertidumbre de una medición realizada por otros medios, como la información obtenida de un certificado de calibración (Instituto de Salud Publica Chile, 2010).

CAPITULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en la matriz de agua potable.

Para determinar la demanda química de oxígeno se tomó como referencia la información provista por el método HACH 8000 y Standard Methods (APHA, 2017).

2.1.1. Equipos, materiales y reactivos

La demanda química de oxígeno se analizó utilizando los materiales, equipos y reactivos que se muestran en la tabla:

Tabla 3. Equipos, materiales y reactivos para el análisis de DQO

Equipos	Materiales	Reactivos
Espectrofotómetro UV-VIS HACH/DR 4000U	Micropipeta de 1 -10 ml	Agua desionizada Tipo 1
	Balones aforados de 25 y 100 ml	
Reactor de DQO HACH 16500-10	Vasos de precipitación de 100 ml	Viales de DQO de 20 a 1500 mg/l
	Erlenmeyer de 50 ml	Ftalato acido de potasio (KHP)

2.1.2. Procedimiento para el análisis de la demanda química de oxígeno en matriz de agua potable

Preparación de la solución patrón de 500 mg/l

Para la preparación se disolvió 425 mg de Ftalato acido de potasio (KHP) durante 2 horas, luego de haber pasado ese tiempo, se diluye a un litro de agua desionizada.

Preparación de los equipos

El equipo HACH se encendió y se dejó que se estabilice y climatice a las condiciones laborales (laboratorio o *in situ*) por un periodo de 3 a 5 min.

Preparación de las muestras para curvas de calibración.

Se realizaron cálculos para la determinación del volumen que se requiere colocar en los matraces de aforación, a partir de la concentración inicial de 500 mg/l preparar las soluciones para construcción de la curva de calibración con un rango de 20 a 200 mg/l en recipientes de 25 ml, utilizando la ecuación de dilución presentada a continuación:

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

Ecuación 9. Ecuación de dilución

Donde:

C1: Concentración inicial.

V1: Volumen inicial.

C2: Concentración final.

V2: Volumen final.

Después del cálculo del volumen, el volumen obtenido de la solución estándar de la primera concentración se añadió a un matraz aforado de 25 ml con una micropipeta y se afora con agua desionizada, realizar el mismo procedimiento con los diferentes volúmenes calculados para la construcción de las curvas de calibración con el rango de 20 a 200 mg/l, luego La solución se transfirió a un vaso de precipitados de 100 ml.

Posteriormente, cuando ya el reactor de DQO se encontraba a 150 °C, se adicionaron con una micropipeta 2 mL de la solución estándar de la primera concentración al vial de DQO, repitiendo el mismo paso para cada una de las soluciones obtenidos de cada concentración. Para el blanco, se adicionaron 2 ml de agua desionizada al tubo de digestión de DQO, cada vial estuvo en una inclinación de 45 grados. Posteriormente se cerraron los viales cuidadosamente lavando cada uno por fuera con agua desionizada y secando con papel toalla, luego se homogenizaron estos recipientes con movimientos de 180° sosteniendo en la tapa y parte final del vial. La homogenización vino acompañada de una liberación de presión en interior de los viales mediante la apertura de éstos por unos segundos liberando los gases. Luego los viales fueron colocados en el reactor de DQO precalentado durante 2 horas.

Terminado el calentamiento (digestión) de las muestras, se apagó el reactor y se dejó reposar los viales en el reactor hasta que llegó a 120°C, esto es aproximadamente 20 minutos. Luego se tomaron y se agitaron los viales varias veces mientras aún estaban en calor, para luego colocarlos en un soporte para tubos de ensayo, esperando hasta que hayan alcanzado la temperatura ambiente.

Preparación de las muestras para ANOVA

Se realizaron cálculos para la determinación del volumen que se requiere colocar en los matraces de aforación, a partir de la concentración inicial de 500 mg/l de la solución patrón, con la concentración final de 50 mg/l y un volumen final de 100 ml, utilizando la ecuación de dilución (9).

Luego de calcular el volumen, se adicionó el volumen obtenido a un matraz aforado de 100 ml con una micropipeta, y se afora con la muestra de agua potable para obtener una solución uniforme, realizar el mismo procedimiento 3 veces más ya que se realizó 4 repeticiones por día, luego se trasladó la solución a un vaso de precipitación de 100 ml.

Posteriormente, cuando la temperatura en el digestor de DQO alcanzó 150 °C, se adicionó con una micropipeta 2mL de la solución resultante mencionada en el párrafo anterior al vial de DQO, realizar el mismo paso 3 veces más hasta obtener las 4 repeticiones. Para el blanco, se adicionaron 2 ml de agua desionizada al tubo de digestión de DQO, cada vial estuvo en una inclinación de 45 grados. Posteriormente se cerraron los viales cuidadosamente lavando cada uno por fuera con agua desionizada y secando con papel toalla, luego se homogenizó los viales con movimientos de 180° sosteniendo en la tapa y parte final del vial.

La homogenización vino acompañada de una liberación de presión en interior de los viales mediante la apertura de éstos por unos segundos liberando los gases. Luego los viales fueron colocados en el reactor de DQO precalentado durante 2 horas.

Terminado el calentamiento (digestión) de las muestras, se apagó el reactor y se dejó reposar los viales en el reactor hasta que llegó a 120°C, esto es aproximadamente 20 minutos. Luego se tomó y se agitaron los viales varias veces mientras aún estaban en calor, para luego colocarlos en un soporte para tubos de ensayo, esperando hasta que hayan alcanzado la temperatura ambiente, se realizó 4 repeticiones con las mismas condiciones de preparación.

Creación del programa para DQO en el espectrómetro

Una vez encendido el espectrofotómetro se presionó la tecla SIMPLE λ (modalidad exploración de onda única), y nos dirigió a la modalidad de medición de absorbancia. Se presionó la tecla GOTO λ para colocar la longitud de onda que se desea utilizar. Con los viales ya fríos se procedió a:

Lavar el vial de blanco exteriormente con agua destilada y secar con una toalla de papel, luego se procedió a colocar el blanco en la celda de medición y se oprimió la tecla ZERO automáticamente el equipo se colocará en 0, después se colocó los viales realizados para curvas de calibración en la celda de medición y automáticamente dará lecturas en unidades de absorbancia, y se anotó cada lectura con su respectiva concentración.

Una vez obtenida las lecturas se regresó a la pantalla principal del espectrofotómetro y se procedió a presionar la tecla USER PROGRAM, para crear algún programa dentro del espectrofotómetro se lo realizo presionando la tecla CREATE y se insertó el número de programa que desee para hacer correr el programa.

