



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
UNAN- LEÓN
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



VALIDACIÓN DEL MÉTODO COLORIMÉTRICO DE REFLUJO CERRADO PARA DETERMINAR LA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO (DQO) EN AGUAS RESIDUALES.

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA**

PRESENTADO POR:

Br. Martha Lorena Ramírez Caballero

TUTORES

**Msc. Amada Carrasco Montoya
Dr. Leonardo Mendoza Blanco**

LEÓN - NICARAGUA 2008



INDICE

	Pagina
I.RESUMEN.....	4
II.NTRODUCCION.....	5
III. OBJETIVOS	6
IV. MARCOTEORICO	
IV.1 GENERALIDADES.....	8
IV.2 DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO.....	11
IV.3 METODOS DE ANÁLISIS.....	12
IV.3.2 PRINCIPIO DEL METODO.....	13
IV.4 ESPECTROFOTOMETRÍA.....	14
IV.5 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.....	18
IV.6 PARAMETROS DE VALIDACION DE UN METODO.....	19
IV.7 HERRAMIENTAS ESTADISTICA	23
V PARTE EXPERIMENTAL	
IV.1 REACTIVOS Y MATERIALES.....	27
V.2 REACTIVOS.....	28
V.3 PROCEDIMIENTO	
V.3.1 LIMPIEZA DE CRISTALERIA.....	29
V.3.2 TOMA Y CONSERVACION DE LAS MUESTRA.....	30
V.3.3 PREPARACION DE SOLUCION.....	30
V.3.4 CALIBRACION DEL ESPECTROFOTOMETRO UV/V PERKIN ELMER LAMBDA 15.....	31
V.3.5 DETERMINACIÓN DEL ERROR RELATIVO DE CONCENTRACIÓN Y SELECCION DE LA LONGITUD DE ONDA ANALITICA DEL MÉTODO.....	31



V.3.6 DESARROLLO DEL MÉTODO	32
VI.RESULTADO Y ANALISIS	
VI.1 CALIBRACION DEL EQUIPO(ESPECTROFOTOMETRO PERKIN ELMER LAMBDA-15.....	37
VI.2 DETERMINACIÓN DEL ERROR FOTOMÉTRICO DEL EQUIPO.....	37
VI.3 ERROR RELATIVO DE CONCENTRACIÓN: MÉTODO COLORIMÉTRICO DE REFLUJO CERRADO PARA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO.....	38
VI.4 CURVA DE CALIBRACION NORMAL.....	39
VI.5 LÍMITE DE DETECCIÓN.....	40
VI.6 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.....	42
VI.7 REPETIBILIDAD	43
VI.8 CURVA DE CALIBRACION POR ADICION PATRON	47
VI.9 EFECTO MATRIZ.....	48
VI.10 ESTIMACION DE RECUPERACION.....	51
VI.11 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LA MUESTRA POR CURVA DE ADICION PATRON Y CURVA DE CALIBRACION NORMAL.	52
VII CONCLUSION	55
VIII RECOMENDACIONES.....	57
IX BIBLIOGRAFIA.....	58
ANEXO.....	60



I. RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló el proceso de validación del método colorimétrico de reflujo cerrado para determinar la Demanda Química de Oxígeno en aguas residuales por espectrofotometría UV – Visible. Los principales parámetros de validación evaluados fueron: linealidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación.

La linealidad del método se determinó a través de las curvas de calibración normal preparadas en días diferentes, obteniendo coeficientes de determinación mayores de 0.995 dando una buena linealidad. El límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) obtenidos a partir de la curva de calibración normal resultó ser de 29.21 mgO₂/L y 97.39 mgO₂/L respectivamente. La precisión del método se evaluó a través de la repetibilidad expresada como desviación típica relativa (%C.V) para tres niveles de concentración comprendidos en el intervalo considerado: 100, 400 y 900 mgO₂/L, siendo ésta menor del 10%; requisito que debe ser cumplido para métodos Espectrofotométricos. Esto demuestra que el método evaluado tiene una buena repetibilidad para las condiciones establecidas de trabajo.

Para evaluar el efecto matriz se elaboraron curvas de calibración por adición patrón y luego se realizó la comparación de sus pendientes con las obtenidas en las curvas de calibración normal; el valor obtenido para F_{cal} es de 5.725 ($<F_{tab} = 7.146$). De acuerdo a los resultados obtenidos se demuestra que no existe diferencia significativa entre las pendientes de la curva de calibración normal y curva de adición patrón; esto indica que no existe efecto de matriz para esa muestra.

Al evaluar la recuperación, ésta resultó igual al 99.4% y el error calculado midiendo la demanda química de oxígeno en la muestra de agua residual a partir de la curva de calibración normal y la curva de adición patrón fue de 5.44%.



II. INTRODUCCION

El agua es un recurso esencial para la vida, la salud, el desarrollo económico y el medio ambiente sostenible. Tiene un gran número de aplicaciones y usos; es la materia prima de cualquier producción industrial, agrícola y ganadera, además sirve de soporte para la vida acuática y almacén de sustento para la humanidad.

Numerosos elementos presentes en el agua tienen un origen natural, proveniente de las rocas, el suelo y el aire. A estos también se añaden los aportes originados por las actividades humanas, aglomeraciones, vertidos industriales y otros.

Las aguas de abastecimiento después de haber sido impurificada por diversos usos se clasifican como aguas residuales, estas se agrupan habitualmente en aguas de orígenes muy diversos. El agua residual se genera de todos los procesos industriales, actividades agropecuarias y domésticas; de esta manera los desperdicios procedentes de las viviendas, hoteles, restaurantes y edificios comerciales, constituyen los residuales típicamente domésticos; sin embargo éstas pueden combinarse con los residuales crudos o tratados de las industrias situadas en las comunidades urbanas, para luego ser descargadas a los sistemas colectores municipales y dar como resultado lo que conocemos como aguas residuales municipales.⁽¹⁾

Por su parte los residuos de las industrias evacuados mediante los sistemas de vertimiento o disposición de estas, se conocen como aguas residuales industriales y los residuos de los centros agropecuarios (residuales de vaquerías, centros porcinos, centros de crías de aves, etc.) se clasifican como residuales agropecuarios.

De acuerdo a su origen el agua residual tiende a adoptar composiciones típicas que las identifican, como el color y el olor que se ven a simple vista.

Los parámetros más comúnmente utilizados para caracterizar un agua residual son: Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) y Demanda Química de Oxígeno (DQO), que sirven para conocer la carga contaminante del agua. La demanda química de oxígeno (DQO) es uno de los parámetros de ensayos más utilizado para caracterizar el nivel de contaminación del agua residual.



La Demanda Química de Oxígeno (DQO) se expresa (en mg O₂/L) como la medida de la cantidad de oxígeno requerido para la oxidación química de la materia orgánica del agua residual usando como oxidante sales inorgánicas de permanganato o dicromato en un ambiente ácido y a altas temperaturas. Esta medida es una estimación de las materias oxidables presentes en el agua residual, cualquiera que sea su origen, orgánicas o minerales. ⁽²⁾

La DQO es importante por que mediante este parámetro se puede estimar la cantidad de materia orgánica que se genera de las industrias o corrientes receptoras de aguas residuales y seleccionar un tratamiento adecuado para eliminar la materia orgánica antes de descargarse al medio ambiente; además es de gran ayuda para empresas sujetas a regulaciones periódicas.

Para la determinación de la Demanda Química de Oxígeno en aguas residuales en un rango de 100-900 ppm, es aplicable el método colorimétrico de reflujo cerrado utilizando dicromato de potasio como agente oxidante. Este método tiene mayor sensibilidad que los métodos volumétricos, es más económico en cuanto al uso de sales metálicas como reactivo, no es preciso realizar ninguna corrección de volumen tras la digestión, y requiere menos tiempo para su aplicación; sin embargo, es necesaria una mayor homogeneización de las muestras que contienen sólidos suspendidos para obtener resultados reproducibles.

La validación de métodos analíticos es una exigencia práctica en un laboratorio de ensayo como una medida de la eficiencia del mismo al brindar resultados confiables para un fin determinado. Por esta razón se procedió a realizar la validación de este método para los fines propuestos.



III. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

- ❖ Validar el Método Colorimétrico de Reflujo Cerrado para determinar la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en aguas residuales en rango de concentraciones de 100 -900 ppm.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- ❖ Determinar los parámetros de validación del método (Linealidad, Limite de Detección, Limite de Cuantificación, Precisión y Recuperación)
- ❖ Verificar el efecto de matriz realizando curvas de adición patrón en muestras de aguas residuales.
- ❖ Cuantificar la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en muestras de aguas residuales



IV. MARCO TEORICO.

IV.1 GENERALIDADES.

Cuando un producto de desecho se incorpora al agua, el líquido resultante recibe el nombre de agua residual. Las aguas residuales tienen un origen doméstico, industrial, subterráneo y meteorológico; estos tipos de aguas residuales suelen llamarse respectivamente, domésticas, industriales, de infiltración y pluviales.

Las aguas residuales domésticas son el resultado de las actividades cotidianas de las personas. La cantidad y naturaleza de los vertidos industriales es muy variada, dependiendo del tipo de industria, de la gestión de su consumo de agua y del grado de tratamiento que los vertidos reciben antes de su descarga.

En el pasado se permitía que las aguas residuales no tratadas fueran vertidas libremente a las aguas superficiales; con el aumento de la población y de la actividad industrial en las ciudades a nivel mundial, la calidad de las aguas superficiales que las rodeaban se fue deteriorando gradualmente. En estas zonas, se alteró el ecosistema, las aguas comenzaron a oler mal y la flora y la fauna acuáticas comenzaron a desaparecer. Eventualmente esto se convirtió en un enorme problema medioambiental dando como resultado que diferentes enfermedades humanas relacionadas con el agua fueran apareciendo cada vez con más frecuencia en esas áreas. ⁽¹⁾

Las aguas residuales no tratadas son generalmente ricas en materia orgánica, esta materia orgánica alimenta a las algas y las bacterias normalmente presentes en las aguas superficiales solubles. La presencia de cantidad excesiva de nutrientes que se vierten en las aguas residuales no tratadas origina un incremento en el crecimiento de la bacteria así como las algas. Además de la materia orgánica, las aguas



residuales pueden también contener compuestos orgánicos oxidables. Estos compuestos orgánicos e inorgánicos consumen directa e indirectamente el oxígeno disponible presente en el ecosistema. Este proceso se llama eutrofización y eventualmente mata todos los organismos vivos (plantas, animales, insectos) presente en el sistema acuático.

El tratamiento de estas aguas residuales es de gran importancia por que ofrece una alternativa de solución a los problemas de contaminación del ecosistema ; para que esto se logre se recurre a muchos métodos de los cuales los más utilizados son los que involucran microorganismos debido a que son económicos, eficientes y no generan subproductos contaminantes.

La contaminación de las aguas puede proceder de fuentes naturales o de actividades humanas. Normalmente las fuentes de contaminación natural son muy dispersas y no provocan concentraciones altas de contaminación, excepto en algunos lugares muy concretos. En la actualidad la más importante, sin duda, es la provocada por el hombre; ésta se concentra en zonas concretas y para la mayor parte de los contaminantes, es mucho más peligrosa que la natural.

El desarrollo y la industrialización hacen un mayor uso del agua y una gran generación de residuos; muchos de ellos son depositados en ríos, lagos, lagunas etc. El uso de medios de transportes fluviales y marítimos, en muchas ocasiones es causa de contaminación de las aguas. ⁽²⁾

La composición de las aguas residuales se analiza con diversas mediciones físicas, químicas y biológicas. El origen, composición y cantidad de los desechos están relacionados con los hábitos de vida vigentes. Los análisis para determinar la materia orgánica en aguas limpias y residuales pueden clasificarse en 2 tipos generales de medida: los que determinan una cantidad conjunta de materia orgánica con características comunes en sus componentes y los que determinan cuantitativamente compuestos orgánicos individuales y específicos.

Existen diferentes métodos conocidos para medir la demanda de oxígeno, pero la DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) y DQO (Demanda Química de Oxígeno) son los métodos más ampliamente aceptados. Los métodos para la determinación de la DQO son de fácil aplicación y requieren



generalmente menos de tres horas. El método para la medición de la DBO requiere un período de incubación de 5 a 10 días y está más sujeto a errores del operario. ⁽¹⁾

La DQO se usa para medir los contaminantes en agua naturales y residuales, con el fin de valorar la concentración de los residuos vertidos tanto en agua domesticas servidas (aguas negras) como residuos industriales y en un proceso de tratamiento, se mide tanto en aguas de entradas como de salida para medir la eficiencia del mismo.

Es un método aplicable en aguas continentales (ríos, lagos, acuíferos, etc.), o cualquiera agua que pueda contener una cantidad apreciable de materia orgánica. No es aplicable para las aguas potables debido al valor tan bajo que se obtendría. Sin embargo, puede haber interferencias debido a que haya sustancias orgánicas susceptibles de ser oxidadas (sulfuros, sulfitos, yoduros, etc.).⁽¹⁾

El desarrollo económico de los últimos años ha crecido en gran manera y junto con ellos el grado de contaminación que se generan de las industrias y como una medida de regular la contaminación del medio ambiente, se crearon normativas para aguas potables y residuales como OMS (organización mundial de la salud) y las normas CAPRE (comité coordinador regional de instituciones de agua potable y saneamiento de Centroamérica, Panamá y republica dominica).