Luego de a ver creado el programa se presionó la tecla EDIT, y se procedió a editar cada parámetro que se tiene dentro del programa como unidades, especialmente el parámetro Calib. table. en la cual se coloca los rangos de 20 a 200 mg/l estos rangos son los seleccionados para la preparación de muestras para cuervas de calibración y las absorbancias que se midieron anteriormente, por último, se regresó a la pantalla principal.

Determinación colorimétrica, 0 a 1500 mg/l de DQO

Para la determinación colorimétrica se utilizaron los viales hechos para ANOVA, los viales una vez fríos fueron colocados en el espectrofotómetro en el cual se ya se había ingresado con el número de programa almacenado para la demanda química de oxígeno, en el rango adecuado. Luego se limpió la parte exterior de los viales, y se procedió a colocar en primer lugar el blanco dentro del espectrofotómetro con el logotipo de Hach hacia el frente del instrumento. Posteriormente, se presionó la tecla ZERO y la pantalla mostró 0 mg/l COD, y luego se limpió la parte exterior de los viales con una toalla, se colocó uno por uno los viales en la celda del espectrofotómetro, se presionó la tecla READ y se leyó el resultado en mg/l de DQO.

2.2. Validación

2.2.1. Selectividad

No se determinó la selectividad debido a que no se tiene ninguna interferencia ya que la matriz utilizada fue agua potable.

2.2.2. Exactitud

La exactitud se determinó mediante el cálculo del porcentaje de recuperación utilizando la concentración obtenida de las muestras y la concentración teórica.

2.2.3. Límite de detección y de cuantificación

Para determinar el límite de detección y cuantificación se realizaron los cálculos utilizando la pendiente y la desviación estándar del intercepto calculados a partir de las curvas de calibración.

2.2.4. Linealidad

Para la linealidad se construyeron 4 curvas de calibración que cumplieron el criterio de aceptación y rechazo, que es un coeficiente de correlación mayor a 0,995

De las cuatro curvas que se obtuvieron no se consideró la del primer día ya que no cumple con el criterio de aceptación y rechazo. Después de haber encontrado las curvas que cumplían con el criterio antes mencionado, se realizó el cálculo de pendiente máxima y mínima, el intercepto máximo y mínimo, mediante las ecuaciones (7) y (8).

Se realizaron 4 curvas de calibración en rango de: 2 mg/l a 200 mg/l, utilizando una solución patrón de 500 mg/l, utilizando la ecuación de dilución (9).

2.2.5. Precisión

La precisión se calculó mediante el análisis de la varianza de todos los valores obtenidos de las cuatro repeticiones que fueron considerados para el ANOVA. Esta se obtiene mediante la prueba Fisher en la cual aplica las varianzas, para identificar si existe o no diferencias significativas.

2.2.6. Repetibilidad

La repetibilidad se realizó atizando 3 días de medición, con 4 repeticiones por día, lo que indica que se realizaron un total de 12 unidades por día, estas fueron realizadas por el mismo analista.

2.2.7. Incertidumbre

Para el cálculo de incertidumbre se establecieron todas las fuentes que influyen en la determinación de la demanda química de oxígeno.

Todos los factores que influyen en el análisis de DQO se resumen en la figura 4.

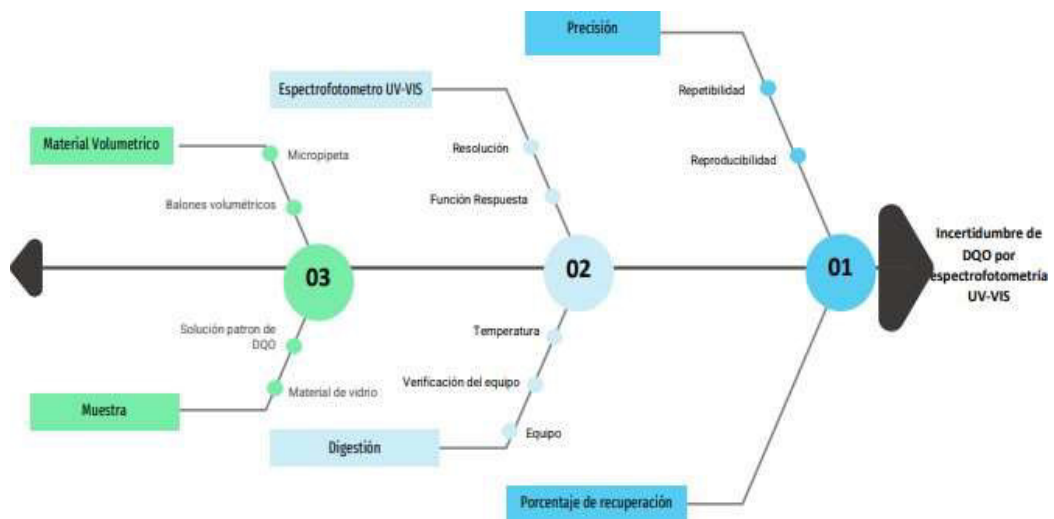


Figura 4. Diagrama de Ishikawa.

CAPITULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Curvas de calibración

Se realizaron 4 curvas de calibración en rango de: 2 a 200 mg/l, utilizando una solución patrón de 500 mg/l.

Curva de calibración del primer día

Esta curva fue la más inestable ya que el coeficiente de correlación R^2 no cumplió con los criterios de aceptación y rechazo que debe ser mayor a 0,995, los resultados se presentan a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Datos de la curva de calibración día 1.

Concentración (mg/l)	Absorbancia (abs)
20	0,013
40	0,05
60	0,068
80	0,081
100	0,091
200	0,134

La curva de calibración se muestra en la figura 5.

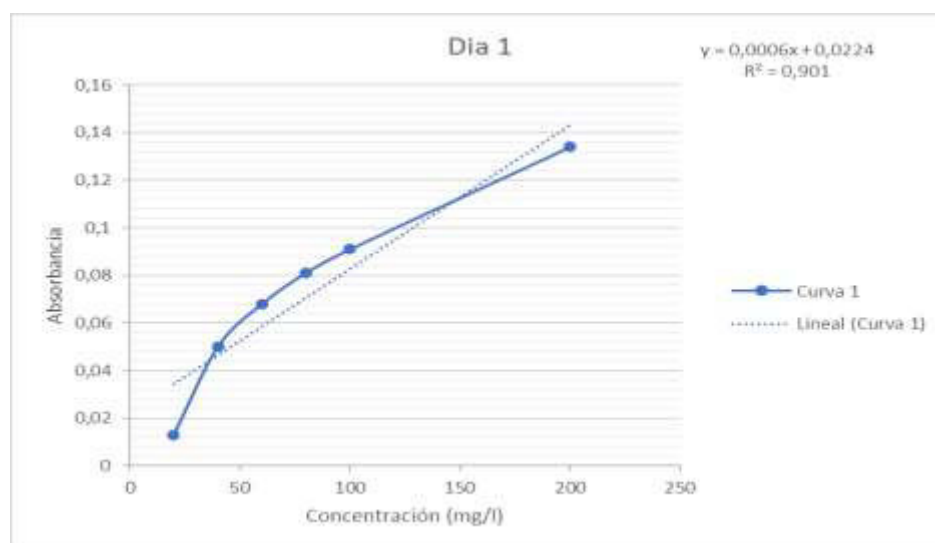


Figura 5 Curva de Calibración día 1.

Curva de calibración del segundo día

La Tabla 5 muestra los datos de la curva de calibración.

Tabla 5 Datos de la curva de calibración día 2

Concentración (mg/l)	Absorbancia (abs)
20	0,044
40	0,055
60	0,064
80	0,075
100	0,081
200	0,135

La curva de calibración se muestra en la figura 6.

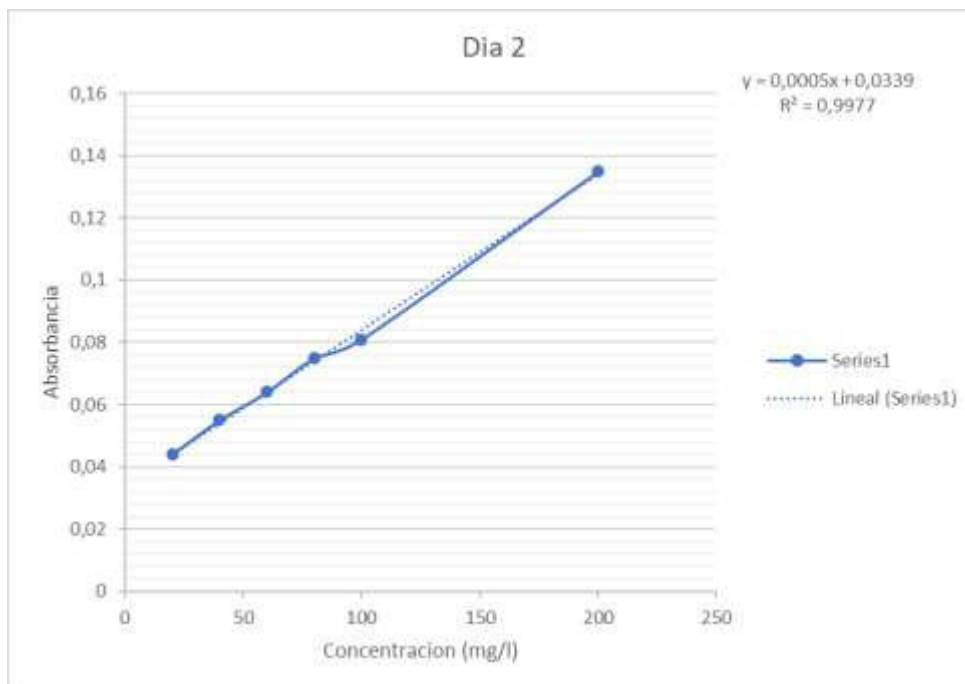


Figura 6. Curva de calibración día 2.

Curva de calibración del tercer día

La Tabla 6 muestra los datos de la curva de calibración.

Tabla 6 Datos de la curva de calibración del día 3

Concentración (mg/l)	Absorbancia (abs)
20	0,033
40	0,048
60	0,06
80	0,069
100	0,081
200	0,152

La curva de calibración se muestra en la figura 7.

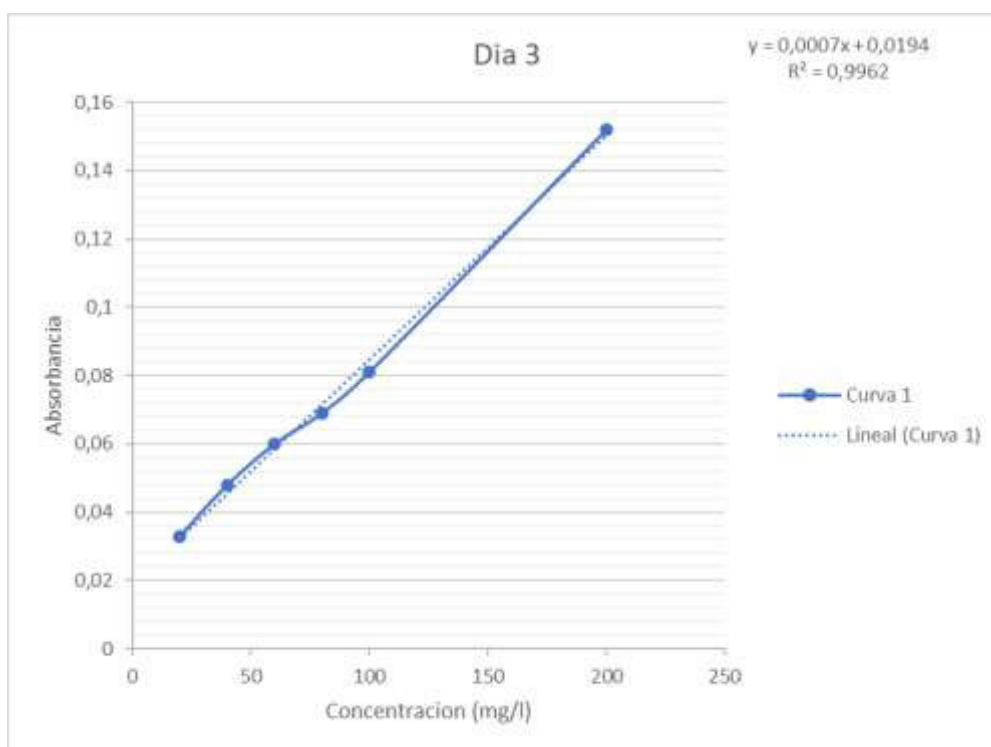


Figura 7. Curva de calibración día 3.

Curva de calibración del cuarto día

La Tabla 7 muestra los datos de la curva de calibración.

Tabla 7. Datos de la cueva de calibración del día 4.

Concentración (mg/l)	Absorbancia (abs)
20	0,038
40	0,047
60	0,057
80	0,074
100	0,088
200	0,152

La curva de calibración se muestra en la figura 8.