En Nicaragua, el Ministerio del Ambiente y Recursos Naturales es el órgano encargado de la protección del medio ambiente a través de la regulación y vigilancia del cumplimiento de las normas ambientales. Los límites permisibles para los contaminantes son establecidos en el decreto 33-95: *“Disposiciones para el control de la contaminación provenientes de las descargas de aguas residuales domésticas, industriales y agropecuarias”*.

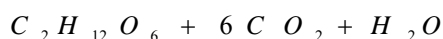


IV.2 DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO.

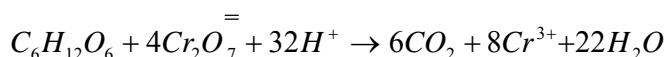
Desde el punto de vista ambiental la DQO es una medida aproximada del total de materia orgánica presente en una muestra de agua residual. Esta materia orgánica en condiciones naturales puede ser biodegradada lentamente (esto es oxidada) a CO_2 y H_2O mediante un proceso lento que puede tardar desde unos pocos días hasta unos cuantos millones de años, dependiendo del tipo de materia orgánica presente y de las condiciones de la biodegradación.

En las pruebas de la DQO se acelera artificialmente el proceso biodegradación que realizan los organismos, mediante un proceso de oxidación forzada utilizando oxidantes químicos, a través de métodos debidamente estandarizados, que tienen por objeto garantizar la reproducibilidad y comparabilidad de las mediciones.

La degradación biológica de un carbohidrato, en condiciones aeróbicas puede expresarse como:



Mientras que la degradación química de esta misma sustancia, acelerada con dicromato de potasio en medio ácido y medida bajo la forma de DQO, puede expresarse como:



Aunque en las pruebas de DQO las condiciones de oxidación son bastantes energéticas, este ensayo no representa una medida exacta del contenido total de materia orgánica en la muestra.

Ciertos compuestos orgánicos (volátiles principalmente) tales como los alcanos, la piridina y ciertas ligninas son particularmente resistentes a este proceso de oxidación; a pesar de eso y para efectos prácticos, puede asumirse que para la gran mayoría de las muestras de la oxidación de la materia orgánica



bajo estas condiciones alcanza una extensión de por lo menos, el 95% en relación con el total de materia orgánica existente en la muestra. ⁽³⁾

IV.3 METODOS DE ANÁLISIS.

Para la determinación de la Demanda Química de Oxígeno en aguas residuales se emplean varios métodos analíticos recomendados por Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. Tales como se muestran en tabla siguiente:

Tabla.1

Métodos
Método de Reflujo Abierto
Método Titulométrico de Reflujo Cerrado
Método Colorimétrico de Reflujo Cerrado

El método de reflujo abierto es adecuado para una amplia gama de residuos en los que se prefiere un gran tamaño de muestra. El método de reflujo cerrado es más económico en cuanto al uso de sales metálicas como reactivos, pero requieren homogeneización de las muestras que contengan sólidos suspendidos para obtener resultados reproducibles, siendo este último el más recomendado por las normas internacionales de certificación. ⁽⁴⁾

IV 3.1 SELECCIÓN DEL MÉTODO.

Se seleccionó el método colorimétrico de reflujo cerrado, considerando algunas ventajas que presenta; entre éstas está la sencillez de su implementación, sin necesidad de realizar correcciones de volumen después de la digestión, el hecho de que el sistema presenta mejores condiciones para oxidar los compuestos orgánicos y por ser aplicable a una gran variedad de muestras. ⁽⁴⁾

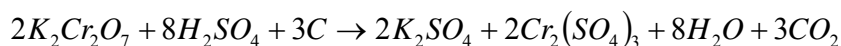


IV 3.2 PRINCIPIO DEL MÉTODO.

IV 3.2.1 MÉTODO COLORIMÉTRICO DE REFLUJO CERRADO.

Una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos son oxidados con una mezcla de ácido crómico y sulfúrico a ebullición. La mezcla se coloca a reflujo en una disolución de ácido fuerte con un exceso conocido de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), después de la digestión el dicromato no reducido se mide en un espectrofotómetro para conocer la cantidad de dicromato consumido y a partir de esto, calcular la materia oxidable en términos de oxígeno equivalente.

La reacción que ocurre en presencia de materia orgánica es la siguiente:



Interfieren en la determinación de la DQO, los haluros, los nitritos, el ion ferroso y en general cualquier sustancia inorgánica oxidable bajo las condiciones de trabajo. El método estándar utiliza sulfato de plata como catalizador para oxidación de los compuestos alifáticos lineales y sulfato mercurico como inhibidor de los haluros que estando presentes en la muestra sufrirían oxidación al halógeno respectivo y alterarían las mediciones.

No está de más advertir que por la misma razón anterior, los tubos de reacción, sus tapas y todos los materiales utilizados en la medición, deben estar escrupulosamente " limpios de materia orgánica " situación que conduce con frecuencia a errores " inexplicables " causado del exceso de confianza que deriva del trabajo rutinario con series de muestra.



El método de digestión en sistema cerrado es aplicable a muestras previamente homogenizadas o de naturaleza muy homogénea y/o cuando la disponibilidad de muestra es muy escasa. La homogenización de la muestra es sumamente necesaria, porque al no ser así, los resultados no serían reproducibles ni serían representativas de la fuente de muestreo y más aún, considerando el pequeño tamaño de la muestra analizada (2,5ml).⁽³⁾

IV.4 ESPECTROFOTOMETRÍA.

La espectrofotometría es uno de los métodos mas empleados en análisis, éste se basa en la medida de la absorción o emisión de la energía radiante, después que ésta interactúa con una especie química.

La gran difusión de estos términos es consecuencia de los factores siguientes:

- El amplio intervalo de longitud de onda o de frecuencia de energía radiante y sus diferentes modos de interacción con la materia.
- La existencia de instrumentos de medidas cada vez más precisos.
- Las ventajas inherentes al método: generalmente el análisis es muy rápido una vez que se ha establecido el método, a no ser que se requiera un tratamiento previo para eliminar interferencias.
- El método es por tanto, muy cómodo para medidas repetidas de un mismo constituyente.
- El método es en general aplicable a la determinación exacta de cantidades de constituyentes mucho menores que con los métodos gravimétricos o volumétricos; es por tanto, muy adecuado para el análisis de trazas.
- Los métodos espectrofotométricos tienen tan importancia que son los más utilizados en todos los laboratorios industriales, clínicos, de investigación o de enseñanza.⁽⁵⁾

IV.4.1 LEY DE LA ESPECTROFOTOMETRIA.

Cuando un haz de energía monocromática incide sobre una capa homogénea de una sustancia transparente parte de la energía es absorbida y el resto es transmitida. (En realidad, una pequeña parte es reflejada por lo que cuando se diseña un aparato para hacer estas medidas se tiene en cuenta este factor de tal forma que se elimine su influencia). Si la energía radiante incidente tiene longitudes de onda en la



región visible del espectro y el medio a través del cual tiene que pasar, absorbe selectivamente ciertas longitudes de ondas, el color observada corresponderá a la longitud de onda de la energía transmitida.

Ley de Beer.

La ley de Beer establece que la absorbancia es proporcional a la concentración de la especie absorbente.

$A = abc$, esta ecuación, es fundamental para aplicar la espectrofotometría en química se denomina ley de Beer.

En donde,

a = es la absorptividad.

b = longitud del trayecto óptico.

c = concentración de la muestra.

Absorbancia, A , es el logaritmo en base 10 del recíproco de la transmitancia, T , en el que el disolvente puro es el material de referencia; esto es $A = \log_{10} 1/T = -\log_{10} T$.⁽⁵⁾

IV.4.2 DESVIACION DE LA LEY DE BEER.

Normalmente se emplea como comprobante, de conformidad con la ley de Beer o como prueba de las desviaciones, una gráfica de A o de $\log T$ en función de la concentración, que sirve también como curva de calibración para el análisis de soluciones.

La mayor parte de esas desviaciones son más aparentes que reales y son debidas a una de las siguientes causas: Reales, Instrumentales o Químicas.

Reales: Se origina en el cambio de índice de refracción del sistema analítico a concentración $10^{-3}M$ o menores, el índice de refracción es constante, pero a concentración alta puede variar considerablemente.



Instrumental: Aparecen con frecuencia desviaciones aparente de la absorbancia cuando se mide con un fotómetro de filtro, en el que la radiación incidente esta incluida en una banda amplia de longitudes de onda, sobretodo si el centro de la banda no coincide con la longitud de onda para la que se mide el sistema con máximo de absorción.

Químicas: Causadas por desplazamientos de un equilibrio químico o físico en el que participan las especies absorbente efecto de PH, hidrólisis etc. ⁽⁵⁾

IV.4.3 LOGARITMO DE TRANSMITANCIA O ABSORBANCIA FRENTE A CONCENTRACIÓN.

La forma matemática de la ley de Lambert– Beer, $- \log T = A = abc$. Muestra que $\log T$ y A son funciones lineales de la concentración. La pendiente “a” por unidad de camino óptico “b” es la absorptividad, característica de la sustancia absorbente a la longitud de onda utilizada para la medida. Diferentes sustancias o la misma sustancia a diferentes longitudes de onda poseen absorptividades diferentes y dan lugar a líneas rectas de diferentes pendientes.

La presentación de $\log T$ frente a la concentración es una línea recta de pendiente negativa, y la representación de “A” frente a la concentración es una línea recta de pendiente positiva que se conoce como *curva de calibración*.

Error relativo de concentración.

Cuando se hace una medida, hay siempre un error asociado. Estos errores pueden involucrar la fuente de radiación, el monocromador, el sistema detector u otra parte del sistema y debido a que son errores indeterminados no son corregibles. Los errores en medidas de intensidad de radiación llevan directamente a errores en las medidas de concentración usando curva de calibración.

Los dos casos a considerar para determinar el error relativo de concentración en las medidas fotométricas son (1) la incertidumbre en la determinación de I , ΔI , es independiente y (2) la incertidumbre para I , ΔI , varia con I a causa del ruido de golpeteo, la variación estadística en el numero de fotones que alcanza el detector. esta ultima es la situación mas común en los fotómetros modernos UV-Vis, que usan tubos foto multiplicadores con baja potencia radiante que incide en el tubo mismo. El primer caso se presenta en



instrumentos más viejos con mayor potencia radiante, donde la foto corriente es directamente proporcional a I, la salida se mide en una escala lineal de I y la incertidumbre en la medida proviene principalmente de la lectura de la escala.

La deducción del error relativo de concentración para el primero de los casos anteriores es la siguiente, suponiendo que el sistema obedece la ley de Beer y reordenando la expresión de esa ley $C=A/ab=(1/ab) \log I_0 / I = - \log T / ab$, derivando esta expresión y utilizando incrementos finitos, tenemos que $\Delta C/C = -0.4343/ab (\Delta I/I)$ o bien $\Delta C/ \Delta T = -0.4343/ T ab$. Reemplazando la cantidad ab por su equivalente de la ley de Beer y reordenando la ecuación se obtiene

$$\Delta C/C = \frac{-0.4343}{A (\Delta I/I)} \quad \text{o bien}$$

$$\Delta C/C = \frac{0.4343}{\log T (\Delta T/T)}$$

$\Delta c/c$ es el error relativo en la concentración que corresponde a ΔT , que es un intervalo determinado de transmitancia; para el valor de $\Delta T = 0.01$ (es decir una diferencia de 1% en transmitancia); puede calcularse el error relativo del análisis $\Delta c/c$ para cualquier valor de T. el error relativo de concentración depende inversamente del producto de la absorbancia y de la potencia radiante transmitida .

$$\Delta C/C = \frac{\Delta T \times 0.4343}{T \log T}$$

El error relativo se utiliza para un determinado error fotométrico graficando $\Delta C/C$ frente abs, el cual nos indica en que rango de intervalo se puede trabajar. ⁽⁵⁾



IV.5 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

La validación de un método requiere diferentes etapas experimentales que van desde la preparación de la muestra, hasta el análisis estadístico de los datos que nos proporcionan los experimentos del método a validar. El analista por lo tanto, debe tener conocimiento sólido de las diversas técnicas estadísticas.

Según las normas de INTERNACIONAL STANDAR ORGANIZATION (ISO) para la acreditación de laboratorios y la guía para su interpretación, elaborada por el grupo de trabajo europeo (EURACHEM // WELAC 1993), la validación de un método analítico consiste en una serie de verificaciones necesarias para asegurar las características de eficiencia del método y demostrar que está científicamente regido bajo las condiciones para las cuales debe ser aplicado. La validación de un método debe establecer que las características de eficiencia del método reúnen las especificaciones relacionada con los objetivos de los resultados analíticos. ⁽⁶⁾

La calidad de los resultados del análisis químico dependerá de la exactitud y la reproductividad en el proceso de medición.

Tipos de validación.

Existen dos tipos de validación.

Validación interna (en el laboratorio): Cuando el proceso se circunscribe al ámbito de un único laboratorio. Se trata del laboratorio que ha desarrollado un nuevo método analítico o bien ha adoptado, con modificaciones más o menos importantes, un método ajeno y lo somete a un cierto grado de validación.

Validación externa (ínter laboratorio): Cuando un método analítico es objeto de interés de diversos laboratorios, la manera más apropiada de llevar a cabo la validación consiste en la realización de un ejercicio de ínter comparación del tipo colaborativo. Es lo que suele denominarse una validación externa.