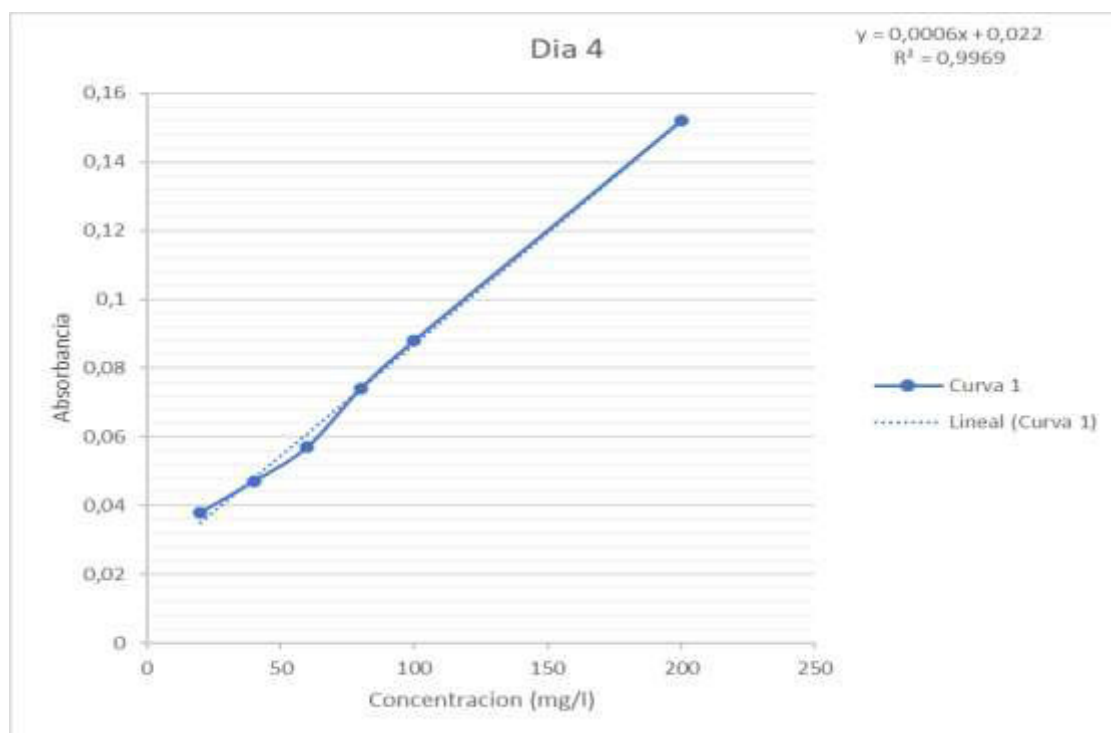


Figura 8. Curva de calibración día 4.

3.2. Validación

3.2.1. Validación Demanda Química de Oxígeno

a) Selectividad:

La selectividad del método no se realizó debido a que la matriz de las muestras que se utilizó para llevar a cabo el análisis del método fue agua potable. Este tipo de agua se encuentra debidamente tratada.

El método de determinación de DQO se puede ver afectado por la interferencia de cloruros, pero debido a que la matriz que se utilizó para la validación fue agua potable, se considera que los cloruros se encuentran dentro del límite permisible para consumo humano, por tanto, no se efectuará ningún tipo de tratamiento para eliminar esa interferencia. Adicionalmente, hay que tomar en cuenta que la concentración de cloruros que representa interferencia en el método de determinación de la DQO es 500 ppm, y el agua potable posee una concentración mucho más baja que esto. Como último punto cada vial de DQO contiene sulfato de mercurio, el mismo que sirve para la eliminación de cloruros de muestras de agua.

b) Linealidad

La linealidad se determinó al realizar 4 curvas de calibración, los resultados se procesaron estadísticamente a través de Excel y se determinó: coeficientes de correlación, desviación estándar de la pendiente e intercepto, además, estos parámetros se utilizaron para los criterios de aceptación y rechazo, por lo que se calcularon la pendiente y las intersecciones mínima y máxima.

En la tabla 9 se observan los datos obtenidos de las 4 curvas de calibración, en donde se detallan las absorbancias obtenidas.

Tabla 9. Curvas de calibración validación.

Concentración (mg/l)	Absorbancias (abs)			
	Curva Dia 1	Curva Dia 2	Curva Dia 3	Curva Dia 4
20	0,013	0,044	0,033	0,038
40	0,05	0,055	0,048	0,047
60	0,068	0,064	0,06	0,057
80	0,081	0,075	0,069	0,074
100	0,091	0,081	0,081	0,088
200	0,134	0,135	0,152	0,152

La Tabla 10 muestra las estimaciones lineales de las curvas de calibración realizadas.

Tabla 10. Estimación lineal de las curvas de calibración.

Variable	Curva Dia 1	Curva Dia 2	Curva Dia 3	Curva Dia 4
Pendiente (m)	0,00060	0,00050	0,00065	0,00064
Intercepto (Lo)	0,02240	0,03391	0,01939	0,02198
Coefficiente de determinación (r ²)	0,90096	0,99765	0,99619	0,99687
Error de estimación de Y (s _{y,x})	0,01430	0,00173	0,00287	0,00258
Desviación en función a la pendiente (S _m)	0,00010	1,21367E-05	2,01779E-05	1,81413E-05
Desviación en función del intercepto (S _{Lo})	0,01019	0,00123	0,00205	0,00184
t crítica	2,776	2,776	2,776	2,776
F	36,3898	1703,91096	1048, 19967	1276,67124
Grado de libertad (gl)	4	4	4	4

Se determinó un valor de t crítico procesado estadísticamente en Excel usando grados de libertad y porcentaje de confiabilidad, o usando la tabla de distribución t-student, este dato se podrá visualizar en el ANEXO I.

Los datos y la curva del día 1 no se tomaron en cuenta por problemas que se tuvieron durante la medición de los datos e hizo que el coeficiente de determinación R² no cumpla. El problema que se tuvo fue en la parte de la celda donde se ubica los viales de DQO ya que la misma no estaba firme y existía movimiento durante la medición, como fue explicado con anterioridad.

La Tabla 11 muestra los criterios de aprobado y reprobado obtenidos de las tres curvas de calibración, descartando la curva del día 1.

Tabla 11. Criterios de aceptación y rechazo obtenidos de las 3 curvas de calibración

Rectas de calibración	Lo mínimo	Lo máximo	m mínima	m máxima	r2
Día 2	0,0305	0,0373	0,000467	0,000535	0,99765
Día 3	0,0137	0,0251	0,000597	0,000709	0,99619
Día 4	0,0169	0,0251	0,000598	0,000699	0,99687
Total	0,0137	0,0373	0,000467	0,000709	

Con base en estos resultados, pudimos confirmar la linealidad de las curvas de calibración creadas. Las curvas de calibración se encuentran en el punto 3.1.

c) Exactitud

El cálculo de recuperación en porcentaje, para determinar la exactitud se realizó con base en el promedio total de la concentración obtenida del análisis de las muestras fortificadas y del material de referencia con el valor de la concentración teórica.

La tabla 8 presenta el valor obtenido del promedio general o total expresado en PG, y en % de recuperación, usando como valor de la concentración teórica 50 mg/l.

Tabla 8. Datos de las concentraciones

	Valor obtenido
Promedio General o total	35
% de recuperación	70 %

Como se muestra en la Tabla 8, la tasa de recuperación excede el $\pm 15\%$ aceptable. por el laboratorio y recomendado en el (APHA, 2017), no encontrándose dentro del rango de aceptación de porcentaje de recuperación que es del $85\% \leq \%R \leq 115\%$

El porcentaje obtenido no se encuentra dentro del rango, y esto se debe a posibles causas que se mencionan a continuación:

- El espectrofotómetro no tuvo un mantenimiento constante y esto provoca que las variaciones de las medidas empiecen a tener una alteración, además que la celda donde se colocan los viales no se encontraba debidamente sujetos, por consecuente, se comenzaba a mover.
- El digestor para las muestras de DQO no se encuentra calibrado, por tanto, no es posible saber si la temperatura de reacción es aquella que se necesita para la realización del ensayo correspondiente. Variaciones de temperatura en la digestión pueden ocasionar que los viales de DQO no se digieran completamente, por consecuencia, se tendrá lecturas incorrectas de los mismos
- La micropipeta y el balón volumétrico son de gran importancia para la preparación de las soluciones, estos equipos tampoco se encontraban calibrados lo que provoca que se tengan errores en la preparación y como resultado una mala lectura de las concentraciones.

Algunos de los equipos mencionados anteriormente se pueden visualizar en el ANEXO II del presente informe.

d) Límite de detección y cuantificación

Para la obtención del límite de detección y cuantificación, se calculó mediante la ecuación (6) y (7) respectivamente. Los resultados se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Límite de detección y cuantificación.

	Límite de detección LD	Límite de cuantificación LC
Día 1	7,3878	24,6262
Día 2	9,4193	31,3977
Día 3	8,535	28,4499
Mínimo	7,3878	24,6262

e) Sensibilidad

La sensibilidad depende del límite de detección y de cuantificación, por tanto, el método será sensible ya que pequeñas variaciones de concentración van a determinar una gran variación de respuesta, y mientras más cercano a uno se tenga el coeficiente de determinación, se puede decir que el método es más sensible.

3.2.2. Diseño estadístico de validación del parámetro DQO.

Análisis simple de varianza de un factor (ANOVA)

En la tabla 13 se observa toda la información obtenida en el análisis de varianza de un factor, la muestra que se utilizó fue de agua potable con solución estándar.

Tabla 13. Resultados de la concentración obtenida.

Repeticiones	Concentración obtenida		
	Día 1	Día 2	Día 3
n1	30	37	37
n2	36	38	35
n3	35	36	35
n4	31	34	36
Promedio por día (PL)	33,000	36,250	35,750
Promedio General (PG)	35,000		
Sumatoria	132	145	143

Grados de libertad

En la siguiente tabla 14 se presenta los grados de libertad del origen de la varianza que son entre grupos, dentro de grupos y el total.

Tabla 14. Grados de libertad.

	Grados de libertad	Resultado
Entre grupos	$V_1 = 3 - 1$	2
Dentro de grupos	$V_2 = 12 - 3$	9
Total	$V = 12 - 1$	11

Se procedió a calcular la sumatoria de las observaciones de experiencia:

Suma de diferencia cuadrática – Entre Grupos (SDC_B) y Dentro de Grupos (SDC_w)

En la tabla 15 se presenta el resultado obtenido de SDC_B y SDC_w respectivamente, en el Anexo III se observará el cálculo que se hizo para obtención del valor.

Tabla 15. Resultado de la Suma de cuadrados – Entre Grupos y Dentro de Grupos.

	Valor Obtenido
SDC _B	24,500
SDC _w	37,500

Suma de diferencia cuadrática total (SDCt)

En el ANEXO III se podrá ver el cálculo realizado, en la tabla 16 se presenta el resultado de SDCt respectivamente.

Tabla 16. Resultado de la Suma de cuadrados Total.

	Valor Obtenido
SDCt	62,000

Diferencia cuadrática media – Entre Grupos (DCM_B) y Dentro de Grupos (DCM_w)

En la tabla 17 se presenta el resultado obtenido de DCM_B y DCM_w respectivamente, en el Anexo III se muestra el cálculo realizado.

Tabla 17. Resultado del promedio de los cuadrados - Entre Grupos y Dentro de grupos.

	Valor Obtenido
DCM _B	12,250
DCM _w	4,16666667

Determinación de la Prueba F calculada (F_{calc.})

En la tabla 18 se presenta el valor de la Prueba Fisher, la cual emplea el resultado de las diferencias cuadráticas medias tanto de entre grupos y dentro de grupos. Este cálculo podrá ser visualizado en el ANEXO III.

Tabla 18. Resultado de la Prueba F.

	Valor Obtenido
F_{calc}	2,94

Determinación de la F crítica ($F_{\text{crit.}}$)

El resultado obtenido se realizó mediante la función DISTR.F.INV, en el cual se procedió estadísticamente en Excel™, colocando los argumentos de porcentaje de confiabilidad y número de grados de libertad entre grupos y dentro de grupos. Este resultado se presenta en la siguiente tabla 19 y este cálculo podrá ser visualizado en el ANEXO III.

Tabla 19. Resultado de la F crítica

	Valor Obtenido
$F_{\text{crit.}}$	4,25649473

También se puede determinar el valor de F crítico mediante la Tabla F utilizando los dos grados de libertad. (ver Anexo I).

Se observa que el $F_{\text{calc.}} < F_{\text{crit.}}$

Concluimos que no existen diferencias significativas y las que existe son casuales (error aleatorio), así aprobando la hipótesis nula. Por lo cual los datos obtenidos son estadísticamente iguales.

f) Precisión

La precisión se obtuvo del cálculo del ANOVA, y se muestra en la Tabla 20 a continuación.

Tabla 20 Datos obtenidos de repetibilidad y reproducibilidad.