Validación del Método Colorimétrico de Reflujo Cerrado para la Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en Aguas Residuales.



IV.6 PARAMETROS DE VALIDACION DE UN METODO.

Parámetros de validación que se desarrollan en este método.

1-Linealidad. Es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido.

Para realizar una curva de calibración o linealidad, matemáticamente el número de mediciones mínimo debe ser por lo menos 3, ya que si realizamos solamente 2 siempre será una recta. Pero en realidad la cantidad de mediciones que debemos realizar para hacer una curva tiene que ser en lo posible mayor o igual a 5. Éstas deben estar uniformemente distribuidas a lo largo de un rango de concentración de nuestro interés. El rango de concentración se define como intervalos donde la función de calibración es lineal. Es el intervalo de concentración analítico para determinar el analito en la muestra.

La recta de calibración seguirá la ecuación: $y = a + bx$ (Ecuación 2)

donde b es la pendiente y a la ordenada al origen. Los puntos que caen sobre la recta serán: (x_1, y_1) (x_n, y_n) .

Es importante señalar que estas curvas en realidad tienen que acercarse lo más posible a una recta. Cuanto mayor se acerca la curva a una recta, mejor es la linealidad, es decir, mejor es la calidad de la medición de la curva. ⁽⁷⁾

2- Precisión. Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar relativa. Las medidas de precisión son las siguientes: ⁽⁷⁾

a) Repetibilidad. Precisión esperada bajo las mejores condiciones, a intervalos cortos de tiempo en el mismo día, el mismo laboratorio efectuado por el laboratorio designado con el mismo instrumento. ⁽⁷⁾



b) Precisión intermedia. Grado de dispersión de resultados obtenidos en diferentes tiempo (diferentes días) de ensayos o análisis, efectuado por el mismo operador y el mismo instrumento. ⁽⁷⁾

3- Limite de detección (LD). Es la cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco y_b , más tres veces la desviación estándar del blanco, S_b .

Para determinar el límite de detección se utiliza el siguiente criterio

$$y - y_b = 3 S_b$$

Donde $y_b = a$ intercepto de la pendiente

$$S_b = S_{x/y} \text{ varianza residual}$$

El valor de y en el límite de detección esta dado despejando la ecuación anterior

$$y = y_b + 3 S_b$$

Para determinar el límite de detección a partir de la pendiente (CCN) se hace uso de la ecuación de regresión lineal

$$y = a + bc$$

Despejando la ecuación se obtiene el límite de detección. ⁽⁸⁾

$$C = \frac{y - a}{b} \quad (\text{Ecuación 3})$$

4- Limite de cuantificación. Es la concentración mínima que se puede cuantificar, cuando la razón entre la señal y el ruido es mayor o igual a 10.

Para determinar el límite de cuantificación se hace uso del siguiente criterio

$$y - y_b = 10 S_b$$

Donde $y_b = a$ intercepto de la pendiente

$$S_b = S_{x/y} \text{ varianza residual}$$

El valor de y en el límite de cuantificación esta dado despejando la ecuación anterior

$$y = y_b + 10 S_b$$



Para determinar el límite de cuantificación a partir de la pendiente (CCN) se hace uso de la ecuación de regresión lineal

$$y = a+bc$$

Despejando la ecuación se obtiene el límite de cuantificación. ⁽⁸⁾

$$C = \frac{y - a}{b} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Ambos son importantes en la aplicación de una curva de calibración normal, ya que mediante ellos podemos determinar la capacidad de un proceso de medidas química para cuantificar la sustancia adecuadamente. Estos se calculan mediante el programa de Excel directamente desde la curva de calibración. ⁽⁸⁾

5- Efecto matriz. Las curvas de calibración por adición patrón son utilizadas para minimizar el efecto o interferencia de la matriz en la muestra, los componentes de la matriz pueden provocar un efecto depresor o intensificador de la señal analítica o efecto de matriz. Para minimizar este efecto se utiliza el método de adición patrón en la curva de calibración normal. Esta técnica consiste en preparar una serie de matraces con concentración conocidas y se añade la misma cantidad de muestra para todos. Ejemplo, el primer matraz se le añade un volumen de una solución patrón de concentración conocida C_{standar} , al segundo se aumenta la concentración de la solución patrón y así sucesivamente para todos y a cada uno de ellos se le agrega la misma cantidad de muestra. ⁽⁹⁾

6- Recuperación: Es el cociente entre la cantidad del analito medido y el contenido en la muestra. También puede definirse como la fracción de la cantidad de sustancia agregada a la muestra antes del análisis y la cantidad de sustancia medida en la muestra. ⁽⁷⁾

El porcentaje de recuperación se calcula a partir de la curva de calibración normal y la curva de adición patrón, dividiendo la pendiente de la curva de calibración normal entre la pendiente de la curva de adición patrón y multiplicarla por cien.



$$\%R_c = \frac{b_{CAP}}{b_{CCN}} \times 100 \text{ (Ecuación 5)}$$

DONDE:

b CAP es la pendiente de la Curva de Adición Patrón

b CCN es la pendiente de Curva de Calibración Normal. ⁽⁹⁾



IV.7 HERRAMIENTAS ESTADISTICAS

Las herramientas estadísticas han sido de mucha utilidad en el desarrollo de métodos de análisis. Son fundamentales para el análisis de una serie de datos, estas se seleccionan basadas en lo que se quiere determinar. Para la validación de este método de análisis se aplican para cada parámetro, la herramienta estadística que se describe a continuación:

IV.7.1 Linealidad. Para verificar la linealidad de la recta experimental se hace uso de las siguientes herramientas estadísticas:

Análisis de regresión lineal: En el que se determinan los siguientes parámetros:

a) Coeficiente de correlación: es un índice estadístico que mide la relación lineal entre dos variables cuantitativas “X” y “Y”, es una forma de medir la intensidad de la relación lineal entre dos variables.

| (Ecuación 6)

r puede tomar valores en el intervalo $-1 \leq r \leq +1$. Esto indica que mientras más cercano a la unidad sea el valor del coeficiente de correlación, en cualquier dirección, más fuerte será la asociación lineal entre las dos variables. ⁽⁹⁾

b) Coeficiente de determinación: Una importante medida estadística que nos indica que tanto se ajusta la curva a una línea recta y se calcula elevando el valor obtenido del coeficiente de correlación al cuadrado (r^2) este valor debe ser ≥ 0.995 .

c) Pendiente. Indica la sensibilidad de calibración del método y se expresa en unidades de respuesta sobre unidades de concentración o cantidad del analito, se calcula mediante la ecuación. El valor de la pendiente debe ser 1



$$b_1 = \frac{(x_1 - \bar{x})(y_1 - \bar{y}_1)}{\sum (x_1 - \bar{x})^2} \quad (\text{Ecuación 7})$$

d) Intercepto. Es el estimador que se relaciona con la presencia de interferencias o errores sistemáticos. El intervalo de confianza del intercepto debe incluir al cero para cumplir con el requisito de proporcionalidad en los métodos. ⁽⁹⁾

$$a = \bar{y} - b_1 \bar{x} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Para determinar linealidad no es suficiente calcular el coeficiente de determinación, para reforzar se utiliza otras herramientas como son verificación del modelo lineal y precisión del modelo lineal. ⁽⁹⁾

Verificación del modelo lineal: Consiste en un análisis de Anova de varias curvas de calibración en diferentes días y determinar si el modelo se ajusta a una línea recta mediante la siguiente ecuación: ⁽¹⁰⁾

$$F_c = \frac{MS}{S^2} \quad (\text{Ecuación 9})$$

En la siguiente tabla se muestra como calcular los valores de MS Y S²

Tabla.2

Variación	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática
Modelo de	SSREG= $\sum(\hat{y}_i - y_j)^2$	p-1	MS= SSREG/ p-1
regresión	SSR = $\sum(y_i - \hat{y}_j)^2$	n-p	S ² = SSR/ n-p

Donde SSREG es la suma de cuadrados de regresión y SSR es la suma de cuadrados de residuales y p es el número de días que se realizan las lecturas.

El F_c (F_{calculado}) se compara con el F_(p-1,n-p) (F_{crítico} de Fischer), tabulado de una cola. Si F_c > F_(p-1,n-p), el modelo se ajusta a una línea recta

Precisión del modelo lineal: Muestra la dispersión de la curva de calibración.

Esta consiste en determinar si el modelo de la curva tiene buena precisión y para esto se calcula mediante la ecuación. ⁽⁵⁾



$$\%RSD = \frac{n\sqrt{S^2_{X/Y} + S^2}}{\sum w_i y_i} \quad \text{donde} \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$S^2 = \frac{\sum v_i S_i^2}{\sum v_i}$$

Donde el modelo tiene buena precisión cuando $\%RSD < 5\%$.

IV.7.2 Precisión. Es la medida de dispersión de los resultados analíticos, se utiliza para determinar que similitud existe entre los resultados teóricos y los resultados medidos en el laboratorio. Las medidas de la precisión de un método son:

Repetibilidad. Se considera una medida de la varianza interna y refleja la precisión máxima que se puede obtener en un método cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto. Para evaluar este parámetro se calcula la media, desviación estándar, desviación estándar relativa ($\%CV$) de los resultados del método de ensayo. Se considera una buena repetibilidad cuando $\%CV < 10\%$, además se determina la precisión intermedia que es la comparación entre los resultados obtenidos por el analista que realizó el ensayo. La desviación estándar y la varianza pueden determinarse haciendo uso de una serie de herramientas estadísticas disponibles en Excel aplicables a la quimiometría. ⁽⁹⁾

Desviación estándar relativa: es una medida de dispersión relativa que se obtiene dividiendo la desviación estándar entre la media aritmética de un conjunto de datos. ⁽⁹⁾

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 11})$$

Precisión intermedia: grado de dispersión de los resultados obtenidos en diferente tiempo. Se realiza para determinar si los resultados no varían entre sí en los días en que se realizaron las lecturas y que tanta homogeneidad hay entre los resultados y los estándares o valor real. Se calcula mediante la ecuación: ⁽⁹⁾



$$S_n^2 = \frac{\sum S_j^2}{P}$$
$$\bar{s}_x^2 = \frac{\sum (x_j - \bar{x})^2}{p - 1} \quad (\text{Ecuación 12})$$

Donde p es el número de días que se realizan las lecturas

$$F_C = \frac{S^2_{\text{mayor}}}{S^2_{\text{menor}}} \quad \text{Si} \quad F_{0.95} > F_C \text{ las varianzas son homogéneas}$$

Análisis de varianza (anova): es una herramienta estadística de gran utilidad tanto en la industria como para laboratorios de análisis para el control de métodos analíticos. Anova se aplica para la comparación de múltiples columnas de datos y la estimación de variación en el análisis. La evaluación de la repetibilidad y la precisión intermedia se realiza a través de anova de un factor. El análisis de anova se determina mediante el programa de Excel, es uno de los paquetes estadístico que consiste en analizar un grupo de datos, y determinar la medida de dispersión, donde se compara mediante una prueba de hipótesis si $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabla}}$ las varianzas son homogéneas y no hay diferencia significativa.¹¹ Para realizar el Anova en una hoja de Excel se procede de la siguiente manera: se selecciona la barra herramienta en el momento se abre un cuadro que dice análisis de datos- funciones para análisis, se selecciona la frase que dice análisis de anova de un factor se sombrean los dato y se da clic en aceptar de manera rápida se obtienen los resultados.⁽¹¹⁾



V. PARTE EXPERIMENTAL

V.1 REACTIVOS Y MATERIALES.

EQUIPOS

Espectrofotómetro UV/VIS. Perkin Elmer Lambda 15.

Balanza analítica - Ohaus

Horno - Heraeus.

Desecador

MATERIALES

Bureta de 10 mL, 25 mL.

Pipeta pauster.

Balón aforado de 100 mL, 25 mL, 250 mL.

Balones aforados de 500 mL

Beaker de 100 mL y 500 mL.

Probeta de 250 mL y de 50 mL.

Espátula.

Vidrio reloj.

Agitador de vidrio

Pizeta.

Pipeta volumétrica de 20 mL.

Pipeta serológica de 5 mL

Vaso ámbar

Vialescon capacidad de 25 mL

Desecador de vidrio.



V.2 REACTIVOS:

-Hidróxido de potasio (KOH) material certificado (certificado de análisis de parte real) FISHER
Con un ensayo analítico de 99.7% , oxidación de sustancias sólidas.

-Cromato de potasio (K_2CrO_4) material certificado (certificado de análisis de parte real) FISHER
Grado de pureza 100.1%

-Ftalato ácido de potasio ($HOOC_6H_4COOK$) estándar acidimetrítico FISHER
Grado de pureza 100.01%

-Dicromato de potasio (K_2CrO_7) material certificado (certificado de análisis de parte real) finos cristales
FISHER
Grado de pureza 98.8%

-Sulfato de plata (Ag_2SO_4) material certificado (certificado de análisis de parte real) FISHER
Grado analítico 99.8%

-Acido sulfúrico (H_2SO_4) material certificado (certificado de análisis de parte real) FISHER
Grado analítico 95.5% y gravedad específica de 1.8 g/l

-Sulfato de mercurio ($HgSO_4$) material certificado (certificado de análisis de parte real) FISHER
Grado analítico de 99.0%



V.3 PROCEDIMIENTO.

V.3.1 LIMPIEZA DE CRISTALERÍA:

Antes de iniciar un análisis en el laboratorio, es necesario que el material volumétrico a utilizarse estén perfectamente limpios, debido que los restos de otros productos pueden provocar errores en la determinación del analito. El lavado de la cristalería dependerá del análisis que se va a utilizar; en el método colorimétrico de reflujo cerrado para la DQO, se ha aplicado el siguiente procedimiento de limpieza, con el propósito de garantizar la ausencia de posibles interferencias que puedan alterar el resultado:

Primeramente se somete a lavado con solución etanólica de hidróxido de potasio (KOH), durante un periodo de 3 h, luego se enjuaga con abundante agua del grifo, (el material de vidrio esta perfectamente limpio cuando no quedan gotas adheridas a su superficie y los liquido resbalan perfectamente por las paredes con lo que el material parece seco) si esto no ocurre, se deja más tiempo.

A continuación se sumerge en solución jabonosa libre de silicato y fosfato durante un periodo de 30min y seguidamente se enjuaga con abundante agua del grifo, agua destilada (tres veces) y agua desionizada (tres veces), seguidamente se sumerge en solución ácida de H_2SO_4 al 20% durante un periodo de 1h enjugando luego con agua destilada (tres veces) y agua desionizada (tres veces). El material se coloca en la estufa a una temperatura de $120^{\circ}C$ por 2h, para terminar de eliminar algunas posibles impurezas que hayan quedado y para secar. Toda la cristalería se mantiene tapada hasta el momento de su uso.

Nota:

Los materiales de contener (balones aforado) y de vertido (pipetas, buretas) no se someten a calentamiento debido que la expansión de el material de vidrio por el calor puede ser irreversible causando alteraciones en la calibración de dicho material. Si, debe asegurarse que esté perfectamente seco y para este fin es imprescindible acelerar el proceso de secado rápido enjugando con disolventes orgánicos como alcohol etílico y acetona.



V.3.2 TOMA Y CONSERVACION DE LAS MUESTRAS

- ♦ Se recolectaron las muestras en botellas de vidrio. El uso de envases de plásticos es permisible si se asegura la ausencia de contaminantes orgánicos.
- ♦ Si la muestra tiene materia orgánica biológicamente activa, el análisis debe realizarse inmediatamente, aunque preservada a $\text{pH} \leq 2$ por adición de H_2SO_4 concentrado (generalmente 2 mL de H_2SO_4 Conc. / L de muestra), puede analizarse hasta 7 días después.
- ♦ La muestra que contenga sólidos sedimentables debe mezclarse con un homogenizador para obtener una muestra representativa.
- ♦ En el análisis de aguas residuales con alta Demanda Química de Oxígeno deben hacerse diluciones preliminares, para reducir el error inherente en la medida de pequeños volúmenes de muestra. ⁽³⁾

V.3.3 PREPARACION DE SOLUCION.

Solución de hidróxido de potasio 0.05N.

Se pesan 0.70 gramos de Hidróxido de potasio y se afora a 250 mL con agua destilada.

Solución de cromato de potasio 40ppm.

Se pesan 4 mg de Cromato de potasio y se afora a 100 mL con solución de hidróxido de potasio 0.05N.

Solución patrón ftalato ácido de potasio 2000 mg O₂/L.

Se tritura Ftalato ácido de potasio de calidad para reactivos estándar primario y luego seque a 120 °C durante dos horas. Disuélvanse 425 mg en agua destilada y dilúyase hasta 250 mL.

Solucion de sulfato de plata en medio ácido.

Añadir 5.5 gramos de sulfato de plata calidad para reactivos a 543 mL de ácido sulfúrico concentrado, reposar de uno a dos días para disolver el sulfato de plata almacenar en vaso ámbar.

**Solución de digestión.**

Añadir a unos 250 mL de agua destilada 5.011 gramos de dicromato de potasio, de calidad para reactivos estándar primario, previamente secado a 103 °C durante dos horas, agregar 83.5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 16.65 gramos de sulfato de mercurio disolver y enfriar a temperatura ambiente y diluir con agua destilada a 500 mL.

Solución de ácido sulfúrico al 20%

A un volumen de 250 mL de agua destilada adicionar 100 mL de ácido sulfúrico, homogenizar enfriar a temperatura ambiente y aforar a 500 mL con agua destilada

V.3.4 CALIBRACION DEL ESPECTROFOTOMETRO UV/V PERKIN ELMER LAMBDA 15.**V.3.4.1 DETERMINACIÓN DEL ERROR FOTOMÉTRICO DEL EQUIPO.**

El error fotométrico se calcula para evaluar la dispersión de las lecturas en el equipo. Con una solución de cromato de potasio 40 ppm en hidróxido de potasio 0.05N, se hace un barrido espectral en el rango de 336 nm – 394 nm para determinar la longitud de onda en la cual se presenta la máxima absorción. A la longitud de onda de máxima de absorbancia, se realizan 30 mediciones de Transmitancia; con las lecturas obtenidas se realizan los cálculos y gráficos necesarios para evaluar el error fotométrico del equipo en las condiciones de uso. ⁽⁵⁾

V.3.5 DETERMINACIÓN DEL ERROR RELATIVO DE CONCENTRACIÓN Y SELECCION DE LA LONGITUD DE ONDA ANALITICA DEL MÉTODO

(Método Colorimétrico de Reflujo Cerrado)

Utilizando un estándar de 800 mg O₂/L preparado como se detalla en la tabla.1, se realiza un barrido espectral en un intervalo de longitud de onda de 575 a 635nm; determinada la longitud de onda de máxima absorción se procede a medir en esta longitud de onda 30 lecturas de transmitancia, para determinar el error fotométrico del método. ⁽⁵⁾



V.3.6 DESARROLLO DEL MÉTODO (Método Colorimétrico de Reflujo Cerrado)

V.3.6.1 PREPARACIÓN DE PATRONES.

Para elaborar la curva de calibración, se parte de un estándar primario de ftalato ácido de potasio preparado en el laboratorio a una concentración de 2000 mgO₂/L, a partir de la cual se preparan 6 patrones en un intervalo de concentración entre 100 y 900 mgO₂/L.

Tabla 3: parte A.

Nº de matraces	B _{frio}	B _{caliente}	1	2	3	4	5	6
Solución patrón de C ₈ H ₅ O ₄ K 2000 mgO ₂ /L (mL).	0	0	1.25	2.50	5.00	7.50	10.00	11.25
Agua destilada (mL)	25.00	25.00	23.75	22.5	20.00	17.50	15.00	13.75
Concentración en mgO ₂ /L del estándar después de aforar a 25.0 mL.	0	0	100	200	400	600	800	900

V.3.6.2. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRADO.

- Antes de todo se inspeccionan los viales a usar para garantizar que no existan grietas en los tapones.
- Para la elaboración de la curva de calibración, se toman 5 mL cada una de las soluciones preparadas en la tabla 1, se colocan en un vial para luego adicionar la solución de digestión. Seguidamente, con mucho cuidado se vierte el ácido sulfúrico por debajo de la solución de manera que se forme una capa de ácido debajo de la capa de digestión. Se recubre con teflón la boca del vial y se cierra bien la tapa, se invierten varias veces cada una de los viales para mezclar completamente. Posteriormente se colocan en el horno a 150 °C durante un periodo de 2 horas. Finalmente se dejan enfriar los estándares y los blancos.



Un color verde debido a la formación de cromo III, se desarrolla durante la etapa de digestión. Las lecturas de absorbancia se realizan en el espectrofotómetro a 600 nm para luego con los datos obtenidos, construir la curva de calibración.

Tabla 3: parte B

N° de matraces	B _{frío}	B _{caliente}	1	2	3	4	5	6
Concentración en mgO ₂ /L del estándar después de aforar a 25.0 mL.	0	0	100	200	400	600	800	900
Se toman 5ml de cada estándar.	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Solución de digestión(mL)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Reactivo de ácido sulfúrico Ag ₂ SO ₄ / H ₂ SO ₄ .	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
Etapa de Digestión (150°C) durante 2 horas	El blanco caliente y los seis estándares							

El dicromato al oxidar la materia orgánica cambia de cromo hexavalente (VI) al estado trivalente (III). Esas dos formas químicas del cromo son coloreadas y absorben en la región visible del espectro. El dicromato Cr₂O₇²⁻ (color naranja) absorbe fuertemente a 400nm donde el ion de cromo (Cr³⁺) absorbe muy poco. El ion cromo Cr³⁺ (color verde) absorbe fuertemente a 600nm donde el dicromato casi no absorbe.⁽³⁾



V.3.6.3 REPETIBILIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN NORMAL

Se realizaron 4 replicas de la curva de calibración durante una semana, con las mismas condiciones de trabajo. Este proceso se efectuó para evaluar si existe consistencia en los resultados entre los diferentes días en que se prepararon las curvas de calibración normal. Si los resultados reflejados nos demuestran que hay consistencia entre ellas, basta preparar la curva de calibración una sola vez y hacer uso de ella durante una semana. La estabilidad de la curva por un tiempo más prolongado tendría que ser verificado en la práctica. Este proceso se determina con las herramientas estadísticas aplicadas.

V.3.6.4. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Para determinar la precisión del método se determino la repetibilidad y la reproducibilidad. Se seleccionaron tres concentraciones conocidas que están dentro del rango de las Curva de Calibración Normal 100, 400 y 900 mgO₂/L, a las que se realizaron cinco replicas de en cinco días diferentes a cada uno de ellos y determinar la precisión del método de determinación de la DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO, la que se evaluó a través de la desviación típica relativa (CV%) para los tres niveles de concentración en condiciones de repetibilidad; a demás el análisis de anova de un factor.



V.3.7 CURVA DE CALIBRACIÓN POR ADICIÓN PATRÓN

La técnica de adición patrón es útil cuando no se conoce la composición de la matriz de la muestra o cuando es difícil reproducirlas en soluciones patrones sintéticos.

La curva de calibración por adición patrón se prepara de forma que todos los patrones contengan la muestra en la misma cantidad. El primer punto de la curva de calibrado es una disolución de muestra a la que no se le ha añadido patrón y por tanto contienen la cantidad de analito original de la muestra. La concentración del analito en la muestra se puede calcular como $X = a/b$, esto es la concentración de analito en la muestra es igual a la razón entre la ordenada en el origen y la pendiente.

En este caso las curvas de calibración se prepararon de forma que todos los patrones con tenían 10mL de la muestra y volúmenes crecientes de estándares de ftalato ácido de potasio aforado luego a un volumen de 25mL. ⁽⁵⁾

Tabla 4. Parte A

No de matraces	B _{frío}	B _{caliente}	Muestra	1	2	3	4	5	6
Solución patrón de C ₈ H ₅ O ₄ K 2000 mg O ₂ /L (mL).	0	0	0	1.25	2.50	5.00	7.50	10.00	11.25
Muestra (mL)	0	0	10	10	10	10	10	10	10
Agua destilada (mL)	25.00	25.00	15.0	13.75	12.5	10.0	7.50	5.00	3.75
Concentración en mgO ₂ /L del estándar después de aforar a 25.0 mL.	0	0	0	100	200	400	600	800	900



Tabla. 4. parte B

V.3.7.1 REPETIBILIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN POR ADICIÓN PATRÓN.

A igual que las curvas de Calibración Normal se realizaron replicas en las curvas de adición patrón (3 curvas en días diferentes) para evaluar la homogeneidad de las varianzas aplicando el análisis de anova de un factor, y se determino el efecto de matriz este efecto se utiliza el método de adición patrón en la curva de calibración normal el que se determina mediante la comparación de pendiente entre las dos curvas, estas se prepararon en las mismas condiciones.



VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

VI.1 CALIBRACION DEL EQUIPO. (ESPECTROFOTOMETRO UV/VIS, PERKIN-ELMER LAMBDA 15).

Según lo establece la literatura, una solución de cromato de potasio de 40ppm en hidróxido de potasio 0.05N presenta un pico de absorción máximo en 375nm con una absorción de 0.991. Después de realizar un barrido espectral en un intervalo de longitud de onda 336nm – 394nm con la solución de dicromato de potasio 40ppm, se observó un máximo en 372 nm con absorción de 1.744, (ver anexo fig.3), esta respuesta superior al valor teórico nos muestra que el equipo presenta señales con valores superiores al realizar medidas de absorbancia y que la longitud de onda óptima presenta una diferencia de 2nm. Los resultados obtenidos se puede atribuir a características propias del equipo como es el ancho de bandas espectrales para el slit con el que opera el monocromador, además este equipo es de doble haz lo que significa que se utilizan dos celdas que no son idénticas y esto hace que existan pequeñas diferencias óptimas entre las mismas.

VI.2 DETERMINACIÓN DEL ERROR FOTOMÉTRICO DEL EQUIPO.

Con la misma solución de dicromato de potasio de 40ppm en hidróxido de potasio 0.05N, se realizaron 30 lecturas de transmitancia, a 372 nm; seguidamente se calcula la desviación estándar de las 30 mediciones y el error fotométrico del equipo. (Ver anexo tabla.19).