	Valor obtenido
Desviación estándar de repetibilidad (Sr)	2,04124
Precisión Intermedia	2,02083
Desviación estándar de reproducibilidad (SR)	2,48746
Coefficiente de variación de repetibilidad	5,83211
Coefficiente de variación de reproducibilidad	7,10705

Se observa en la tabla 20 que los criterios de precisión cumplen con los objetivos de validación, encontrándose que el método es preciso.

g) Robustez

Es la capacidad de que el método pueda ser empleado en otras matrices, es decir, que el procedimiento analítico no se pueda ver afectado por variaciones durante la aplicación en otras matrices. Por tanto, este método no se podría considerar que es muy robusto ya que se encuentra afectado por modificación de las condiciones analíticas, esta puede ser las siguientes:

- Los equipos, ya que al no estar calibrados los resultados pueden verse afectados, esto conlleva a que no se tenga un tiempo de reacción adecuado teniendo un efecto significativo en el desempeño del método.
- La estabilidad de la muestra ya que en las diferentes matrices de agua se suele tener interferencias las cuales pueden afectar a los resultados

Todos estos factores se encuentran presentes habitualmente dentro del método, y son necesarios de identificar, ya que podrían afectar los resultados finales obtenidos a través de éste, al tener un efecto significativo en el desempeño del método. Por lo mencionado anteriormente, si se quisiera determinar si el método es robusto se deben llevar a cabo pruebas de significación en la matriz para poder establecer si los efectos que fueron observados son estadísticamente significativos y si es bueno para poder ser aplicado en otras matrices.

La razón por la cual no se realizaron las pruebas en otras matrices se debe a que en diferentes tipos de agua como residual o natural se presentan varias interferencias (en el análisis de la DQO principalmente los cloruros), y debido a que el laboratorio no cuenta con los equipos, reactivos y materiales necesarios para poder eliminar esas interferencias, no se consideró realizar pruebas en otras matrices.

h) Aplicabilidad

El método de la demanda química de oxígeno se podría utilizar en las matrices: aguas naturales, aguas residuales y agua de mar, pero siempre y cuando se tenga un control sobre el equipamiento que va a intervenir en el análisis.

3.2.3. Incertidumbre

No se pudo realizar el cálculo de incertidumbre debido a diversas causas descritas a continuación:

- Para la incertidumbre de los equipos, tanto el espectrofotómetro, como el reactor de DQO, se debe contar con certificados de calibración que aseguren un funcionamiento óptimo y que no incluyan un error en la determinación. Al no contar con estos documentos, ya que los equipos no se encontraban calibrados al momento del análisis, no se tenía datos particulares de éstos para la determinación de la incertidumbre del método
- El material volumétrico como la micropipeta y balones volumétricos no contaban con el certificado de calibración, por tanto, no se tenía datos para poder realizar el cálculo de la incertidumbre.

CAPITULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se determinaron los parámetros de validación de los métodos, en donde la función respuesta obtuvo coeficientes de correlación para DQO de 0,997. 0,996 y 0,996 de los días 2, 3 y 4 respectivamente, estableciendo la linealidad del método.
- Los límites de detección y cuantificación de DQO fueron de 7,3878 y 24,6262 mg/l, el método demostró no ser exacto ya que se obtuvo un porcentaje de recuperación del 70%. La precisión de los métodos fue mayor al 5%, por tanto, los resultados cumplen con los objetivos de validación establecidos en el proyecto excepto en exactitud.
- Los parámetros de validación se establecieron de acuerdo con la evaluación experimental y estadística de los resultados obtenidos con ANOVA. Los parámetros de linealidad y sensibilidad se estimaron porque la curva de calibración estaba destinada específicamente a validar el método que funciona en relación con la concentración del objeto analizado y sus resultados.
- Se llevó a cabo un registro con los análisis de resultados obtenidos en la validación como: cálculos matemáticos, gráfico, con la finalidad de poseer evidencia objetiva, que fundamentara el cumplimiento de los requisitos de validación.
- Los resultados de la validación no son muy confiables ya que por motivos como: la falta de calibración de equipos volumétricos y de vidrio, la falta de manteniendo del espectrofotómetro DR 4000U, por tanto, la validación del método no está en un 100% de confiabilidad.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda usar el equipo de protección personal en especial mascarilla, guantes y la bata de laboratorio al momento de manipular los viales de DQO ya que estos contienen sulfato de mercurio el cual es muy tóxico en contacto con la piel.
- Se recomienda ejecutar con los procesos de calibración externa e interna tanto de los equipos como del material volumétrico.
- En la linealidad de la validación se recomienda verificar que las curvas de calibración cumplan con los criterios de aceptación.
- Al momento de encender el espectrofotómetro UV-VIS se recomienda esperar de 3 a 5 minutos para que se estabilice y a climaticice, pero esto dependerá del equipo HACH que se utiliza ya que el tiempo de estabilización podría aumentar.
- Realizar un mantenimiento periódico de los equipos e instrumentos con la finalidad que se encuentren en óptimas condiciones y controlar la estabilidad de los métodos al transcurrir el tiempo.
- Realizar las calibraciones de cada equipo e instrumentos de laboratorio preferible anualmente y hacer un seguimiento del estado de esos equipos.

CAPITULO 5

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AEAS. (2012). Guia para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo aguas. Parte II Criterios para la validación de los métodos de ensayo físicos, químicos y microbiológicos. España.
- APHA. (2017). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington.
- ASECAL. (2013).
- Benítez, S. (04 de Mayo de 2020). TecnoSoluciones . Obtenido de tecnosolucionescr.net: <https://tecnosolucionescr.net/blog/196-es-igual-un-laboratorio-acreditado-que-un-laboratorio-certificado>
- Bravo, Y. (19 de Abril de 2013). Validación Métodos Analíticos. Recuperado el 15 de Diciembre de 2021 , de <https://es.slideshare.net/yerkob/validacion-metodos-analiticos>
- Carrión, M. (20 de Marzo de 2020). Cuanta agua hay en el planeta . Obtenido de <https://www.elagoradiario.com/agorapedia/cuanta-agua-planeta/>
- Chavezsolution. (1 de Marzo de 2020). Aguas servidas un riesgo para los ríos del país. Obtenido de <https://chavezsolution.com/noticias-ambientales/aguas-servidas-un-riesgo-para-los-rios-del-pais/>
- Diaz, N., Bárcena, A., Reyes, E., Cejudo, A., Novo, J., Peinado, J., . . . Isaac. (s.f.). Espectrofotometría . Obtenido de Universidad de Cordova : https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf
- DMQ. (2016). Atlas Ambiental 2016 Quito sostenible. Quito: TecnoPrint .
- EPMAPS. (s.f.). Agua de Quito . Obtenido de <https://www.aguaquito.gob.ec/tratamiento/>
- Escalante, G. (3 de Abril de 2021). Absorbancia en espectrofotometría . Obtenido de <https://aleph.org.mx/que-es-la-absorbancia-en-espectrofotometro>
- Gonzalez, M. (8 de Noviembre de 2010). Transmitancia y Absorbancia . Obtenido de <https://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/transmitancia-y-absorbancia>