Se utiliza la ecuación:

$$\frac{\Delta C}{C} = \frac{\Delta T \cdot 0.04343}{T \log T} \quad (\text{ecuación N}^\circ 1)$$

Donde: $\frac{\Delta C}{C}$ = error relativo de concentración

$\Delta T = 2S$ (dos veces la desviación estándar de las 30 lecturas de transmitancia)

T = valores de transmitancia teóricos



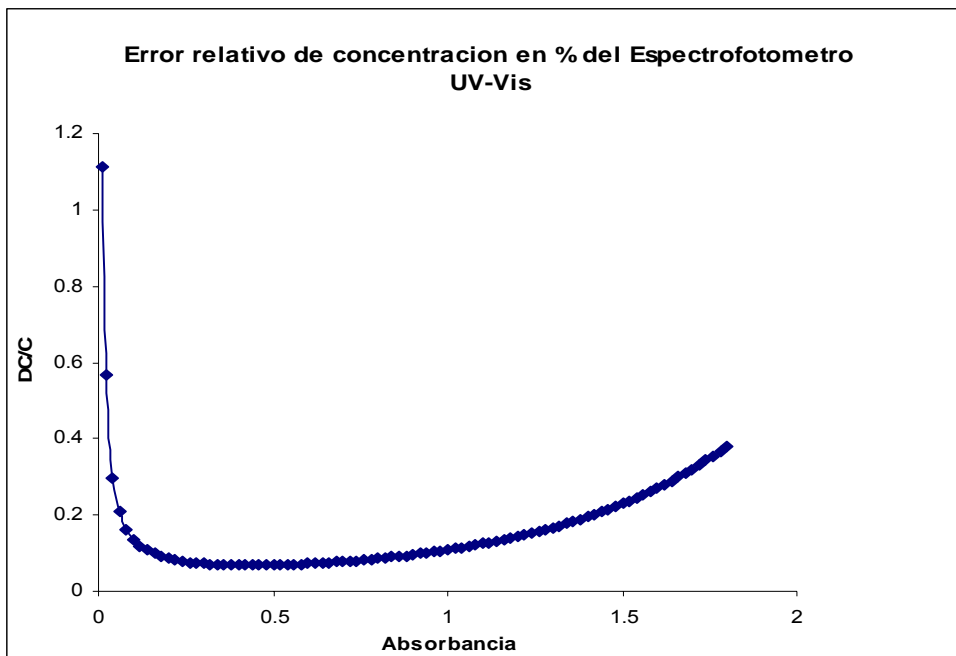
Tabla.5 valores de la desviación estándar de las 30 lecturas de T

Equipo	S	ΔT
Espectrofotómetro UV/VIS Perkin-Elmer	0.012514	0.025028

Introduciendo el valor encontrado de ΔT y variando la absorbancia en un intervalo de 0.01 a 1.80 se obtiene la grafica correspondiente al error fotométrico, figura 1 se puede observar que en un intervalo de absorbancia de 0.08 – 1.4 el error relativo es menor del 0.2 %. A valores de absorbancia en los extremos de estos intervalos el porcentaje del error relativo aumenta. El valor mínimo de error relativo se registra para un valor de absorbancia de 0.44. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir que el instrumento Perkin Elmer Lambda 15 puede ser utilizado para los fines propuestos.

Fig.1

Error fotométrico medido en el espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda – 15 Con una solución de 40ppm de cromato de potasio en hidróxido de potasio 0.05N $\lambda = 372\text{nm}$.





VI.3 ERROR RELATIVO DE CONCENTRACIÓN: MÉTODO COLORIMÉTRICO DE REFLUJO CERRADO PARA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO.

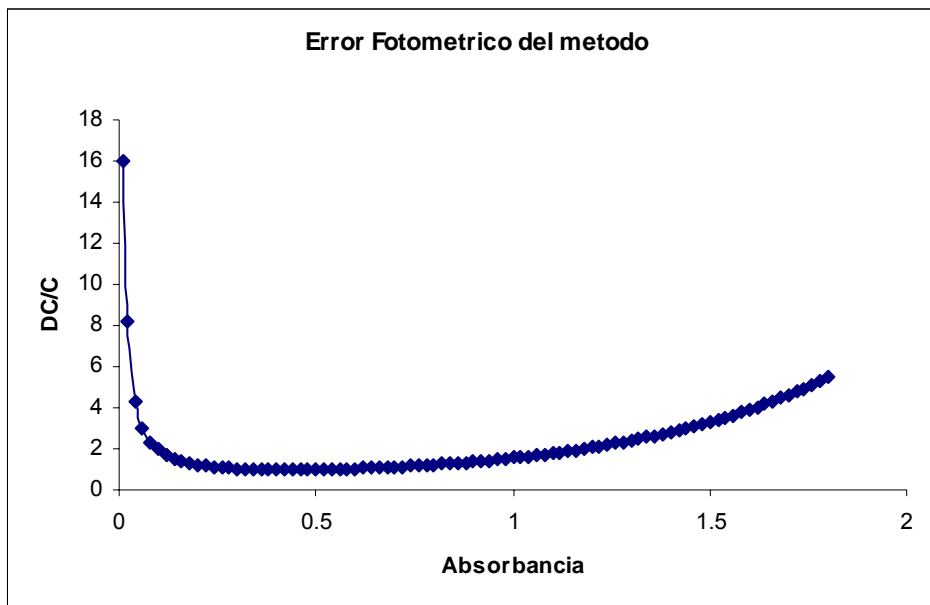
Un estándar de ftalato ácido de potasio 800 ppm se sometió a todo el procedimiento detallado en la tabla No 3; con la solución resultante se realizó un barrido espectral entre 575 a 635nm, encontrando una longitud de onda óptima experimental de 600 nm (ver en anexo figura.4). Fijando en el equipo esta longitud de onda, se realizaron 30 lecturas de transmitancia y se aplicó la ecuación (1) para determinar el error fotométrico del método.

De acuerdo a los resultados obtenidos encontramos que para valores de absorbancia en un intervalo 0.1-1.16 el error relativo de concentración es menor del 2%. (Ver anexo tabla 22).

Las desviaciones estándares del equipo para el método se calcularon para evaluar la dispersión de las lecturas.

Fig.2

Error fotométrico del método Colorimétrico de reflujo cerrado. Las lecturas se realizaron con un estándar de 800ppm (ftalato ácido de potasio) a una longitud de onda de 600nm.





VI.4 CURVAS DE CALIBRACION NORMAL (CCN)

A las 4 replicas de las curvas de calibración se le aplicaron las herramientas estadísticas apropiadas y que se detallan a continuación.

V.4.1 ANÁLISIS DE REGRESIÓN SIMPLE: se aplico este modelo para encontrar el intercepto, pendiente y el coeficiente de determinación para cada curva de calibración normal. En la tabla (23) se muestra la relación absorbancia vs. Concentración de cada curva de calibración normal.

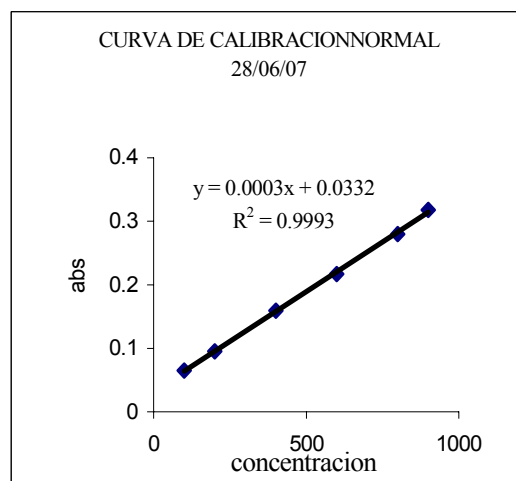
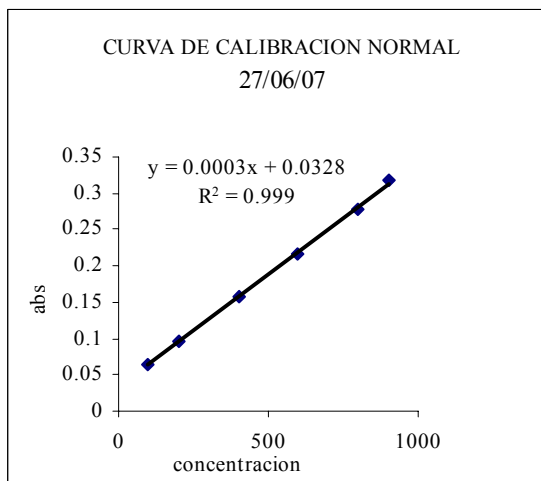
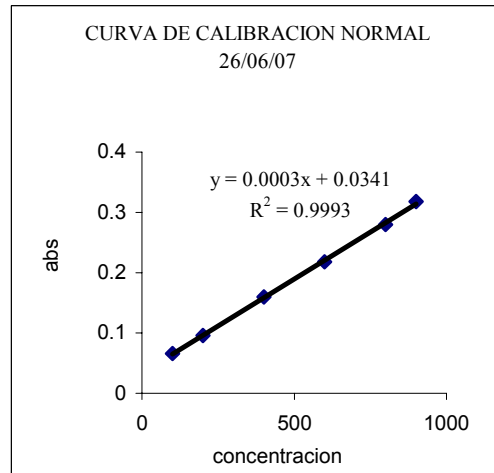
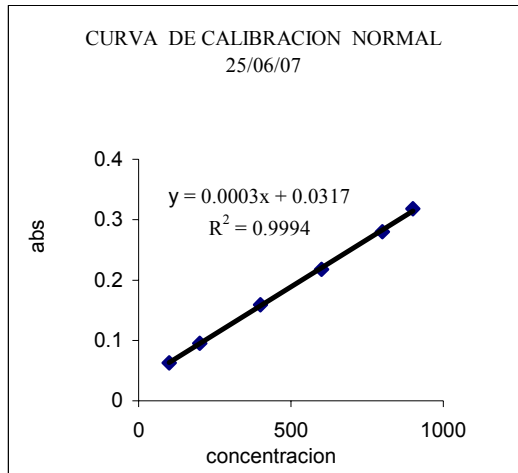
Tabla .6: parámetros de regresión lineal para cada curva de calibración.

Fechas de prep. CCN	Pendiente	Intercepto	Coefficiente de determinación (r^2)
25/06/2007	0.00031423	0.03171795	0.99942529
26/06/2007	0.0003125	0.03275	0.999276
27/06/2007	0.0003123	0.03284	0.999001
28/06/2007	0.0003111	0.03408	0.999312

Se puede decir que las curvas de calibración preparadas en días diferentes presentaron un coeficiente de determinación r^2 por encima de 0.999, obteniendo una excelente linealidad.



Curvas de Calibración Normal





VI.4.2 VERIFICACION DEL AJUSTE LINEAL

Para evaluar la validez del modelo lineal, se aplicó el análisis de ANOVA, que consiste en verificar si el modelo se ajusta a una línea recta en los diferentes días en que se realizaron las lecturas mediante la ecuación (9).

Tabla.7 Resultado de ANOVA.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	varianzas	Fc	F _{0,95}
Regresión	1	0.05065	0.05065	4712	10.1
Residual	4	4.2993E-5	1.07482E-5		
Total	5	0.050692			

El la tabla se muestran los resultados obtenidos del análisis de anova que se aplicó a las curvas de calibración normal para determinar si el modelo es lineal, mediante $F_{\text{Calculado}}$ y $F_{0,95}$ donde si $F_c > F_{\text{tabla}}$ el modelo se ajusta a una línea recta y de acuerdo a los valores obtenidos se puede decir que el modelo es lineal.

V.4.3 PRECISION DEL MODELO LINEAL.



Para determinar la precisión del modelo lineal se utiliza la ecuación (10) mediante la cual se calcula RSD% obteniendo como resultado un valor $RSD\%_{\text{global}} \text{ calculado} = 0.5568$, este resultado demuestra que el modelo presenta buena precisión ya que es menor del 5% en el rango de (100-900 mgO₂/L) de las curvas de calibración normal.

De acuerdo a los resultados obtenidos las curvas de calibración normal presentan buena linealidad y por tanto se realizó una curva promedio de las cuatro curvas de calibración realizadas en una semana.

VI.5 LÍMITE DE DETECCIÓN.

El límite de detección se calculó a partir de la curva promedio de las cuatro curvas de calibración mediante la ecuación (3). El LD calculado fue de 29.21 mg O₂/L.

VI.6 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

Para determinar el límite de cuantificación en el promedio de las 4 curvas de calibración se utilizó la ecuación (4). El LC calculado fue de 97.39 mg O₂/L.

VI.7 REPETIBILIDAD

V.7.1 COMPARACION DE VARIANZAS.

Para conocer el grado de concordancia entre los resultados obtenidos aplicando el método repetidas veces, bajo las mismas condiciones, se midieron tres patrones de concentraciones de 100ppm, 400ppm y 900ppm en 5 días diferentes. Estas concentraciones fueron calculadas haciendo uso de los parámetros de regresión de la curva de calibración promedio.