- Hannainstruments. (01 de Marzo de 2019). Guía para el análisis de la demanda química de oxígeno (DQO). Obtenido de <https://www.hannacolombia.com/blog/post/115/guia-para-el-analisis-la-demanda-quimica-oxigeno-dqo>
- Huyghe, B. (6 de Mayo de 2021). Preguntas Típicas sobre el DQO. Obtenido de <https://www.desotec.com/es/carbonologia/casos/5-preguntas-t-picas-sobre-el-dqo>
- INEN. (2006). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN - ISO/IEC 17025/2006 . Requisitos generales para la competencia de laboratorios de calibración y ensayo. Ecuador: primera edición .
- Instituto de Salud Publica Chile. (Diciembre de 2010). Guía técnica: Aspectos generales sobre la validacion de metodos. Santiago.
- ISO/IEC. (2005). ISO 17025.
- Moreno, O. (s.f.). Exactitud y Precisión. Recuperado el 20 de Diciembre de 2021, de http://formacion.intef.es/pluginfile.php/246707/mod_resource/content/1/exactitud_y_precisin.html
- Norma ISO/IEC 17025. (2006). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- PAHO. (2008). Obtenido de Validación de métodos analíticos: https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf
- Perez, J. (2021). Espectrofotometría . Obtenido de <https://definicion.de/espectrofotometria/>
- Pimentel, K., & Zevallos, M. (Septiembre de 2018). Universidad de Guayaqui. Obtenido de Importancia de los Laboratorios Acreditados: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/35692/1/IMPORTANCIA%20DE%20LOS%20LABORATORIOS%20ACREDITADOS%20Y%20SU%20RELACION%20CON%20EL%20COMERCIO%20EXTERIOR%20ECUATORIANO.pdf>

- Proaño, P., Capito, L., Rosales, A., & Camacho, O. (2017). A dynamical sliding mode control approach for long deadtime systems. International Conference on Control, Decision and Information Technologies (CoDIT) . IEEE.
- QuimiNet. (3 de Octubre de 2011). Componentes del espectrofotómetro. Obtenido de <https://www.quiminet.com/articulos/como-se-compone-un-espectrofotometro-2584607.htm>
- Roldan, L. (28 de Febrero de 2020). Importancia del agua para los seres vivos. Obtenido de <https://www.ecologiaverde.com/por-que-es-importante-el-agua-para-los-seres-vivos-2553.html>
- Romero, H., Vera, T., Pesantez, F., & Jumbo, J. (2019). Aplicación de voltamperometría. Recuperado el 15 de Diciembre de 2021, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2019000300002&script=sci_arttext#tab01
- SAE. (18 de Noviembre de 2016). Como acreditarse: Laboratorios. Obtenido de <https://www.acreditacion.gob.ec/como-acreditarse-laboratorios/>
- SAE. (20 de Febrero de 2017). Validación de metodos de laboratorios . Obtenido de <https://www.acreditacion.gob.ec/que-es-la-validacion-de-metodos-de-laboratorios/>
- Vinagre, J. (2007). Calidad de Métodos Analíticos . Recuperado el 19 de Diciembre de 2021 , de <https://www.fao.org/3/ah833s/Ah833s15.htm>

6. ANEXOS

ANEXO I: TABLA PARA CALCULO DE T CRITICA Y FCRITICA

TABLA DE LA DISTRIBUCIÓN t-Student

2 colas	80%	90%	95%	98%	99%
$\alpha/2$	0.10	0.05	0.025	0.01	0.0015

1 cola	90%	95%	97.5%	99%	99.5%
α	0.10	0.05	0.025	0.01	0.0015
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576

TABLA F
F DISTRIBUCIÓN ($\alpha=0,05$)

F crítico	Grados de libertad del numerador										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	
Grados de libertad del denominador	1	161.44622	199.49948	215.70668	224.58335	230.16037	233.98752	236.76694	238.88424	240.54316	241.88193
	2	18.51276	19.00003	19.16419	19.24673	19.29629	19.32949	19.35314	19.37087	19.38474	19.39588
	3	10.12796	9.55208	9.27662	9.11717	9.01343	8.94067	8.88673	8.84523	8.81232	8.78549
	4	7.70865	6.94428	6.59139	6.38823	6.25607	6.16313	6.09421	6.04103	5.99880	5.96435
	5	6.60788	5.78615	5.40945	5.19216	5.05034	4.95029	4.87586	4.81833	4.77246	4.73506
	6	5.98737	5.14325	4.75706	4.53369	4.38737	4.28386	4.20667	4.14681	4.09901	4.05996
	7	5.59146	4.73742	4.34683	4.12031	3.97152	3.86598	3.78705	3.72572	3.67667	3.63653
	8	5.31764	4.45807	4.06618	3.83785	3.68750	3.58058	3.50046	3.43810	3.38812	3.34717
	9	5.11736	4.25649	3.86254	3.63309	3.48166	3.37376	3.29274	3.22959	3.17890	3.13727
	10	4.96459	4.10282	3.70827	3.47805	3.32584	3.21718	3.13547	3.07166	3.02038	2.97824
	11	4.84434	3.98231	3.58743	3.35669	3.20388	3.09461	3.01233	2.94798	2.89622	2.85362
	12	4.74722	3.88529	3.49030	3.25916	3.10587	2.99612	2.91335	2.84857	2.79638	2.75339
	13	4.66719	3.80557	3.41053	3.17912	3.02543	2.91527	2.83210	2.76691	2.71436	2.67102
	14	4.60011	3.73889	3.34389	3.11225	2.95825	2.84773	2.76420	2.69867	2.64579	2.60216
	15	4.54307	3.68232	3.28738	3.05557	2.90130	2.79046	2.70663	2.64080	2.58763	2.54371
	16	4.49400	3.63372	3.23887	3.00692	2.85241	2.74131	2.65720	2.59109	2.53767	2.49351
	17	4.45132	3.59154	3.19677	2.96471	2.81000	2.69866	2.61430	2.54796	2.49429	2.44992
	18	4.41386	3.55456	3.15991	2.92775	2.77285	2.66130	2.57672	2.51016	2.45628	2.41170
	19	4.38075	3.52189	3.12735	2.89511	2.74006	2.62832	2.54354	2.47677	2.42270	2.37793
	20	4.35125	3.49283	3.09839	2.86608	2.71089	2.59898	2.51401	2.44707	2.39282	2.34787
	21	4.32479	3.46679	3.07247	2.84010	2.68478	2.57271	2.48758	2.42046	2.36605	2.32095
	22	4.30094	3.44336	3.04912	2.81671	2.66127	2.54906	2.46377	2.39650	2.34193	2.29669
	23	4.27934	3.42213	3.02800	2.79554	2.64	2.52766	2.44223	2.37481	2.32011	2.27472
	24	4.25968	3.40283	3.00879	2.77629	2.62065	2.50819	2.42263	2.35508	2.30024	2.25474
	25	4.24170	3.38520	2.99124	2.75871	2.60299	2.49041	2.40473	2.33706	2.28210	2.23648
	26	4.22520	3.36901	2.97516	2.74260	2.58679	2.47411	2.38831	2.32053	2.26545	2.21972
	27	4.21001	3.35413	2.96035	2.72777	2.57189	2.45911	2.37321	2.30531	2.25013	2.20430
	28	4.19598	3.34039	2.94668	2.71407	2.55812	2.44526	2.35926	2.29127	2.23598	2.19004
	29	4.18297	3.32766	2.93403	2.70140	2.54538	2.43244	2.34634	2.27825	2.22288	2.17685
	30	4.17089	3.31583	2.92228	2.68963	2.53355	2.42052	2.33435	2.26616	2.21070	2.16458

ANEXO II: REGISTRO FOTOGRAFICO DE LOS EQUIPOS NO CALIBRADOS.



Figura 9. Espectro fotómetro DR 4000U.



Figura 10. Reactor de DQO 16500 – 10.



Figura 11. Micropipeta de 1 – 10 ml

ANEXO III: CALCULOS

Cálculo del Porcentaje de Recuperación.

$$\%R = \frac{X \text{ obtenido}}{X \text{ esperado}} * 100$$

$$\% R = \frac{35 \text{ mg/}}{50 \text{ mg/}} * 100 = 70 \%$$

Tabla para ANOVA

n	Día 1	Día 2	Día 3
n1	30	37	37
n2	36	38	35
n3	35	36	35
n4	31	34	36
PL	33,000	36,250	35,750
PG	35,000		
Sumatoria	132	145	143

Grados de libertad

	Grados de libertad	resultado
Entre grupos	V1= 3-1	2
Dentro de grupos	V2 = 12 - 3	9
Total	V = 12 - 1	11

Suma de Diferencia Cuadrática- Entre Grupos

$$SDC_B = \text{Número de Observaciones} * ((PL_1 - PG)^2 + (PL_2 - PG)^2 + (PL_3 - PG)^2)$$

$$SDC_B = 4 * ((33,000 - 35,000)^2 + (36,250 - 35,000)^2 + (35,750 - 35,000)^2) = 24,500 \text{ mg/l}$$

Diferencia cuadrática media – Entre Grupos

$$DCM_B = \frac{SDC_B}{\text{Grados de Libertad – Entre Grupos}}$$

$$DCM_B = \frac{24,500}{2} = 12,250 \text{ mg/l}$$

Suma de Diferencia Cuadrática-Dentro del Grupos

$$\begin{aligned} SDC_W = & ((L_{1,1} - PL_1)^2 + (L_{1,2} - PL_1)^2 + (L_{1,3} - PL_1)^2 + (L_{1,4} - PL_1)^2 \\ & + (L_{2,1} - PL_2)^2 + (L_{2,2} - PL_2)^2 + (L_{2,3} - PL_2)^2 + (L_{2,4} - PL_2)^2 \\ & + (L_{3,1} - PL_3)^2 + (L_{3,2} - PL_3)^2 + (L_{3,3} - PL_3)^2 + (L_{3,4} - PL_3)^2) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} SDC_W = & ((30 - 33,000)^2 + (36 - 33,000)^2 + (35 - 33,000)^2 + (31 - 33,000)^2 \\ & + (37 - 36,250)^2 + (38 - 36,250)^2 + (36 - 36,250)^2 + (34 - 36,250)^2 \\ & + (37 - 35,750)^2 + (35 - 35,750)^2 + (35 - 35,750)^2 \\ & + (36 - 35,0750)^2) \end{aligned}$$

$$SDC_W = 37,500 \text{ mg/l}$$

Diferencia cuadrática media–Dentro del Grupo

$$DCM_W = \frac{SDC_W}{\text{Grados de Libertad – Dentro de Grupos}}$$

$$DCM_W = \frac{37,500}{9} = 4,1666667 \text{ mg/l}$$

Suma de diferencia cuadrática total

$$SDC_T = SDC_B + SDC_W$$

$$SDC_T = 24,500 + 37,500 = 62,000 \text{ mg/l}$$

Determinación de la Prueba F calculada

$$\text{Prueba } F = \frac{DCM_B}{DCM_W}$$

$$\text{Prueba } F_{\text{calc.}} = \frac{12,250}{4,16666667} = 2,94$$

Determinación de la F crítica

$$= \text{DISTR.F.INV}(0,05;2;9)$$

Donde:

0,05: es porcentaje de probabilidad

2, 9: grados de libertad entre grupos y dentro de grupos

$$F_{\text{crit.}} = 4,2564$$

Determinación de la desviación estándar de repetibilidad

$$s_r = \sqrt{DCM_W}$$

$$s_r = \sqrt{4,16666667} = 2,04124$$

Determinación de la Precisión Intermedia

$$s_L^2 = \frac{DCM_B - DCM_W}{4}$$

$$s_L^2 = \frac{12,250 - 4,16666667}{4} = 2,02083 \text{ mg/l}$$

Determinación de la desviación estándar de Reproducibilidad

$$s_R = \sqrt{s_r^2 + s_L^2}$$

$$s_R = \sqrt{2,04124^2 + 2,02083} = 2,48746 \text{ mg/l}$$

Coefficiente de variación de repetibilidad

$$\%CV_r = \frac{s_r}{\text{Promedio Concentración}} * 100$$

$$\%CV_r = \frac{2,04124}{35,000} * 100 = 5,83211 \%$$

Coefficiente de variación de Reproducibilidad

$$\%CV_R = \frac{s_R}{\text{Promedio Concentración}} * 100$$

$$\%CV_R = \frac{2,48746}{35,000} * 100 = 7,10705 \%$$