Tabla. 8: Valores de repetibilidad del patrón 1 (100ppm ftalato ácido de potasio)



Replicas	Primer día	Segundo día	tercer día	cuarto día	quinto día
1	99,7	96,4	99,7	99,7	103,0
2	99,7	99,7	99,7	96,4	103,0
3	99,7	99,7	99,7	96,4	99,7
4	99,7	99,7	99,7	99,7	103,0
5	96,4	96,4	96,4	99,7	99,7
Media	99,1	98,4	99,1	98,4	101,7
S	1,46	1,79	1,46	1,79	1,79
S ²	2,14	3,22	2,14	3,22	3,22
%C.V	1,47	1,82	1,47	1,82	1,76
Repetibilidad	2.788				
Precision intermedia	1.293				

Tabla.9: Valores de repetibilidad del patrón 2 (400ppm ftalato ácido de potasio)

Replicas	Primer día	segundo día	tercer día	cuarto día	quinto día
1	404,6	401,3	401,3	401,3	398,0
2	404,6	401,3	401,3	401,3	401,3
3	404,6	401,3	404,6	401,3	401,3
4	404,6	401,3	404,6	404,6	401,3
5	407,9	404,6	404,6	404,6	404,6
Medias	405,2	402,0	403,6	402,6	401,3
S	1,46	1,46	1,79	1,79	2,31
S ²	2,14	2,14	3,22	3,22	5,37
%C.V	0,361	0,364	0,445	0,445	0,577
Repetibilidad	1.077				
Precision intermedia	1.519				

Tabla. 10: Valores de repetibilidad del patrón 3 (900ppm ftalato ácido de potasio)

Replicas	Primer día	segundo día	tercer día	cuarto día	Quinto día
1	906,8	903,6	903,6	903,6	903,6
2	906,8	906,8	906,8	903,6	903,6
3	906,8	906,8	906,8	903,6	903,6
4	906,8	906,8	903,6	903,6	906,8
5	910,0	906,8	903,6	906,8	906,8
Medias	907,4	906,2	904,9	904,2	904,9
S	1,44	1,29	1,76	1,44	1,76
S ²	2,08	2,08	3,12	2,08	3,12
% C.V	0,158	0,142	0,195	0,159	0,195



Repetibilidad	1.240
Precisión intermedia	1.275

Para evaluar la homogeneidad de las varianzas se utilizó el test de Bartlett. Este método consiste en comparar las varianzas entre M calculado por Bartlett y la “Chi- cuadrada” de la tabla estadística (X^2). El valor de M encontrado para cada uno de los estándares se muestra a continuación.

Estándar de 100ppm. el valor de $M = 0.3420$ que comparado con la “Chi- cuadrada” X^2 al 95% de nivel de confianza es 9.49.

Estándar de 400ppm el valor de $M = 1.5$ que comparado con la “Chi- cuadrada” X^2 al 95% de nivel de confianza es 9.49.

Estándar de 100ppm el valor de $M = 0.366$ que comparado con la “Chi- cuadrada” X^2 al 95% de nivel de confianza es 9.49.

Los resultados obtenidos en la comparación de las varianzas del grupo de resultado de cada uno de las concentraciones se encontró que al compararse el M calculado con el Chi-cuadrado de la tabla es menor y por tanto las varianzas son homogéneas y no existen diferencia significativa entre los días que se realizaron las lecturas.

Se utilizó otra herramienta estadística como el análisis de Anova para comparar las varianzas el cual se utiliza para comparar un grupo de resultado. A continuación se muestran los resultados obtenidos del análisis de Anova.

Es importante comparar las medias entre los días, puesto que la concentración utilizada es la misma y no debe haber diferencia significativas entre ellas. Para esto fue necesario aplicar el análisis ANOVA de un factor para encontrar $F_{\text{calculado}}$ y compararlo con el valor de la F_{tab} . Los que se muestran a continuación.

Patrón de 100ppm

$$F_c = 3.3079 \text{ y } F_t = 4.4307$$

Patrón de 400ppm

$$F_c = 3.5418 \text{ y } F_t = 4.4307$$



Patrón de 900ppm

$F_c = 3.0833$ y $F_t = 4.4307$

Basado en los resultados obtenidos en cada uno de los patrones se encontró que el $F_t > F_c$. por tanto las medias no difieren significativamente entre los días que se realizaron las lecturas para un nivel de confianza del 99.5%.

VI.7.2 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Este se evaluó a través de la repetibilidad expresada como desviación típica relativa (%C.V) para los tres niveles de concentración que están dentro del intervalo considerado. Como se aprecia, el %C.V obtenidos para los tres niveles de concentración, es menor que lo permitido como límite para métodos Espectrofotométrico (<10%) demostrando que el método tiene una buena repetibilidad para las condiciones establecidas de trabajo.

Tabla.11: Resultado del estudio de la precisión del método de determinación de Demanda Química de Oxígeno y resultados de la concentración medida de los tres estándares de ftalato acido de potasio en el rango de la curva de calibración normal; los resultados obtenidos presentan pequeña diferencia entre el valor teóricos y el valor encontrado de cada uno de los estándares esto surge de los errores sistemáticos característico del laboratorio conocido como sesgo los valores se presentan en la tabla.

Concentración Teórica(mg/L)	Media (mg/L) (concentración medida)	Desviación estándar (s)	Desviación típica relativa (%C.V)	Sesgo
-----------------------------	-------------------------------------	-------------------------	-----------------------------------	-------



100	99,3	1,966	1,979	-0.7
400	402,9	2,1	0,5314	2.9
900	905,5	1,8	0,2056	5.5

Otra forma de comparar las varianzas es mediante la precisión intermedia representada por la varianzas de los promedios S_x^2 para 4 grados de libertad y se comparó con el promedio de las varianzas por días (s^2). Este procedimiento se realizó para los estándares de 100, 400 y 900 ppm. Obteniéndose un $F_{\text{calculado}}$ para cada estándar $F_{c100}=2.156$, $F_{c400}=1.41$, $F_{c900}=1.028$ que al compararse con el $F_{0.95} = 9.605$, se deduce que no hay diferencia significativa en ninguno de los tres casos y por tanto hay consistencia en las varianzas.

La comparación de varianzas se determinó a través de dos herramientas estadísticas diferentes por análisis de anova y test de Bartlett obteniendo el mismo resultado, que no existe diferencia significativa entre las varianzas.

VI.8 CURVAS DE CALIBRACIÓN POR ADICIÓN PATRÓN (CCAP)

VI.8.1 LINEALIDAD. Se prepararon tres curvas de adición patrón a las que se les aplicó el mismo procedimiento de las Curvas de Calibración Normal para evaluar la consistencia de los resultados entre ellas, en la tabla (24) se encuentran los valores de absorbancia frente a concentración.

Tabla.12

Fecha lecturas de CCAP	Pendiente	Intercepto	Coefficiente de determinación
------------------------	-----------	------------	-------------------------------

Validación del Método Colorimétrico de Reflujo Cerrado para la Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en Aguas Residuales.



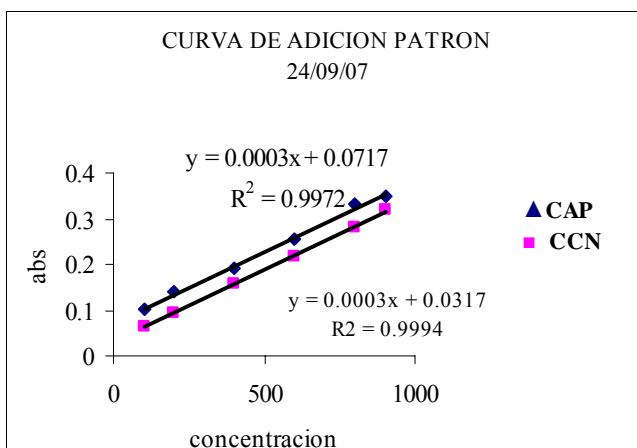
24/09/07	0.000313654	0.07167308	0.99725995
25/09/07	0.00030865	0.07450641	0.99706367
26/09/07	0.00030865	0.07550641	0.99734470.

En la tabla se muestran los valores del coeficiente de determinación los que tienen un valor de $r^2 > 0.995$ demostrando así que existe buena linealidad en las curvas de Adición Patrón realizadas en días diferentes.

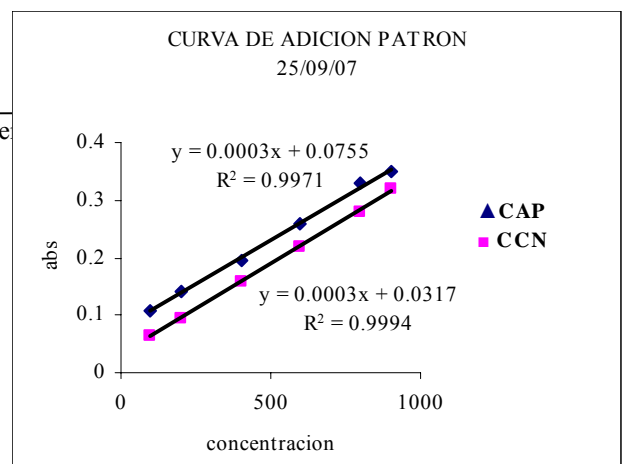
VI.9 EFECTO MATRIZ: COMPARACIÓN DE LAS PENDIENTES DE LA CURVA DE ADICIÓN PATRÓN CON UNA CURVA DE CALIBRACION NORMAL.

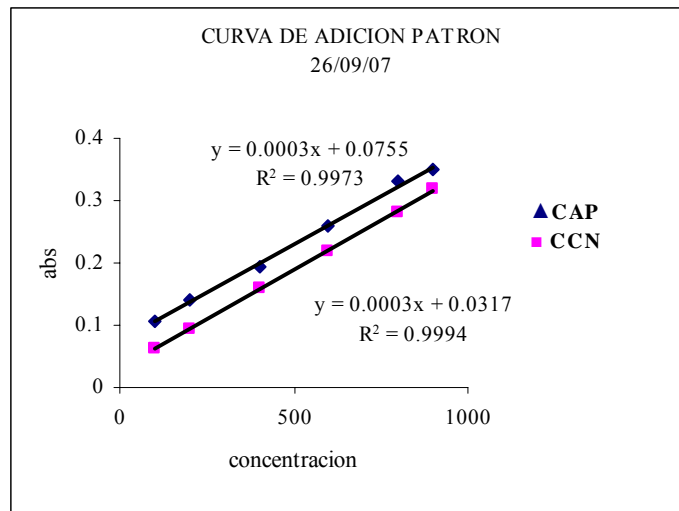
Los componentes de la matriz pueden provocar un efecto depresor o intensificador de la señal analítica, conocido como efecto matriz. Para determinar el efecto matriz se realizó una curva de adición patrón en tres días diferentes.

CURVA DE ADICION PATRON



para la Dete





En las graficas de las curvas de adición patrón se observa que existe consistencia entre ellas en los días que se realizaron; por tanto se realizó una curva promedio de las tres para determinar el efecto de matriz en la muestra de agua residual

Para verificar el este efecto de matriz se comparó la curva de calibración promedio por adición patrón con la curva de calibración normal promedio a través de un test de comparación de pendientes.

En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos tanto con la prueba de Fisher, como con el test T-Student. Para Fischer $F_c < F_{0.975}$, por lo tanto se puede decir que las varianzas son homogéneas; para T-Studente $T_c < T_{0.975}$ lo que significa que las pendientes son iguales.

Tabla.13



Parámetro	Adición patrón (CAP)	Calibración normal (CCN)
Pendientes(b)	3.10E-4	3.11E-4
Des.Est.(Sb)	4.923E-6	1.844E-6
Var. Residual (S ² x/y)	5.26E-5	7.38E-6

Tabla.14

$F_c = \frac{S^2_{x/y}^{(AP)}}{S^2_{x/y}^{(CCN)}}$	5.725	$F_{0.975} = 7.146$ varianzas homogéneas
$t_c = \frac{b^{AP} - b^{CCN}}{\sqrt{{}^{AP}S_b^2 + {}^{CCN}S_b^2}}$	1.864E-3	$T_{0.975} = 2.571$ pendientes iguales

De acuerdo a los resultados que se muestran en la tabla 14 demuestran que no existen diferencia significativa entre las pendientes de la curva de calibración normal y curva de adición patrón. Lo que demuestran que no existe efecto de matriz para esa muestra.

En la siguiente tabla se muestran el valor de las pendientes de curvas de adición patrón y la curva promedio de calibración normal con sus intervalos de confianza, se compararon los valores de las pendientes de cada una de ellas entre si y no se observa dispersión entre los resultados por tanto decimos que las pendientes son homogéneas.

Tabla.15

Curva de calibrado	Valor de pendiente	μ en el valor de pendiente	Intervalo de confianza	
			Limite superior	limite inferior
Calibración Normal	3.1192E-4	± 1.16E-5	3.235E-4	3.003E-4



Adición patrón	3.1006E-4	$\pm 1.97E -5$	3.297E-4	2.903E-4
----------------	-----------	----------------	----------	----------

VI.10 ESTIMACION DE RECUPERACION.

El porcentaje de recuperación se determino a partir de la curva promedio de calibración normal y la curva de adición patrón y se calcula mediante la ecuación (11)

$$0.00031006$$



$$\% Rc = \frac{\quad}{0.00031192} \times 100$$

Obteniendo $\% Rc = 99.40 \%$

De acuerdo al valor obtenido el método presenta un buen rendimiento ya que esta dentro del rango establecido de trabajo que es de 80 a 120 según la literatura.

Para obtener el intervalo de confianza de la recuperación se hace uso de la incertidumbre asociada, la cual es calculada como sigue:

$$\text{Incertidumbre asociada es: } \sqrt{\left[\frac{S^2_{b1CAP}}{n_{CAP} b^2_{1CAP}} \right] + \left[\frac{S^2_{b1CCN}}{n_{CCN} b^2_{1CCN}} \right]} \times 100$$

$$(\mu\%R) = 0.01587 \times 100$$

$$(\mu\%R) = 1.587$$

El intervalo de confianza es:

$$Rc \pm 2 \mu (Rc)$$

$$99.40 \pm 2(1.587)$$

$$(99.40 \pm 3.174) \text{ mg O}_2/\text{L}$$

VI.11 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LA MUESTRA POR CURVA DE ADICION PATRON Y CURVA DE CALIBRACION NORMAL.

Se calculó la concentración de la muestra utilizando las tres réplicas de la curva de adición patrón. El resultado obtenido fue comparado con el valor de la concentración de la muestra obtenido a partir de la curva de calibración (CCN).



Ejemplificaremos el procedimiento del cálculo para la muestra.

Determinación de la concentración a partir de curva de adición patrón.

Ecuación.

$$\text{Sea } Y = a + b * C_m$$

Donde los valores del intercepto y la pendiente de la curva de adición patrón son:

$$a = 0.0740$$

$$b = 3.10 \text{ E} - 4$$

Por lo tanto la ecuación de la curva de adición patrón es:

$$Y = 0.074 + 3.10 \text{ E} - 4 * C_m$$

Para calcular la concentración de la muestra a partir de la curva de adición patrón haciendo $Y=0$ la concentración de la muestra sería.

$$C_m = \frac{a}{b} * fd \quad \text{fd es (factor de dilución)}$$

Donde el factor de dilución es igual a:

$$F_d = \frac{\text{volumen total}}{\text{volumen de muestra}}$$



$$F_d = \frac{25}{10} = 2.5$$

$$C_m = \frac{0.0740}{3.10e^{-4}} \times 2.5 = 594.7 \text{ mgO}_2 / L$$

Determinación de la concentración a partir de la curva de calibración normal promedio (CCN).

La ecuación es: $Y = a + b \cdot C_m$

Donde los valores del intercepto y la pendiente de la curva de calibración normal son:

$$a = 0.0328$$

$$b = 3.119E - 4$$

$Y = 0.068$ este valor es producto del promedio de tres lecturas de la muestra

En donde la concentración es:

$$C_m = \frac{y - a}{b} \times F_d$$

El factor de dilución es igual a:

$$F_d = \frac{25}{5} = 5.0$$

$$C_m = \frac{0.068 - 0.0328}{3.119 \times 10^{-4}} \times 5 = 564.2 \text{ mgO}_2 / L$$

Para calcular el error de la concentración de la muestra se asume como concentración verdadera obtenida a partir de la curva de adición patrón. Se calcula con la siguiente ecuación:



$$\text{Error relativo de concentracion} = \frac{\text{concentración por CAP} - \text{concentración por CCN}}{\text{concentración obtenida por adición patron}}$$

$$\text{Error relativo de concentracion} = \frac{596.7 - 564.2}{596.7} \times 100 = 5.44\%$$

En la siguiente tabla se muestran los valores de concentración de la muestra

Tabla. 16:

Muestra 1	Adición Patrón Mg O ₂ /L	Estándares externo Mg O ₂ /L	% Error relativo de concentración de la muestra
1	596.7 ±	564.2 ±	5.44%

En la tabla se muestra la concentración de la muestra de agua residual de una procesadora de camarones, calculada a partir de la curva promedio de calibración normal y curva promedio de adición patrón. Se observa que las concentraciones son aproximadamente iguales, con un error de concentración de 5.44%, tomando como referencia la concentración calculada a partir de la curva de adición patrón. Este valor es aceptable ya que esta dentro del rango de intervalo < 10%

VII. CONCLUSION



En el proceso de validación del método colorimétrico de reflujo cerrado para la determinación de Demanda Química de Oxígeno en aguas residuales (DQO), se determinaron una serie de parámetros para evaluar la eficiencia del mismo.

Se evaluó la linealidad del modelo a través de un análisis de regresión lineal, obteniendo para las cuatro curvas de calibración, valores de coeficiente de determinación r^2 mayores de 0.995. Aplicando un análisis de Anova para la verificación del ajuste lineal se obtiene un valor de $F_{\text{Calcul}} = 4712$ que comparado con $F_{\text{tabla}} = 10.1$ resulta $F_{\text{Calcul}} > F_{\text{tabla}}$ lo que significa que el modelo se ajusta a una línea recta. En la evaluación de la precisión del ajuste lineal, el cual se obtiene calculando $RSD\%$ da como resultado un valor de 0.5568% menor del valor establecido igual al 5%, lo cual comprueba una buena linealidad.

Se encontró un límite de detección del método, LD igual a 29.21 mg O₂/L y un límite de cuantificación, LC igual a 97.39 mg O₂/L.

La precisión del método en base a la repetibilidad, medida a partir de tres estándares de ftalato ácido de potasio, con concentraciones comprendidas en el rango de la curva de calibración normal: 100 mgO₂/L, 400 mgO₂/L y 900 mgO₂/L durante cinco días diferentes, fue evaluada a través de la comparación de las varianzas por Anova y el test de Bartlett, concluyendo que no existe diferencia significativa entre las varianzas. Puede decirse entonces que el método tiene buena precisión.

Para evaluar el efecto matriz se usó una muestra de agua residual de origen industrial. Después de comparar las pendientes de la curva de calibración normal y curva de adición patrón a través de la prueba de Fisher y del test T-Student., se encuentra que $F_c < F_{0.975}$ y $T_c < T_{0.975}$ lo que significa que las varianzas son homogéneas y que no hay diferencias significativas entre las pendientes. Se concluye que no hay efecto matriz, por lo tanto puede utilizarse la curva de calibración normal para determinar la DQO en muestras que tengan la misma matriz.

Se determinó la demanda química de oxígeno de la muestra a partir de la curva de calibración normal y la curva de adición patrón, encontrando una diferencia de 5.44%. Los resultados también sirvieron para evaluar la recuperación, obteniendo un resultado de 99.4%.



A partir de los resultados anteriores se establece que el método colorimétrico para la determinación de la demanda química de oxígeno en aguas residuales cumple con los requisitos apropiados para brindar resultados confiables y que por lo tanto, el laboratorio es competente para su determinación.



VIII. RECOMENDACIONES

- 1 -Antes de realizarse las lecturas en el equipo se debe dejar reposar las muestras para que el precipitado que se forme se deposite en el fondo del vial y de esta forma evitar interferencia.
- 2- Utilizar materiales certificados para verificar la exactitud del método.
- 3- Para cuantificar la demanda química de oxígeno en aguas residuales que contengan concentraciones menores de 100 mgO₂/L se debe de validar el método Colorimétrico de reflujo cerrado de rango bajo de concentración (10-90 mgO₂/L)
- 4- Se debe garantizar un plan de mantenimiento para el espectrofotómetro UV-Visible.
- 5- Preferiblemente adquirir el sistema integrado para la determinación de la demanda química de oxígeno para análisis de agua residual por el método Colorimétrico ofrecido por HACH.



IX BIBLIOGRAFÍA.

1-DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO. Espectrofotometría aplicada al control de calidad y proceso.
<http://www.tecnocientifica.com/2006/htm/products/divinstrumental/demandaoxigeno.html>.

2- DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO.

<http://www.hannainst.com.mx/productos/j/react-dqo.pdf>.

3-DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO.

http://atenea.udistrital.edu.co/grupos/fluoreciencia/capitulos_fluoreciencia/calaguas_cap17.pdf

4- Lenore S. Clesceri, WEF. Chair, Arnold E. Greenberg, APHA., Andrew D. Eaton, AWWA. Standard Methods for the Examination of water and wastewater. 20th edition 1998 (metodo5220D)

5- Douglas A. Skoog (Sanford University), F. James Haller. Timothy A. Nieman. Principio del análisis instrumental, Quinta edición España 2001.

6- Ramón Compañó. Profesor del departamento de Química Analítica. Universidad de Barcelona.

Ángel Ríos Profesor del departamento de Química Analítica. Universidad de Córdoba. Garantía de calidad de los laboratorios analíticos. 1998

7- Beatriz castillo Aguilar y Rolando Gonzáles Hernández, Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos Artículo de revisión. Centro de química farmacéutica Revista cubana de farmacia ciudad de la habana ener-abr.1996

http://www.cybetesis.cl/tesis/uchile/2006/oleksiuk_a/sourcus/oleksiuf-a.pdf

8- Rodier, J. Análisis de las aguas. Ed. Omega, Barcelona, España. 1989

9- Gustavo Delgado. Validaciones de métodos analíticos. Modulo 2 maestrías en química aplicada al análisis y gestión de calidad. León, enero del 2008



10-Verificación del ajuste lineal.

<http://www.inhem.sld.cu/publicaciones/listos%20para%20publicar/programa%20para%201a%20calibracion.pdf>

11- Ricard Boqué, Alicia Maroto. Análisis de la varianza (anova), Comparación de múltiples poblaciones Grupo de quimiometria y cualimetria, universitat Rovira virgili

12-procedimientos especifico de ensayo. Determinación de demanda química de oxígeno ($k_2cr_2o_7$) Laboratorio de agua, ingeniería química. Laboratorio de agua. Universidad de alicante.

http://atenea.udistrital.edu.co/grupos/fluoreciencia/capitulos_fluoreciencia/calaguas_cap17.pdf



ANEXO

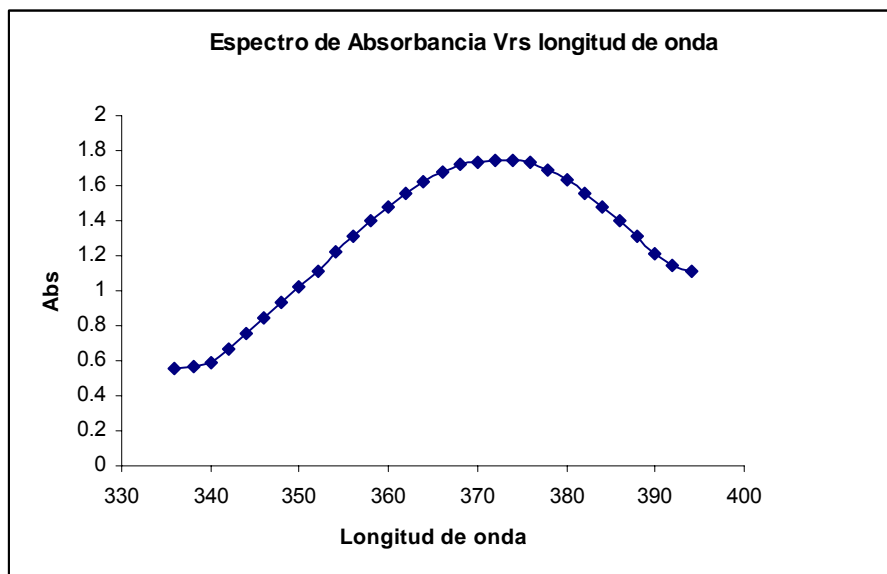
**DATOS DE ABSORCIÓN DEL BARRIDO ESPECTRAL REALIZADO EN EL ESPECTROFOTÓMETRO PERKIN- ELMER LAMBDA 15**

Tabla 17.

Longitud de onda nm	absorbancia	Longitud de onda nm	Absorbancia
336	0,557	366	1,678
338	0,572	368	1,717
340	0,592	370	1,738
342	0,670	372	1,744
344	0,752	374	1,742
346	0,847	376	1,729
348	0,932	378	1,692
350	1,024	380	1,636
352	1,116	382	1,559
354	1,217	384	1,480
356	1,312	386	1,396
358	1,400	388	1,314
360	1,477	390	1,214
362	1,551	392	1,150
364	1,625	394	1,110

Fig. 3

ESPECTRO OBTENIDO AL REALIZAR EL BARRIDO ESPECTRAL EN UN INTERVALO DE 336-394nm
LOS DATOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL ESPECTRO SE ENCUENTRAN EN TABLA16



**30 LECTURAS DE TRÁNSMITANCIA EN 372nm, REALIZADAS EN EL ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS PERKIN ELMER LAMBDA 15**

Tabla.18

N°de replicas	Transmitancia	N°de replicas	Transmitancia
1	1.83231442	16	1.79887092
2	1.78648757	17	1.83231442
3	1.81970086	18	1.81134009
4	1.81134009	19	1.81551566
5	1.83653834	20	1.78648757
6	1.82810022	21	1.8238957
7	1.81134009	22	1.81134009
8	1.81970086	23	1.81134009
9	1.81134009	24	1.82810022
10	1.81970086	25	1.80301774
11	1.79887092	26	1.81970086
12	1.83231442	27	1.81551566
13	1.81970086	28	1.80717413
14	1.80301774	29	1.81134009
15	1.82810022	30	1.81970086

**ERROR FOTOMETRICO, MEDIDO PARA EL EQUIPO EXPRESADO EN PORCENTAJE (utilizando una solución de 40ppm de cromato de potasio en hidróxido de potasio a 0.05N)** $\lambda = 372 \text{ nm}$ Desv. Estd = 0.01251435 $\Delta T = 0.0250287$

Tabla.19

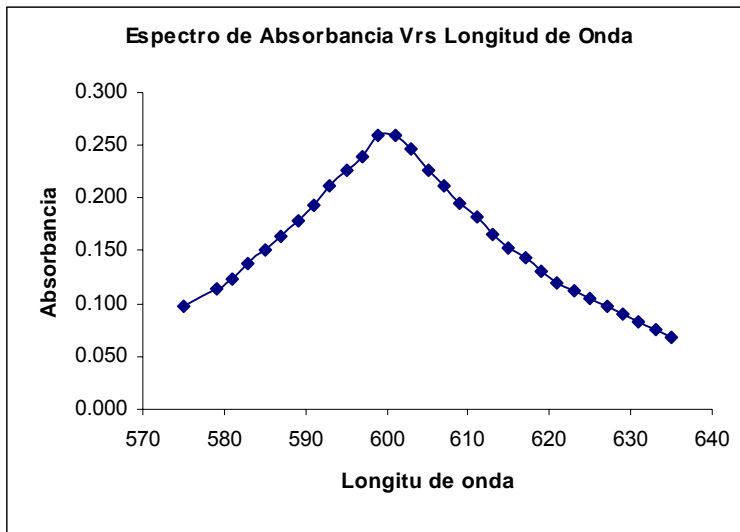
Nº	ABS	$\Delta C/C$	Nº	ABS	$\Delta C/C$	Nº	ABS	$\Delta C/C$	Nº	ABS	$\Delta C/C$
1	0.01	1.11231584	27	0.52	0.06921891	53	1.04	0.11460268	79	1.56	0.2529901
2	0.02	0.5691125	28	0.54	0.06979662	54	1.06	0.11773952	80	1.58	0.26155982
3	0.04	0.29796697	29	0.56	0.07047581	55	1.08	0.12100529	81	1.60	0.27046317
4	0.06	0.20800648	30	0.58	0.0712525	56	1.10	0.12440431	82	1.62	0.27971329
5	0.08	0.16335715	31	0.6	0.07212351	57	1.12	0.12794111	83	1.64	0.28932388
6	0.10	0.13684474	32	0.62	0.07308638	58	1.14	0.13162042	84	1.66	0.29930918
7	0.12	0.1194117	33	0.64	0.07413924	59	1.16	0.13544723	85	1.68	0.30968405
8	0.14	0.10717663	34	0.66	0.07528079	60	1.18	0.13942675	86	1.70	0.32046396
9	0.16	0.09819924	35	0.68	0.07651018	61	1.20	0.14356444	87	1.72	0.33166502
10	0.18	0.09140198	36	0.7	0.07782696	62	1.22	0.14786599	88	1.74	0.34330401
11	0.20	0.08613866	37	0.72	0.07923109	63	1.24	0.15233736	89	1.76	0.35539839
12	0.22	0.08199841	38	0.74	0.08072283	64	1.26	0.15698479	90	1.78	0.36796636
13	0.24	0.07870764	39	0.76	0.08230278	65	1.28	0.16181477	91	1.80	0.38102688
14	0.26	0.07607724	40	0.78	0.08397181	66	1.30	0.16683408			
15	0.28	0.07397246	41	0.8	0.08573105	67	1.32	0.17204981			
16	0.30	0.07229477	42	0.82	0.08758188	68	1.34	0.17746934			
17	0.32	0.07097055	43	0.84	0.08952593	69	1.36	0.18310037			
18	0.34	0.0699438	44	0.86	0.09156504	70	1.38	0.18895093			
19	0.36	0.06917125	45	0.88	0.09370126	71	1.40	0.1950294			
20	0.38	0.06861902	46	0.90	0.09593688	72	1.42	0.2013445			
21	0.40	0.06826029	47	0.92	0.09827438	73	1.44	0.20790533			
22	0.42	0.06807362	48	0.94	0.10071642	74	1.46	0.21472137			
23	0.44	0.06804175	49	0.96	0.10326589	75	1.48	0.22180248			
24	0.46	0.0681507	50	0.98	0.10592587	76	1.50	0.22915897			
25	0.48	0.0683891	51	1.00	0.10869964	77	1.52	0.23680155			
26	0.50	0.06874769	52	1.02	0.11159069	78	1.54	0.24474138			

**DATOS DE ABSORBANCIA DEL BARRIDO ESPECTRAL REALIZADO EN UN INTERVALO ENTRE 575 A 635nm PARA ENCONTRAR LA LONGITUD DE ONDA MÁXIMA PARA EL MÉTODO**

Tabla 20.

Longitud de onda nm	absorbancia	Longitud de onda nm	Absorbancia
575	0.098	607	0.211
579	0.114	609	0.196
581	0.124	611	0.182
583	0.138	613	0.165
585	0.151	615	0.152
587	0.163	617	0.143
589	0.179	619	0.131
591	0.193	621	0.12
593	0.211	623	0.112
595	0.226	625	0.105
597	0.240	627	0.098
599	0.260	629	0.091
601	0.260	631	0.083
603	0.247	633	0.076
605	0.226	635	0.068

FIG. 4
ESPECTRO OBTENIDO AL REALIZAR EL BARRIDO ESPECTRAL EN UN INTERVALO DE 575-635nm
LOS DATOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL ESPECTRO SE ENCUENTRAN EN TABLA.19



**30 LECTURAS DE TRÁNSMITANCIA EN 600nm, REALIZADAS EN EL ESPECTROFOTÓMETRO UV-VI PERKIN ELMER LAMBDA 15**

Tabla.21

Nºde replicas	Tránsmitancia	Nºde replicas	Tránsmitancia
1	54.9540874	16	54.9540874
2	54.3250331	17	54.8276965
3	54.8276965	18	54.9540874
4	54.8276965	19	54.9540874
5	54.8276965	20	54.9540874
6	54.7015963	21	54.8276965
7	54.8276965	22	54.9540874
8	54.9540874	23	54.9540874
9	54.9540874	24	54.9540874
10	54.8276965	25	54.9540874
11	54.9540874	26	54.9540874
12	54.9540874	27	55.0807696
13	54.8276965	28	55.0807696
14	55.0807696	29	55.0807696
15	54.8276965	30	54.4502653

**ERROR FOTOMETRICO EXPRESADO EN PORCENTAJE, MEDIDOS PARA EL METODO COLORIMETRICO (con una solución de 40ppm de cromato de potasio en hidróxido de potasio a 0.05N)** $\lambda = 600 \text{ nm}$

Desv est= 0.17983805

 $\Delta T = 0.35967611$

Tabla. 22

No	abs	$\Delta C/C$	No	abs	$\Delta C/C$	No	abs	$\Delta C/C$	No	abs	$\Delta C/C$
1	0.01	15.9844044	27	0.52	0.99470229	53	1.04	1.64688442	79	1.56	3.63556456
2	0.02	8.17836452	28	0.54	1.00300408	54	1.06	1.69196196	80	1.58	3.75871479
3	0.04	4.28189948	29	0.56	1.01276441	55	1.08	1.73889238	81	1.60	3.88665934
4	0.06	2.98913279	30	0.58	1.02392575	56	1.10	1.7877376	82	1.62	4.01958711
5	0.08	2.34750471	31	0.6	1.03644249	57	1.12	1.83856266	83	1.64	4.15769485
6	0.10	1.96651136	32	0.62	1.05027921	58	1.14	1.89143581	84	1.66	4.30118746
7	0.12	1.71599182	33	0.64	1.0654093	59	1.16	1.94642857	85	1.68	4.45027837
8	0.14	1.54016916	34	0.66	1.08181382	60	1.18	2.00361582	86	1.70	4.60518984
9	0.16	1.41116071	35	0.68	1.09948054	61	1.20	2.06307593	87	1.72	4.76615336
10	0.18	1.31348148	36	0.7	1.11840325	62	1.22	2.12489086	88	1.74	4.93341001
11	0.20	1.23784556	37	0.72	1.13858108	63	1.24	2.18914624	89	1.76	5.10721089
12	0.22	1.17834857	38	0.74	1.16001803	64	1.26	2.25593153	90	1.78	5.28781749
13	0.24	1.13105889	39	0.76	1.18272252	65	1.28	2.32534015	91	1.80	5.47550215
14	0.26	1.09325913	40	0.78	1.20670707	66	1.30	2.39746959			
15	0.28	1.06301264	41	0.8	1.23198798	67	1.32	2.47242159			
16	0.30	1.03890349	42	0.82	1.25858516	68	1.34	2.55030229			
17	0.32	1.01987391	43	0.84	1.28652187	69	1.36	2.63122236			
18	0.34	1.00511914	44	0.86	1.31582462	70	1.38	2.71529721			
19	0.36	0.99401734	45	0.88	1.34652303	71	1.40	2.80264715			
20	0.38	0.98608162	46	0.90	1.37864976	72	1.42	2.89339759			
21	0.40	0.9809265	47	0.92	1.4122404	73	1.44	2.98767922			
22	0.42	0.97824395	48	0.94	1.44733347	74	1.46	3.08562826			
23	0.44	0.97778593	49	0.96	1.48397036	75	1.48	3.18738661			
24	0.46	0.97935158	50	0.98	1.52219532	76	1.50	3.29310213			
25	0.48	0.98277754	51	1.00	1.5620555	77	1.52	3.40292887			
26	0.50	0.98793064	52	1.02	1.60360089	78	1.54	3.51702729			

**CURVAS DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO. DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO.
(Absorbancia vs. Concentración).**

Tabla.23

Concentración	Absorbancia	R ²	Intercepto (a)	Pendiente (b)
100	0.063			
200	0.095	0.00031423	0.03171795	0.99942529
400	0.159			
600	0.218			
800	0.280			
900	0.318			
100	0.065			
200	0.095	0.0003125	0.03275	0.999276
400	0.159			
600	0.217			
800	0.278			
900	0.318			
100	0.064			
200	0.096	0.0003123	0.03284	0.999001
400	0.158			
600	0.215			
800	0.278			
900	0.319			
100	0.066			
200	0.096	0.0003111	0.03408	0.999312
400	0.160			
600	0.218			
800	0.280			
900	0.318			

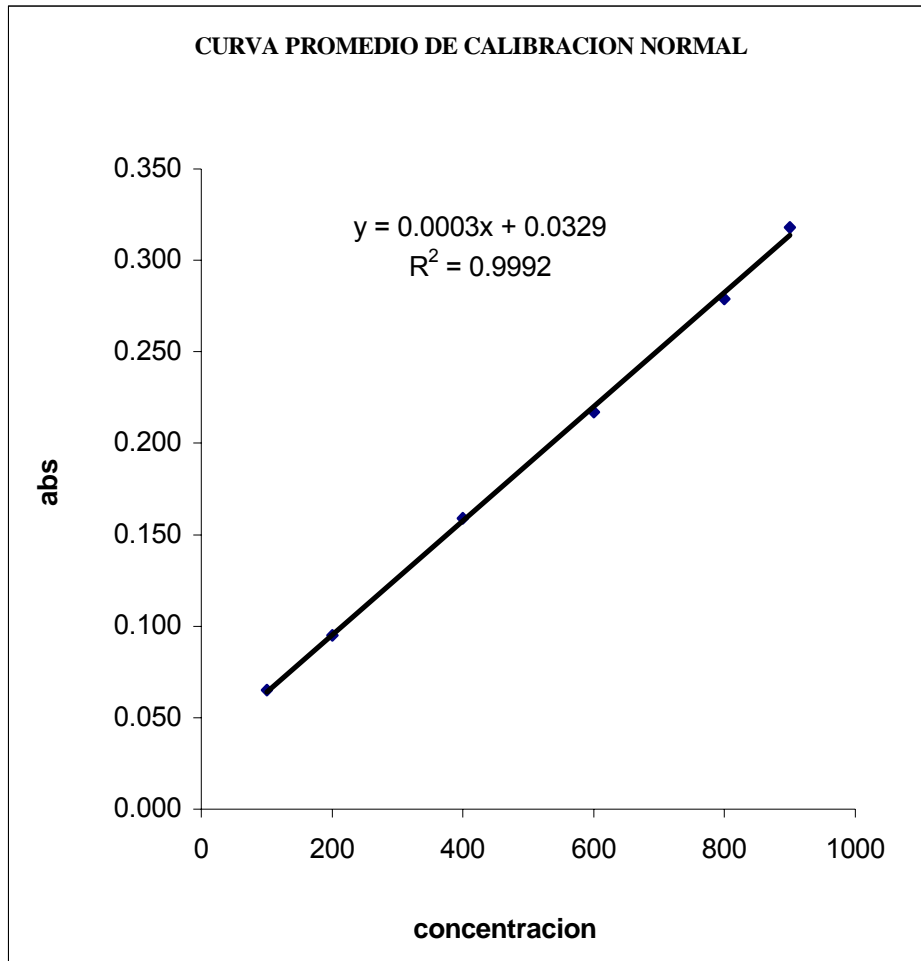
**CURVAS DE CALIBRACION POR ADICIÓN PATRÓN
(Concentración vs. Absorbancia)**

Tabla.24

Concentración	Absorbancia	R ²	Intercepto (a)	Pendiente (b)
100	0.102			
200	0.142	0.99725995	0.07167308	0.000313654
400	0.193			
600	0.256			
800	0.333			
900	0.350			
100	0.102			
200	0.140	0.99706367	0.07450641	0.00030865
400	0.198			
600	0.257			
800	0.332			
900	0.346			
100	0.107			
200	0.140	0.9973447	0.07550641	0.00030865
400	0.194			
600	0.254			
800	0.331			
900	0.348			



CURVA PROMEDIO DE CALIBRACION NORMAL





CURVA PROMEDIO DE ADICION PATRON

